

# Obsah

Seznam zkratk	3
B. Buňky, mezibuněčná hmota, interakce buněk s biomateriály	5
1. Chemické složení živých organismů	6
1.1. Biogenní prvky	6
1.2. Lipidy	6
1.3. Nukleové kyseliny	7
2. Struktura a funkce buňky	11
2.1. Prokaryontní buňka	12
2.2. Eukaryontní buňka	13
3. Životní cyklus buňky, buněčné dělení, buněčná smrt	18
3.1. Životní cyklus buňky a jeho regulace	18
3.2. Buněčné dělení	20
3.3. Buněčná smrt	21
4. Buněčné kultury	23
4.1. Dělení buněčných kultur	23
4.2. Kultivace buněk v prostředí <i>in vitro</i>	25
4.3. Růstová křivka buněk	26
4.4. Pasážování buněk	27
4.5. Počítání buněk	28
4.6. Příklady buněčných kultur	29
4.7. Uchování a transport buněk	29
4.8. Kontaminace buněčných kultur	30
5. Krevní buňky a jejich využití v tkáňovém inženýrství	32
5.1. Krevní plazma	32
5.2. Červené krvinky	33
5.3. Bílé krvinky	33
5.4. Krevní destičky	35
5.5. Testování hemokompatibility	35
6. Mezibuněčná hmota	37
6.1. Vláknenné proteiny	38
6.2. Adhezní bílkoviny	38
6.3. Proteoglykany	38
6.4. Funkce mezibuněčné hmoty	39
7. Tkáně	41
7.1. Epitelová tkáň	41

7.2.	Pojivová tkáň .....	43
7.3.	Svalová tkáň.....	45
7.4.	Nervová tkáň.....	45
7.5.	Trofická tkáň.....	46
8.	Interakce mezi buňkami a biomateriálem .....	47
8.1.	Adhezní bílkoviny.....	47
8.2.	Fokální adheze .....	48
8.3.	Vlastnosti scaffoldů ovlivňující vazbu adhezních proteinů .....	48
8.4.	Analýza adhezních proteinů.....	50
9.	<i>In vitro</i> testování tkáňových nosičů .....	51
9.1.	Metody hodnocení interakce buněk s tkáňovými nosiči.....	52
9.2.	Typy <i>in vitro</i> testování .....	54
9.3.	Statiská vs. dynamická kultivace .....	62
10.	Orgány-na-čipu .....	64
10.1.	Úvod.....	64
10.2.	Jak fungují orgány na čipu?.....	65
10.3.	První orgán-na-čipu: plíce .....	66
11.	<i>In vivo</i> testování tkáňových nosičů.....	69
11.1.	Historie pokusů na zvířatech .....	69
11.2.	Princip 3R.....	70
11.3.	Experimenty se zvířecími modely .....	70
12.	Etické otázky tkáňového inženýrství .....	72
12.1.	Filozofické přístupy k etickým otázkám .....	73
10.3.	Etické otázky získávání buněk a komercializace produktů tkáňového inženýrství .....	73

## Seznam zkratek

<b>A</b>	Adenin
<b>ADSC</b>	Adipose Derived Stem Cells
<b>APTT</b>	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas
<b>Arg</b>	Arginin
<b>ATCC</b>	American Type Cell Collection
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfát
<b>BSA</b>	Bovinní sérový albumin
<b>C</b>	Cytosin
<b>DAPI</b>	4',6-diamidin-2-fenylindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagles Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>ECACC</b>	The European Collection of Authenticated Cell Cultures
<b>ECM</b>	Mezibuněčná hmota
<b>ER</b>	Endoplazmatické retikulum
<b>ESC</b>	Embryonic Stem Cells
<b>FBS</b>	Fetální bovinní sérum
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
<b>FGF</b>	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
<b>FL</b>	fosfolipidy
<b>G</b>	Guanin
<b>GA</b>	Golgiho aparát
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykany
<b>GTP</b>	Guanosintrifosfát
<b>IGF</b>	inzulinu podobný růstový faktor (insulin like growth factor)
<b>IL8</b>	interleukin 8

<b>MEM</b>	Minimal Essential Medium
<b>MK</b>	mastné kyseliny
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b>MSC</b>	Mesenchymal Stem Cells
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
<b>PBS</b>	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
<b>PDGF</b>	destičkový růstový faktor (platelet derived growth factor)
<b>PDMS</b>	polydimethylsiloxan
<b>PF4</b>	destičkový faktor 4 (platelet factor 4)
<b>PI</b>	Propidium Jodid
<b>PRP</b>	Plasma bohatá na destičky (Platelet Rich Plasma)
<b>PT</b>	Protrombinový čas
<b>RGD</b>	Arginin-Glycin-Kyselina aspartová
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina
<b>rRNA</b>	ribozomální RNA
<b>T</b>	Thymin
<b>TAG</b>	triacylglycerol
<b>TGF <math>\beta</math></b>	Transformační růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
<b>tRNA</b>	transferová RNA
<b>U</b>	Uracil
<b>VEGF</b>	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
<b>WST</b>	water soluble tetrazolium salt

## **B. Buňky, mezibuněčná hmota, interakce buněk s biomateriály**

Druhá sekce je věnována buněčné biologii, mezibuněčné hmotě a interakci buněk s tkáňovými nosiči. Je zde popsána základní biologie buňky a tkání, testování tkáňových nosičů v laboratorních podmínkách (*in vitro*) a na živých organismech (*in vivo*). Poslední kapitola se věnuje etickým otázkám, které souvisí s oborem tkáňového inženýrství.

# 1. Chemické složení živých organismů

Jana Horáková

*Důležité pojmy: biogenní prvky, stopové prvky, lipidy, fosfolipidy, nukleové kyseliny, DNA, RNA, exprese genetické informace*

Tato kapitola se bude zabývat představením prvků a makromolekul, které se vyskytují v živých systémech. Jedná se o propojení znalostí biologie a chemie (obecné a organické). Nejprve budou představeny biogenní prvky vyskytující se v buňkách. V další části kapitoly pak budou popsány složitější molekuly živých systémů jako jsou lipidy a nukleové kyseliny. Na závěr kapitoly pak bude pojednáno o vztazích mezi nukleovými kyselinami a bílkovinami, což je zásadní informace pro fungování živých systémů.

## 1.1. Biogenní prvky

V buňkách se nachází tzv. biogenní prvky. Nejvíce zastoupené prvky v živých buňkách jsou **uhlík (C), vodík (H), kyslík (O) a dusík (N)**. Představují více než 95% hmotnosti lidského těla. Uhlík je čtyřvazný prvek, je schopen tvořit různě dlouhé řetězce, které se označují jako organické molekuly. Kyslík a vodík se také vyskytují v těchto organických sloučeninách. Dusík může tvořit 3 vazby, je součástí aminokyselin (bílkovin), nukleových kyselin. Dále se v živých organismech nachází **sodík (Na), hořčík (Mg), fosfor (P), síra (S), chlor (Cl), draslík (K), vápník (Ca)**. Tyto prvky se v buňkách vyskytují v menší míře, přibližně 0,1-1,5%. Dále se v živé hmotě nachází tzv. stopové prvky, které mají nejčastěji funkci katalytickou. Mezi tyto stopové prvky patří železo (Fe), měď (Cu), kobalt (Co), mangan (Mn), zinek (Zn) a jód (I).

Největší zastoupení v buňkách má voda, tvoří asi 70% hmotnosti buňky. Voda rozpouští polární a iontové sloučeniny, účastní se hydrolytických reakcí a acidobazických dějů, určuje tvar makromolekul díky hydrofilním / hydrofobním interakcím.

Dále se v buňkách nachází 4 hlavní skupiny malých organických molekul (sloučeniny obsahující až 30 atomů uhlíku): **cukry, mastné kyseliny, aminokyseliny a nukleotidy**. Tyto monomerní jednotky mohou být využívány pro stavbu obrovských makromolekul: **polysacharidy, lipidy, proteiny, nukleové kyseliny**. Dále mohou být využity v nejrůznějších metabolických drahách buňky.

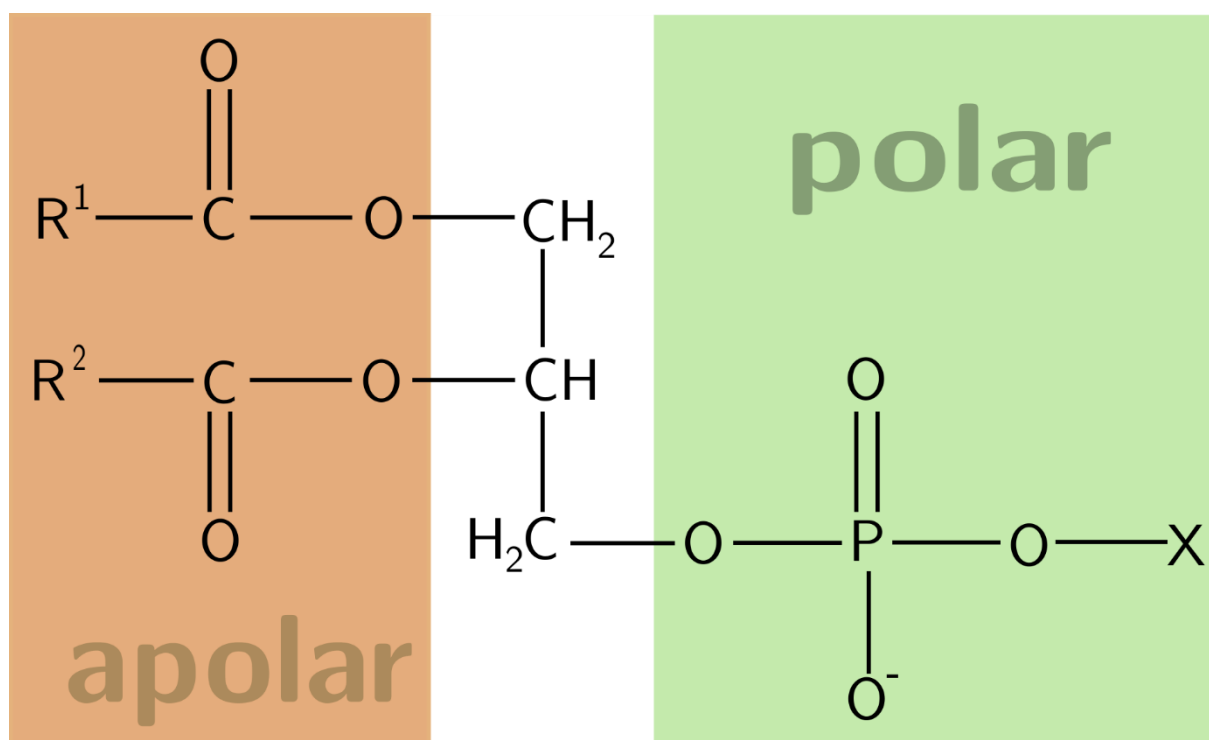
**Polysacharidy a proteiny** již byly představeny v předchozí sekci A. Scaffoldy – Kapitola 2. Přírodní materiály pro výrobu tkáňových nosičů. Zde bude detailněji popsána struktura lipidů a nukleových kyselin.

## 1.2. Lipidy

**Lipidy** jsou látky, které zajišťují ukládání energie, ochranu orgánů a v neposlední řadě jsou důležitou složkou buněčných membrán. Z chemického hlediska se jedná o estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Jako mastné kyseliny (MK) se označují karboxylové kyseliny s 4-26 uhlíky. Mohou obsahovat pouze jednoduché vazby (=nasyčené MK) nebo mohou obsahovat jednu nebo více dvojných vazeb (=nenasyčené MK). Mezi nasycené MK patří například kyselina palmitová (C16) a kyselina stearová (C18). Jednu dvojnou vazbu obsahuje kyselina

olejová (C18:1), dvě dvojně vazby kyselina linolová (C18:2), tři dvojně vazby kyselina  $\alpha$ -linolenová (C18:3), čtyři dvojně vazby kyselina arachidonová (C20:4). Díky přítomnosti dvojně vazby nemůže docházet k volné otáčivosti atomů, rozlišují se 2 izomerie – cis a trans. V buněčných membránách se nejčastěji vyskytuje cis izomerie, kdy se oba zbytky MK nachází na stejné straně dvojně vazby.

V organismu se vyskytuje několik typů lipidů. Může se jednat o jednoduché lipidy ve formě triacylglycerolů (TAG). Molekula TAG je složena ze tří řetězců MK, které jsou připojeny k molekule glycerolu (trojsytný alkohol). Dalším typem lipidů jsou tzv. složené lipidy, mezi které se řadí například glykolipidy, lipoproteiny a fosfolipidy (FL). Glykolipidy jsou molekuly sacharidů, které jsou glykosidickou vazbou spojené s lipidy. Nachází se na povrchu eukaryotických buněk, kde zajišťují buněčné rozpoznávání. Lipoproteiny jsou micely lipidů s proteiny na povrchu, které zajišťují transport ve vodě nerozpustných lipidů v krvi. Poslední skupinou složených lipidů jsou fosfolipidy, které tvoří buněčnou membránu. Jedná se o amfipatické molekuly, které mají polární a nepolární část (viz obr. 1). Polární část je tvořena fosfátovou skupinou připojenou k malé hydrofilní složce (např. cholin, ethanolamin, serin). Nepolární část je tvořena stejně jako u TAG řetězci mastných kyselin.



Obr. 1: Obecný vzorec fosfolipidu: 2 nepolární hydrofobní „ocas“ ( $R_1$ ,  $R_2$  – řetězce mastných kyselin) a 1 polární „hlava“ ( $X$  – cholin / serin / ethanolamin, ...).

### 1.3. Nukleové kyseliny

Další velkou skupinou makromolekul vyskytujících se v buňkách jsou **nukleové kyseliny**: deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA). Nukleové kyseliny jsou tvořené jednotkami nukleotidů spojenými fosfodiesterovými vazbami. Ve své struktuře uchovávají genetickou informaci, řídí syntézu bílkovin a tím i činnost buňky. Samotné

nukleotidy jsou složeny ze 3 částí: kyselá část (1), kterou představuje zbytek kyseliny fosforečné (hydrogen fosforečnanový anion), zásaditá část (2), kterou tvoří pyrimidová báze (cytosin C, thymín T, uracil U) nebo purinová báze (adenin A, guanin G), a cukerná část (3), která je tvořena ribózou u RNA či 2-deoxyribózou u DNA.

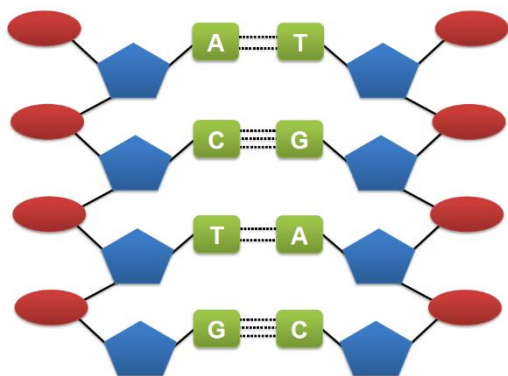
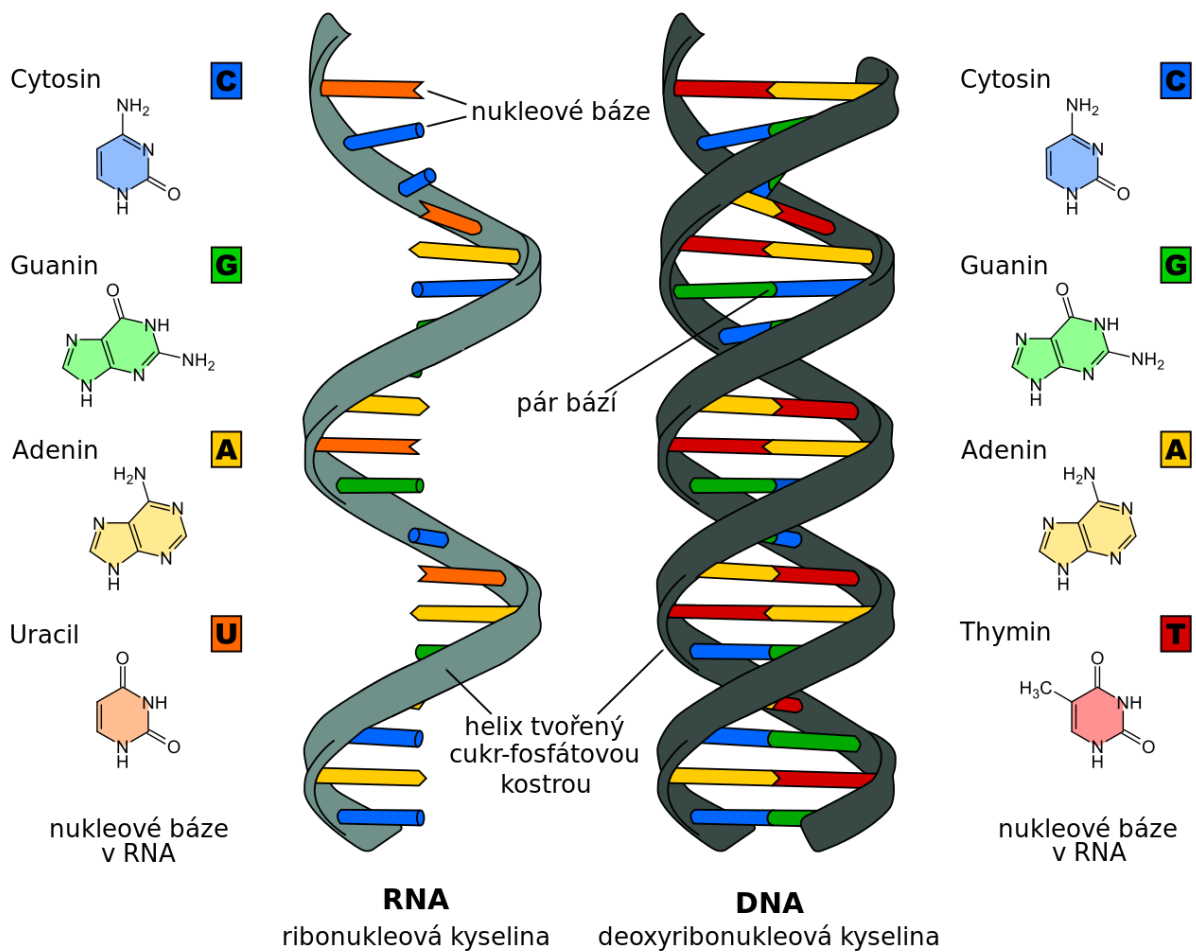
### ***1.3.1. DNA***

Deoxyribonukleová kyselina je nositelem genetické informace. Je tvořena 2-deoxyribózou, dusíkatými bazemi adeninem (A), thymínem (T), cytosinem (C) a guaninem (G). Jako primární struktura se označuje pořadí dusíkatých bází v řetězci. Molekula DNA je dvouvláknová, protilehlé řetězce míří opačným směrem (=sekundární struktura). DNA má tvar pravotočivé dvoušroubovice (viz obr. 2) díky vzniku vodíkových můstků mezi komplementárními bazemi. Adenin se páruje s thymínem pomocí 2 vodíkových můstků, cytosin se páruje s guaninem pomocí 3 vodíkových můstků.

### ***1.3.2. RNA***

Ribonukleová kyselina je tvořena ribonukleotidy obsahující cukr ribózu a dusíkaté báze adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a uracil (U). RNA je obvykle jednovláknová a je méně stabilní než DNA. Její hlavní funkcí je přepis genetické informace z DNA do proteinů. Rozlišují se 3 typy RNA: mediátorová RNA (mRNA), která obsahuje přepis genetické informace z DNA, transferová RNA (tRNA), která zajišťuje přenos aminokyselin do vznikajícího bílkovinného řetězce a ribozomální RNA (rRNA), která je se společně s proteiny podílí na stavbě ribozomů.



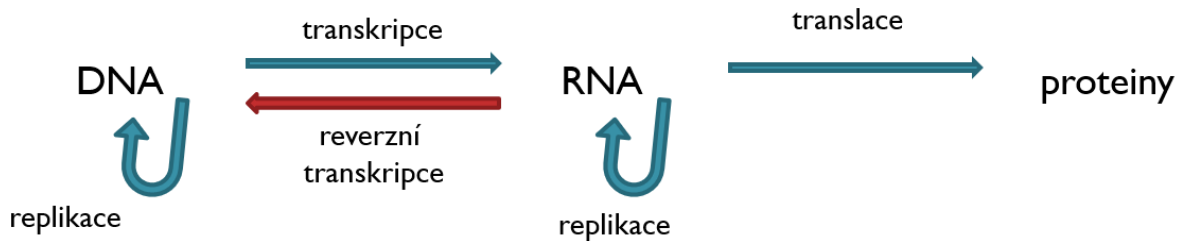


Obr. 2: Struktura nukleových kyselin: RNA, DNA, komplementarita bází.

Jelikož je DNA nositelka genetická informace, buňka musí mít nástroje, jak tuto dědičnou informaci uchovávat a uplatňovat jí. Před buněčným dělením dochází ke zdvojení DNA, k tzv. replikaci. Během procesu replikace dojde k oddálení dvou vláken šroubovice a dotvoření řetězce podle komplementarity bází. Tak je zajištěno, že výsledkem jsou 2 stejné molekuly DNA. Celý proces je velmi komplexní, podílí se na něm řada enzymů (DNA polymeráza atd.).

Pokud buňka potřebuje syntetizovat určitý protein, musí dojít k tzv. expresi genetické informace = přepis genetické informace uložené v DNA přes mRNA do struktury proteinu. Prvním krokem je tzv. transkripce, která označuje přepis části genu z DNA do mRNA. Vlákno

mRNA se opět tvoří na základě komplementarity bazí (pouze místo thyminu se v RNA vyskytuje uracil). Tento krok probíhá v buněčném jádru, výsledná mRNA pak přechází z jádra do cytoplazmy. Dalším krokem genetické exprese je pak translace, která umožní přepis mRNA do struktury proteinu. Tento děj se odehrává na ribozomech. Tyto procesy se souhrnně nazývají jako centrální dogma molekulární biologie (viz obr. 3).



Obr. 3: Schéma centrálního dogmatu molekulární biologie: replikace, (reverzní) transkripce, translace.

#### Použitá a doporučená literatura:

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-2-0

Nečas O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3

Institut Galenus [online], 2023 [cit. 2023-10-26]. Dostupné z:  
<https://www.galenus.cz/clanky/biochemie>

## 2. Struktura a funkce buňky

Jana Horáková

*Důležité pojmy: optická mikroskopie, buněčná teorie, prokaryotní buňka, bakterie, eukaryotní buňka, buněčné jádro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lysozomy, mitochondrie, cytoskelet – mikrotubuly, mikrofilamenta, intermediární filamenta, cytosol, cytoplazmatická membrána, fosfolipidová dvouvrstva, membránové proteiny, glykokalyx, membránový transport – difuze, přenašečové proteiny, iontové kanály*

Buňky jsou základními stavebními a funkčními jednotkami všech živých organismů, které jsou schopné se samostatně dělit. Některé organismy jako např. bakterie jsou jednobuněčné, kdy jedna buňka zajišťuje všechny funkce. Vyšší organismy (rostliny, živočichové) jsou tvořeny několika typy buněk, které společně vytváří funkční organismus.

Buňky je možné pozorovat světelným mikroskopem, jejich velikost se nejčastěji pohybuje v řádech desítek mikrometrů. První objevy buněk byly spojeny s rozvojem světelné mikroskopie. Robert Hook roku 1665 sestrojil jednoduchý mikroskop se zvětšením asi 300x, kterým zkoumal korek. Ve své zprávě pro královskou společnost popsal, že je korek složen z malých komůrek, které nazval buňky (latinsky *cellulae*). Hook pozoroval ve skutečnosti buněčné stěny, označení „buňka“ se však používalo i nadále. Dalším průkopníkem v oblasti mikroskopie byl Anthony van Leeuwenhoek, který sestrojil dokonalejší mikroskopy, kterými pozoroval mikroorganismy, krevní buňky, spermie, svalová vlákna. Další významný mezník v buněčné biologii nastal v 19. století, kdy se mikroskopie začala rutinně používat k pozorování a studiu buněk. Roku 1838 botanik Matthias Schleiden po výzkumu rostlinných pletiv a o rok později (1839) zoolog Theodor Schwann po studiu živočišných tkání nezávisle na sobě popsali a dokázali, že buňky jsou univerzálními stavebními jednotkami živých tkání. Později Jan Evangelista Purkyně postuloval, že buňky vznikají dělením již existujících buněk. Toto tvrzení bylo dokázáno Louisem Pasteurem v 60. letech 19. století.

Na základě těchto významných objevů byla formulována tzv. buněčná teorie, která tvrdí:

- Buňky jsou základní a strukturní jednotkou živých organismů.
- Všechny organismy se skládají z jedné nebo více buněk.
- Buňky vznikají z jiných buněk buněčným dělením.
- Buňky obsahují genetický materiál, který předávají dceřinným buňkám.
- Chemické složení buněk a biochemické procesy odehrávající se uvnitř buněk se zásadně neliší.

Buňky mají rozměry obvykle v řádech mikrometrů, obvykle cca 5-30  $\mu\text{m}$  v průměru. Existují však i výjimky. Např. nervové buňky mají výběžky dlouhé až 1 metr. Ženské zárodečné buňky jsou také větší, mají průměr okolo 0,1 mm. Menší rozměr buněk mají např. bakterie, jejich velikost se pohybuje okolo 0,5  $\mu\text{m}$ . Jak již bylo řečeno, buňky lze pozorovat optickým mikroskopem, který vyhovuje svým rozlišením (cca 0,2  $\mu\text{m}$ , zvětšení cca 1000x). Rozlišovací schopnost optického mikroskopu je limitovaná vlnovou délkou viditelného světla. Optickým mikroskopem lze pozorovat cytoplazmatickou membránu ohraničující buňku a jádro. Ostatní

organely lze obarvit speciálními fluorescenčními barvivy a pozorovat je pomocí fluorescenčního mikroskopu. Větší detaily lze také zkoumat transmisí elektronovou mikroskopií po zhotovení ultratenkých řezů.

Rozlišují se 2 základní typy buněk podle svého vnitřního uspořádání. Fylogeneticky starší prokaryontní buňky, ze kterých se později vyvinuly vyspělejší eukaryontní buňky se složitější stavbou.

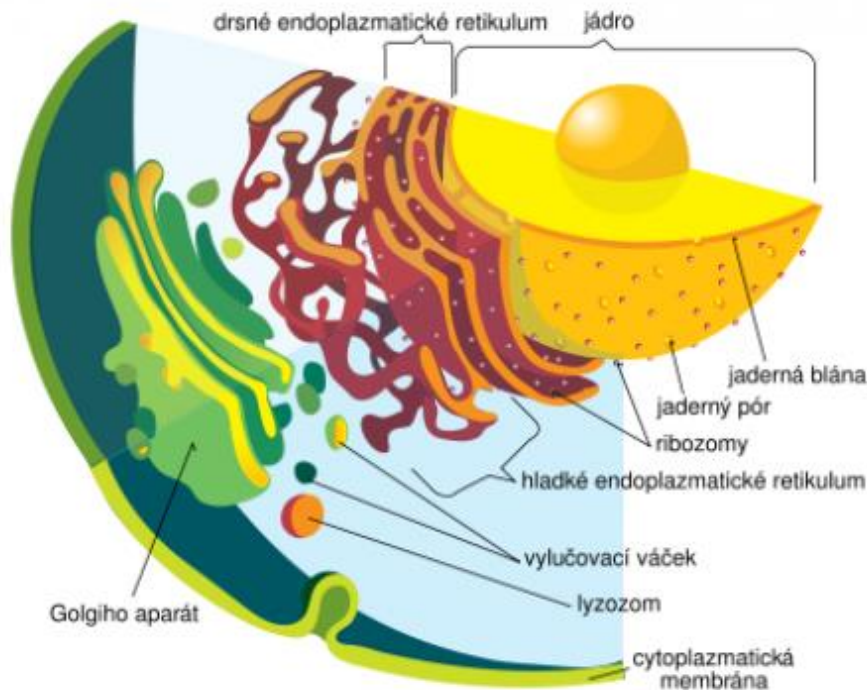
## 2.1. Prokaryontní buňka

Prokaryontní buňka je charakteristická tím, že má jednodušší uspořádání v porovnání s eukaryontní, i její rozměr je cca o řád menší (velikost 0,2-3  $\mu\text{m}$ ). První prokaryontní organismy se vyvinuly pravděpodobně před 3,5 miliardami let. Název pochází z řeckého *pro* (před) a *karyon* (jádro). Genetická informace je uspořádána do tzv. nukleoidu, který je tvořen jednou velkou molekulou DNA. Nukleoid není ohraničen žádnou membránou, plave volně v cytoplasmě. V prokaryontní buňce se nevyskytují žádné organely. V cytoplasmě se nachází ribozomy. Cytoplazmatické membrána je chráněna buněčnou stěnou obsahující peptidoglykeny (murein). Jedná se o biopolymer vyskytující se nad cytoplazmatickou membránou bakterií, který pomáhá udržovat tvar buňky, má ochrannou funkci. Prokaryontní buňka může obsahovat další přídatné struktury, jako např. bičíky umožňující pohyb, ochranné pouzdro, fimbrie (pili) zajišťující adhezi prokaryont k sobě navzájem nebo na určitý povrch.

Prokaryontní organismy se dělí na 2 domény – bakterie a Archea. Archea tvoří rozsáhlou skupinu jednobuněčných mikroorganismů, které se nachází zpravidla v extrémním prostředí (vysoké teploty, nízké pH, vysoký obsah soli). Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě, vyskytují se ve vodě, v půdě, ve vzduchu a v neposlední řadě mají také velmi významnou úlohu jako symbionti mnohobuněčných organismů. V lidském těle je přítomno přibližně stejně či dokonce více prokaryontních buněk ( $10^{13-14}$ ) než eukaryontních ( $10^{13}$ ). Nejvíce bakterií se nachází v trávicí soustavě, zejména ve střevech. Tato střevní mikroflóra označovaná jako mikrobiom plní nespočet funkcí, na což se zaměřuje intenzivní výzkum posledních let. Bakterie však mohou mít i negativní dopad na lidské zdraví, mohou být původci infekčních onemocnění. V oboru tkáňového inženýrství je nutné zabránit rozvoji jakékoliv infekce, která může nastat při implantaci scaffoldu. Vyvíjené tkáňové nosiče by ideálně neměly umožňovat adhezi bakterií. Toto hledisko je velmi složité splnit, jelikož prokaryontní a eukaryontní buňky mají podobné znaky, bakterie se navíc množí daleko rychleji v porovnání s buňkami vyšších organismů. Po adhezi na povrch materiálu mohou patogenní bakterie vytvořit tzv. biofilm, což je struktura sloužící k ochraně a komunikaci mikrobů. Vznik biofilmu na povrchu tkáňového nosiče může být velmi nebezpečnou, život ohrožující situací. Účinnou strategií boje proti infekci povrchu scaffoldu je správná sterilizace materiálu a aseptická práce během implantace.

## 2.2. Eukaryontní buňka

Eukaryontní buňky jsou složitější a větší než buňky prokaryontní. Mohou se vyskytovat samostatně u jednobuněčných organismů (např. prvoci) nebo mohou být součástí mnohobuněčných organismů (rostliny, živočichové). Název pochází z řeckého *eu* (pravý) a *karyon* (jádro). Eukaryontní buňka má genetickou informaci ve formě DNA uzavřenou v jádře. V buňce se nachází buněčné organely, které jsou ohraničené membránou. Tím je zajištěna organizace buněčných pochodů. V cytoplazmě buněk se nachází cytoskelet. V následujících odstavcích budou popsány jednotlivé organely živočišných buněk, viz obr. 4.



Obr. 4: Schéma živočišné buňky. (Pozn. – pouze struktury shodné s popisky v textu).

**Jádro** (*nukleus, karyon*) je nejdůležitější organelou buňky, jelikož obsahuje genetickou informaci. Může mít různou velikost i tvar. Průměrná velikost se pohybuje okolo 5-10  $\mu\text{m}$ , tvar bývá nejčastěji kulovitý či oválný. Existují však i buňky s laločnatým jádrem jako např. neutrofilní granulocyty (bílé krvinky). Tvar i velikost jádra se mění dle aktuálního stavu buněčného dělení, jedná se o dynamickou strukturu. Počet jader může být také variabilní. Nejčastěji buňka obsahuje jedno jádro uložené centrálně. V organismu jsou však i buňky bezjaderné (červené krvinky) či vícejaderné (osteoklasty). Na povrchu jádra je dvojitá membrána (vnitřní a vnější), která obsahuje množství pórů umožňující komunikaci s ostatními kompartmenty buňky. Uvnitř jádra se nachází tzv. chromatin tvořený DNA a bílkovinnými histony. Jaderná DNA obsahuje genetickou informaci pro tvorbu bílkovin. Dlouhá lineární molekula DNA (2-8 cm) je v jádře komplexně uspořádána. V době, kdy se buňka připravuje na buněčné dělení, je možné pozorovat mikroskopicky přítomnost chromozomů, které jsou tvořeny komplexem histonových bílkovin a DNA. Somatické lidské buňky jsou tzv. diploidní, obsahují 2 sady chromozomových párů ( $2n \times 23$ ). Celkem obsahuje buňka 46 chromozomů,

příčemž polovina pochází od otce, polovina od matky. Pohlavní buňky (spermie, vajíčka) obsahují pouze jednu sadu chromozomů, označují se jako haploidní. Jádro může obsahovat jedno nebo několik jadérek (*nukleolus*), kde je soustředěna ribozomální rRNA. Tato RNA se podílí na vzniku ribozomů, které jsou důležité při syntéze bílkovin v buňkách.

**Endoplazmatické retikulum** (ER) tvoří systém propojených váčků a kanálků, které navazují na buněčné jádro. Jedná se o membránou ohraničenou organelu, která má důležitou funkci v syntéze molekul (proteinů, lipidů, sacharidů). Rozlišujeme drsné a hladké endoplazmatické retikulum. Drsné endoplazmatické retikulum má na svém povrchu přisedlé ribozomy a jeho funkce spočívá v syntéze proteinů, jejich modifikaci a degradaci. Na hladkém endoplazmatickém retikulu nejsou přítomné ribozomy, probíhá v něm metabolismus tuků a hormonů, modifikace proteinů, účastní se procesu detoxikace. Další velmi významnou funkcí je skladování a uvolňování vápenatých iontů. V nitrobuněčné tekutině (cytosolu) je mnohem nižší koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , její koncentrace musí být udržována na určité hladině. Např. ve svalových buňkách dochází díky uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z hladkého endoplazmatického retikula ke svalovému stahu.

**Golgiho aparát** (GA) navazuje na systém endoplazmatického retikula. Jedná se o soustavu váčků, které slouží především k transportu a úpravě bílkovin, dále k syntéze polysacharidů a glykoproteinů<sup>1</sup>.

**Lysozomy** jsou kulovité membránové útvary sloužící k hydrolytické degradaci látek. Obsahují velké množství enzymů, především kyselých hydrolázy, které vedou k rozkladu sacharidů, proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Uvnitř lysozomů je nižší pH, obvykle mezi 5,0-6,0. Vznikají odštěpením z endoplazmatického retikula či Golgiho aparátu. Rozlišují se 3 typy lysozomů. Primární lysozom představuje pouze váček s enzymy. Po pohlčení materiálu určeného ke zpracování vzniká sekundární lysozom. Terciární lysozom vzniká, pokud došlo k pohlčení materiálu, který již nelze přítomnými enzymy rozložit. Nestrávený materiál se může hromadit v buňce nebo může být vyloučen ven z buňky po splynutí s cytoplazmatickou membránou. Lysozomy mohou také rozkládat látky přijaté z okolí buňky pinocytózou (kapalné látky) nebo fagocytózou (pevné látky).

Systém endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a lysozomů umožňuje neustálou výměnu organických látek. Makromolekuly jsou transportovány do místa potřeby v uzavřených váčcích, uvolňují se po splynutí s membránou cílového kompartmentu (viz obr. 1). Tyto procesy umožňují buňce přesně a cíleně řídit distribuci látek dle aktuálních podmínek.

**Peroxisomy** jsou membránou ohraničené váčky s enzymy zajišťujícími oxidaci škodlivých látek a degradaci mastných kyselin.

---

<sup>1</sup> glykoproteiny – proteiny s navázanými sacharidy, syntéza proteinu probíhá v drsném ER, proces glykosylace (navázání sacharidů na bílkovinný řetězec) v GA

**Ribozomy** jsou ribonukleoproteiny vyskytující se volně v cytoplazmě nebo vázané na drsné endoplazmatické retikulum. Jejich funkcí je účast na syntéze proteinů. Jsou složeny z ribozomální RNA (rRNA) a proteinů. Skládají se ze dvou podjednotek, malé a velké.

**Mitochondrie** jsou obsaženy v buňkách ve větším počtu, slouží jako energetické centrum buňky. Jsou ohraničeny dvojitou membránou. Vnitřní membrána je členěna ve výběžky, tzv. kristy, dochází tak k účinnému zvětšení povrchu. Na membráně mitochondrií jsou přítomny enzymy dýchacího řetězce, který vede k produkci adenosintrifosfátu (ATP, molekula sloužící jako „palivo“ pro další aktivní buněčné děje vyžadující přísun energie). V mitochondriích probíhají i další důležité metabolické procesy. Počet mitochondrií v buňce se odvíjí od její metabolické aktivity. Průměrná buňka obsahuje kolem stovky mitochondrií, metabolicky aktivní buňka může obsahovat až tisíce mitochondrií pro zabezpečení dostatečného množství ATP. Mitochondrie se označují jako tzv. semiautonomní organely, jelikož obsahují vlastní DNA označovanou jako mtDNA. Původ mitochondrií se vysvětluje na základě pohlcení bakterie eukaryotickou buňkou, kdy došlo k endosymbióze<sup>2</sup>.

**Cytoskelet** je dynamický systém vláken a tubulů. Skládá se ze 3 složek – mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediární filamenta. Funkcí cytoskeletu obecně je poskytnutí mechanické opory buňky, udržování jejího tvaru, transport látek a buněčných kompartmentů a účast na buněčném dělení.

**Mikrotubuly** jsou nejsilnějšími vlákny cytoskeletální soustavy, mají průměr 25 nm. Jsou složeny z bílkoviny tubulinu, která je uspořádána do dimerových jednotek  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu. Jedná se o velmi dynamické struktury, dle potřeb buňky dochází k polymeraci tubulinu a vzniku dutého mikrotubulu, který je tvořen seskupením 13ti protofilament. Polymerace tubulinu je podmíněna přísunem energie ve formě guanosintrifosfátu (GTP). Mikrotubuly slouží k transportu organel uvnitř buněk, vytváří dělicí vřeténko zajišťující pohyb chromozomů během buněčného dělení, umožňují změnu tvaru buňky. Pohyb organel umožňují tzv. molekulové motory jako např. kineziny a dyneiny za spotřeby energie ve formě ATP, které se váží na mikrotubuly a na organelu, která má být přemístěna.

**Mikrofilamenta** (aktinová filamenta) jsou tenká vlákna s průměrem 7 nm. Jejich funkcí je udržování tvaru a vnitřní organizace buňky. Většina vláken se nachází ve formě svazků poblíž cytoplazmatické membrány. Velmi důležitou funkci mají ve svalových buňkách, kde se asociují s proteiny myosinem a tropomyosinem a zajišťují svalový stah.

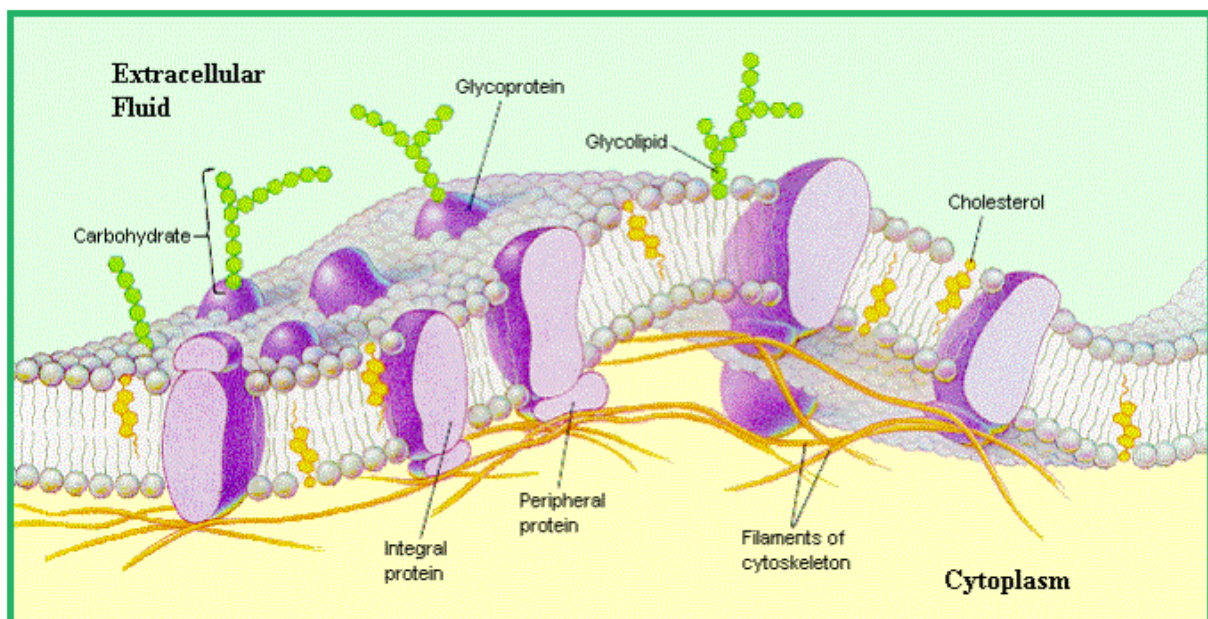
**Intermediární filamenta** (střední filamenta) mají průměr 8-12 nm, jsou tvořeny různými vláknitými bílkovinami (keratin, desmin, vimentin). Představují nejpevnější a nejodolnější cytoskeletární vlákna, která zajišťují mechanickou oporu buňky. Na rozdíl od mikrotubulů a mikrofilament jsou intermediární filamenta poměrně stálou strukturou.

---

<sup>2</sup> endosymbióza – soužití dvou organismů, z nichž jeden žije uvnitř druhého organismu

**Cytosol** (intracelulární, vnitrobuněčná tekutina) je tekutá složka obklopující buněčné organely. Cytosol se skládá především z vody (70%), iontů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), rozpuštěných látek (aminokyseliny, metabolity) a makromolekul (bílkovin). Vnitrobuněčné pH je udržováno v rozmezí hodnot 7,0-7,4.

**Cytoplazmatická membrána** ohraničuje buňku od okolí, umožňuje přenos látek a komunikaci s okolním prostředím. Má tloušťku cca 5-7 nm, je pozorovatelná pouze elektronovým mikroskopem. Je složena z dvouvrstvy fosfolipidů s proteiny a cholesterolem (viz obr. 5). Fosfolipidy jsou tzv. amfipatické molekuly – obsahují hydrofilní a hydrofobní část. Molekuly fosfolipidů jsou uspořádány v dvouvrstvě tak, že hydrofobní konce směřují dovnitř membrány, hydrofilní konce jsou v kontaktu s extra-/intracelulárním prostorem. Molekuly fosfolipidů se mohou pohybovat – rotovat, měnit pozice v rámci jedné vrstvy, případně se přesouvat i do druhé vrstvy za dodání energie. Tento jev způsobuje, že se membrána chová jako tekutina, její složení se popisuje tzv. modelem tekuté mozaiky. Mezi fosfolipidy jsou vmezeřeny proteiny, které vykonávají specifické funkce. Mohou fungovat jako přenašeče (např. sodno-draselná pumpa), spojníky (integriny), receptory (např. receptory pro růstové faktory), enzymy (např. enzymy dýchacího řetězce v mitochondriích). Proteiny mohou prostupovat celou membránou (transmembránové / integrální proteiny) nebo jen vnitřní či vnější částí (periferní proteiny). Díky své velikosti tvoří proteiny až 50% objemu cytoplazmatické membrány. Další součástí buněčné membrány živočichů je cholesterol, který se vyskytuje mezi hydrofobními konci fosfolipidů, snižuje tekutost membrány.



Obr. 5: Schéma složení cytoplazmatické membrány.

V extracelulárním prostředí se nad cytoplazmatickou membránou vyskytuje tzv. *glykokalyx*, což je vrstva glykoproteinů a proteoglykanů. Každá buňka má typické složení tohoto ochranného pláště, proto může sloužit k buněčnému rozpoznávání. Přítomnost sacharidů ve složkách glykokalyxu způsobuje absorpci vody, proto se vytváří na povrchu slizovitý povrch, který funguje jako ochrana buňky před mechanickým a chemickým poškozením



Transport látek přes membrány musí být striktně regulován, aby bylo udržováno stálé vnitřní prostředí uvnitř buněk, které je odlišné od složení mezibuněčné hmoty. Cytoplazmatická membrána je polopropustná (semipermeabilní). Látky mohou dovnitř buňky a ven z buňky pronikat difuzí, pasivním nebo aktivním transportem pomocí iontových kanálů či přenašečových proteinů. Fosfolipidová dvouvrstva propouští volně malé nepolární molekuly jako např. kyslík a oxid uhličitý, malé nenabitě polární molekuly jako je voda a ethanol. Větší molekuly jako např. glukóza prostupují membránou samovolně jen velmi omezeně. Všechny ionty a nabitě molekuly jsou zcela nepropustné, k jejich přenosu jsou využívány membránové transportní proteiny. Rozlišujeme 2 třídy transportních proteinů – přenašečové proteiny a iontové kanály. *Přenašečové proteiny* umožňují transport malých organických molekul jako např. cukry, aminokyseliny. Nejprve dojde k vazbě specifického substrátu, který má být přenesen, na přenašečový protein. Poté proběhne změna konformace přenašečového proteinu a substrát je přenesen na druhou stranu membrány. Tento přenos může probíhat pasivně (po koncentračním spádu) nebo aktivně (proti koncentračnímu gradientu) za dodání energie ve formě ATP. Příkladem aktivního transportu pomocí přenašečového proteinu je sodno-draselná pumpa, která se vyskytuje v membráně většiny buněk lidského těla. Tento přenašeč zajišťuje transport  $\text{Na}^+$  ven z buňky a  $\text{K}^+$  směrem do buňky (proti elektrochemickým gradientům obou iontů) za spotřeby energie ve formě hydrolýzy ATP. Druhým typem transportních proteinů jsou *iontové kanály*. Kanálové proteiny jsou selektivní pro určitý typ iontů. V závislosti na průměru a tvaru iontového kanálu dochází k propustnosti pouze určitého iontu. Iontové kanály jsou uzavíratelné. Přejít mezi otevřením a zavřením je regulován podmínkami uvnitř a vně buňky (membránovým potenciálem, vazbou specifického ligandu, mechanickými podněty). Ve srovnání s přenašečovými proteiny vynikají iontové kanály vysokou rychlostí transportu.

Dále může buňka využívat transport pomocí membránových váčků (cytóza). Při těchto dějích dochází k tvorbě váčků (vezikul), které vznikají odštěpením membrány (cytoplazmatické či membrány organel – ER, GA). Umožňuje transport větších částic a molekul pomocí pohybu cytoskeletální soustavy buněk. Jedná se o řízený proces vyžadující dodání energie. Endocytózou dochází k transportu pevných látek dovnitř buňky. Pokud jsou pohlcovány tekuté látky (extracelulární tekutina), proces se nazývá pinocytóza. Při exocytóze dochází k transportu látek ven z buňky. Váček splyne s cytoplazmatickou membránou buňky a jeho obsah se uvolní do okolí.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-2-0

Nečas O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3

Závodská R. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie*. Biologie pro gymnázia. Praha: Scientia, 2006. ISBN 80-86960-15-3

Institut Galenus [online], 2023 [cit. 2023-10-26]. Dostupné z: <https://www.galenus.cz/clanky/biochemie>

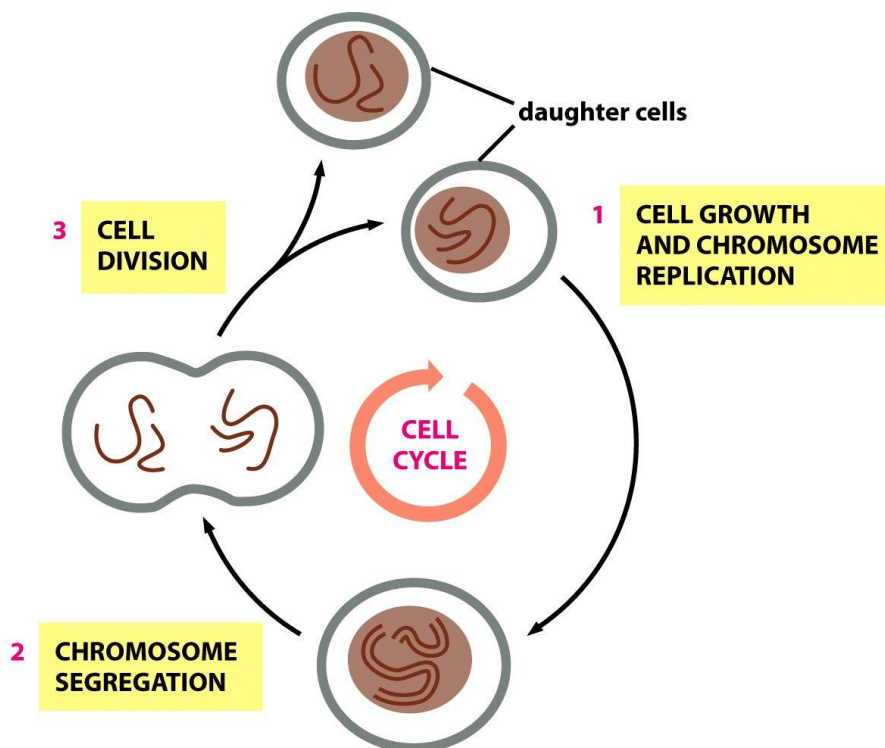
### 3. Životní cyklus buňky, buněčné dělení, buněčná smrt

Jana Horáková

*Důležité pojmy: buněčný cyklus (M fáze, G1 fáze, S fáze, G2 fáze, G0 fáze), regulace buněčného cyklu, mitóza, chromozomy, meióza, proliferace buněk, apoptóza, nekróza*

#### 3.1. Životní cyklus buňky a jeho regulace

Všechny živé buňky se rozmnožují pomocí **buněčného dělení**. Po průkazu buněčné teorie se dále buněčným dělením zabýval Rudolf Virchow, který postuloval známou větu: “*Omnis cellula e cellula*“ (Buňky vznikají dělením již existujících buněk). Buňky zdvojnásobí svůj obsah a pak se rozdělí na dvě dceřinné buňky. Období mezi jednotlivým buněčným dělením se označuje jako **životní cyklus buňky**. Doba trvání této doby se označuje jako generační doba. Ta je odlišná u různých typů buněk. Některé buňky se dělí velmi často jako např. střevní epitelové buňky nebo krevetvorné buňky v kostní dřeni. Jiné typy buněk se naopak dělí velmi pomalu (např. jaterní buňky) nebo dokonce vůbec (nervové, svalové buňky). Schéma buněčného cyklu je znázorněno na obr. 6.

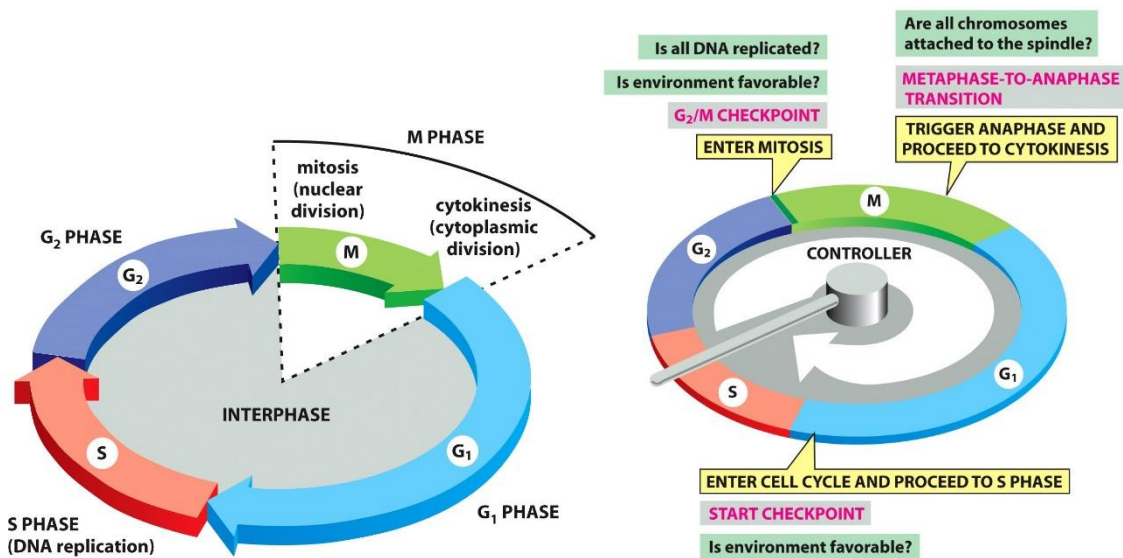


Obr. 6: Buněčný cyklus – 1: replikace chromozomů a buněčný růst, 2: oddělení chromozomů, 3: buněčné dělení.

Buněčné dělení bakterií může probíhat za příznivých podmínek velmi rychle. Např. bakterie *Escherichia coli* je schopná se množit každých 20 minut. Bakterie nemají buněčné jádro a jejich DNA je uspořádána v jediném chromozomu, proto může buněčné dělení probíhat vyšší rychlostí, než je tomu u eukaryotních buněk. Dělení prokaryotních buněk se označuje jako tzv. binární dělení. Dochází ke zdvojení (=replikaci) DNA, která zůstává přichycena k plazmatické

membráně. Dále dochází k růstu buňky. Poté nastává rozdělení jednoduchým dělením, kdy se nová plazmatická membrána a buněčná stěna dostanou mezi kopie DNA.

U eukaryontních buněk je buněčné dělení složitější proces díky rozložení genetické informace do více chromozomů a díky komplexní struktuře buňky, která obsahuje nezbytné buněčné organely. Jedná se tedy o proces složený z několika dějů, které jsou přesně regulovány. Samotný buněčný cyklus je rozdělen do čtyř fází: *G1 fáze*, *S fáze*, *G2 fáze* a *M fáze* (viz obr. 7). Mikroskopicky viditelná je pouze M fáze (mitotická fáze), kdy dochází k dělení jádra (=mitóza) a dělení buňky (=cytokineze). Tato fáze trvá řádově hodiny, představuje pouze malý zlomek buněčného cyklu.



Obr. 7: Buněčný cyklus + kontrolní body.

Po M fázi buňka vstupuje do tzv. *interfáze*, během které dochází ke zvětšování buňky. G<sub>1</sub> fáze, která navazuje na mitotickou fázi, se nazývá jako postmitotická fáze. Dochází ke kontrole a opravám DNA. Buňka roste, syntetizuje látky potřebné k následné replikaci DNA. V této fázi se také nachází hlavní kontrolní bod. Pokud by nebyly vhodné podmínky pro další množení, nepokročí buněčný cyklus do následující S fáze. Tato fáze se označuje jako syntetická, dochází k replikaci DNA. Poté buňky vstupuje do G<sub>2</sub> fáze, kdy se zdvojují jednotlivé organely a tvoří se struktury zajišťující buněčné dělení. V této fázi leží další kontrolní bod buněčného cyklu, kdy je kontrolována správnost replikace DNA. Třetí kontrolní bod se nachází v mitotické fázi, kdy je kontrolováno správné přichycení chromozomů k dělicímu vřeténku (mezi metafází a anafází)

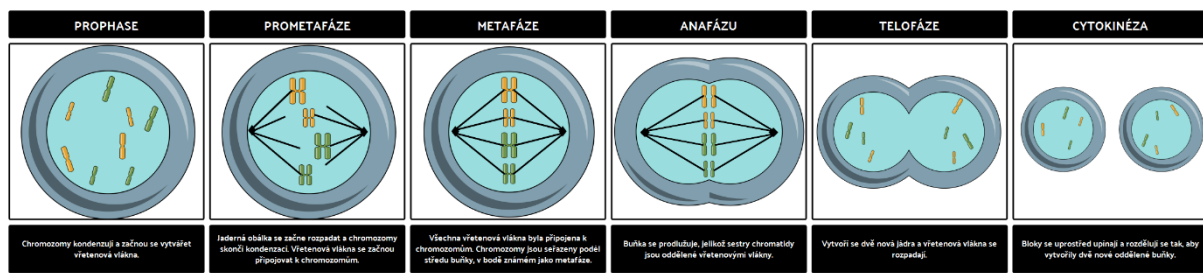
Některé buňky mohou ztratit schopnost dělení jako např. diferencované buňky. Tyto buňky vstupují do tzv. G<sub>0</sub> fáze. Po proběhnutí mitózy buňky mohou vstoupit do klidové G<sub>0</sub> fáze, která může být trvalá (jako např. u nervových buněk, které již nemají schopnost se dělit) nebo dočasná (např. u jaterních buněk, které se obnovují přibližně jednou za rok).

### 3.2. Buněčné dělení

Buněčné dělení se skládá z mitózy (dělení buněčného jádra) a cytokineze (dělení buňky). Mikroskopicky viditelná známka buněčného dělení je kondenzace chromozomů, která nastává na konci G2 fáze. V buňce se nachází 2 kopie každého chromozomu, které byly syntetizovány během S fáze. Každý chromozom je tvořen dvěma sesterskými chromatidami. Během mitózy pak dojde k rozštěpení těchto chromatid, které jsou mitotickým vřetenkem taženy k opačným pólům buňky. Samotný průběh mitózy lze dělit do 5ti fází (viz obr. 8):

- 1) Profáze – Během profáze dochází ke kondenzaci zreplikovaných chromozomů, ke vzniku mitotického vřetenka mezi dvěma centrozomy tvořeného mikrotubuly.
- 2) Prometafáze – Prometafáze začíná rozpadem jaderného obalu, což umožní navázání chromozomů na mitotické vřetenko.
- 3) Metafáze – Chromozomy jsou během metafáze seřazeny v ekvatoriální rovině mezi póly dělicího vřetenka.
- 4) Anafáze – Během anafáze dochází k oddálení sesterských chromatid k opačným pólům buňky pomocí zkracování kinetochorových mikrotubulů.
- 5) Telofáze – V konečné telofázi jsou již dceřinné chromozomy u pólů vřetenka, tvoří se nový jaderný obal. Začíná se tvořit kontraktilní prsteneček.

Závěrečná fáze buněčného dělení je ukončena cytokinezí, kdy dojde k rozdělení buněk kontraktilním prstencem aktinových a myozinových vláken. Kontraktilní prsteneček se stáhne a vzniknou dvě dceřinné buňky s jedním jádrem. Podobně dojde i k rozdělení organel mezi nově vzniklé buňky.



Obr. 8: Schéma buněčného dělení: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze, cytokineze.

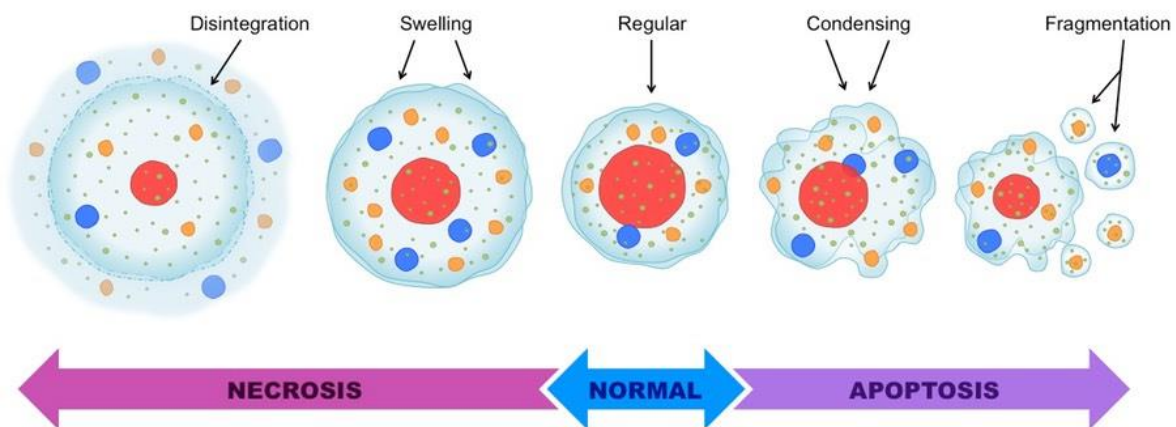
Většina buněk se dělí prostřednictvím mitózy, výsledkem jsou 2 buňky s se stejným počtem chromozomů. Zárodečné buňky (gamety - spermie a vajíčka) se dělí tzv. redukčním dělením = meiózou, které vede ke vzniku 4 buněk s poloviční sadou chromozomů (haploidní buňky). Jedná se o 2 následná dělení. Během prvního dělení dochází párování homologních chromozomů a k jejich křížení (crossing-over). Druhé dělení pak probíhá velmi podobně mitotickému dělení.

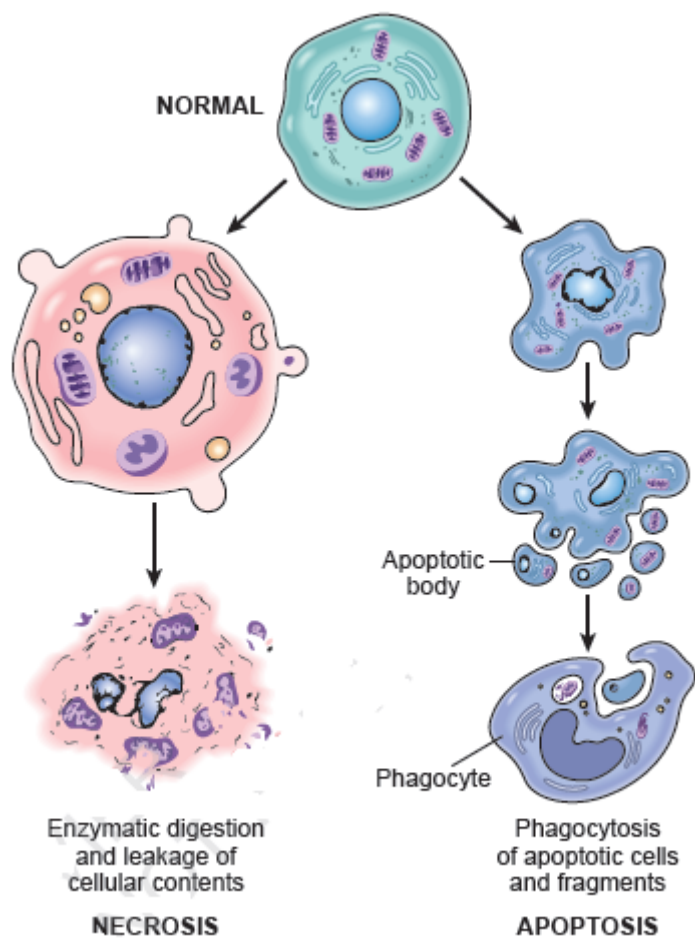
### 3.3. Buněčná smrt

Normální živočišné buňky mají omezený počet dělení, kterým můžou projít. Například myší fibroblasty se mohou v kultuře dělit přibližně 40x, poté vstupují do klidového stadia, tzv. senescence. Existují i tzv. immortalizované buněčné linie, které je možné *in vitro* kultivovat po neomezeně dlouhou dobu, jedná se většinou o buňky nádorové.

Rozlišují se 2 typy buněčné smrti – programovaná buněčná smrt = apoptóza a náhodná buněčná smrt = nekróza (viz obr. 9). **Apoptóza** je plně regulovaný fyziologický proces. Probíhá např. při vývoji organismu (odstranění tkáně mezi prsty během embryogeneze, odstranění nadbytečných neuronů při utváření synapsí v mozku), při ochraně organismu (likvidace buněk infikovaných virem, nádorově transformované buňky). Morfololgicky lze u buněk procházejících apoptózou sledovat smrštění buňky, tvorbu váčkovitých výběžků cytoplazmatické membrány a změnu její struktury, rozpad buňky na tzv. apoptotická tělíska, která jsou poté fagocytována okolními buňkami. Během těchto změn je stále uzavřen obsah buňky a nedochází k vylití jejího obsahu.

Nekróza označuje patologickou smrt buněk, je doprovázena vznikem zánětlivé reakce. Morfologicky se projevuje jako zduření buňky, která následně praskne a dojde k vylití jejího obsahu.





Obr. 9: Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou.

**Použitá a doporučená literatura:**

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-2-0

Nečas O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3

Institut Galenus [online], 2023 [cit. 2023-10-26]. Dostupné z: <https://www.galenus.cz/clanky/biochemie>

## 4. Buněčné kultury

Jana Horáková

*Důležité pojmy: buněčné kultury primární / sekundární, suspenzní / adherentní, kmenové / diferencované, podmínky kultivace buněk in vitro, složení kompletního média, sérum, růstová křivka buněk, pasážování buněk, trypsin, počítání buněk, Burkerova komůrka, trypanová modř, zamražení buněk*

Buněčné kultury se začaly rutinně používat v laboratořích až od 50. let 20. století. Myšlenka kultivace buněk v *in vitro* podmínkách vznikla už v 19. století, k jejímu využití však došlo až později. Jedním z průkopníků kultivace buněk *in vitro* byl **Wilhelm Roux**, který kultivoval kuřecí embryonální buňky v solném roztoku mimo tělo (1885). Problémem však byla dlouhodobá kultivace díky časté kontaminaci. Dalším významným vědcem, který přispěl k rutinní kultivaci buněk byl **Alexis Carrel**, francouzský lékař a laureát Nobelovy ceny (1912 NC za fyziologii a medicínu za práce týkající se sešívání cév a transplantace). Carrel svými experimenty prokázal, že je možné udržet orgány či tkáně naživu i po vyjmutí z organismu. Pro zajištění kultivace buněk *in vitro* je nutné zajistit optimální složení kultivačního média. Roku 1959 **Harry Eagle** publikoval práci popisující přesné složení syntetického média používaného pro kultivaci buněk. Do té doby se používala nedefinovaná média z krevní plazmy, z extraktů hovězích embryí, která se lišila svým složením. Eaglovo médium se používá dodnes, je známé pod zkratkou MEM (Minimal Essential Medium), případně DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium). Dříve se věřilo, že je možné kultivovat buňky po neomezeně dlouhou dobu. Tento fakt vyvrátili vědci **Leonard Hayflick a Paul Moorhead** (1961), kteří prokázali, že fibroblasty v tkáňové kultuře je možné kultivovat pouze po určitý počet pasáží. Tento jev je známý jako tzv. Hayflickův limit. Tento fakt neplatí pro všechny buněčné kultury, např. nádorové linie je možné kultivovat po neomezeně dlouhou dobu. Jako příklad lze uvést buněčnou linii HeLa buněk, které byly získány od pacientky **Henrietty Lacks** v roce 1951 a od té doby jsou používány rutinně v mnoha laboratořích.

### 4.1. Dělení buněčných kultur

Buněčné kultury lze dělit z několika hledisek viz Tabulka 1.

*Tabulka 1: Rozdělení buněčných kultur podle jejich zdroje, způsobu růstu v in vitro podmínkách a stupně diferenciaci.*

Hledisko dělení	Zdroj buněk	Způsob růstu v buněčných kulturách	Stupeň diferenciaci
Označení buněčného typu	Primární / sekundární buňky	Adherentní / suspenzní buňky	Kmenové / terminálně diferencované buňky

Jedním aspektem je rozdělení na primární a sekundární buňky. **Primární buňky** jsou získávány přímo z tkání po jejich izolaci. V laboratorních podmínkách pak dojde k množení buněk, jejich

naředení a přenosu do nových kultivačních nádob (proces pasážování), tyto buněčné linie se nazývají **sekundární buněčné kultury**. Primární buňky jsou mnohem citlivější, jsou dostupné pouze v omezeném počtu, mají omezenou životnost (několik dní). Pro rutinní testování se proto využívají spíše sekundární buněčné kultury. Primární buňky lze izolovat nejčastěji dvěma způsoby. Jedním z nich je tzv. explantační metoda, kdy se umístí tkáň do kultivační nádoby a buňky postupně vyrůstají na dno kultivační nádoby. Častěji je však nutné tkáň narušit mechanicky a enzymaticky (působením kolagenázy a dalších proteáz, např. trypsinu) a poté izolovat buňky. Tkáně jsou obvykle složeny z více buněčných typů, proto je po izolaci buněk nutná selekce vybraných buněčných typů. Existují nejrůznější přístupy pro identifikaci a selekci buněčných typů, principy těchto metod jsou nad rámec této kapitoly. Nejjednodušším způsobem pořízení buněčné linie je zakoupení v buněčných sbírkách, k nejrozšířenějším patří The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) a American Type Cell Collection (ATCC).

Další možné hledisko dělení buněčných kultur je podle způsobu růstu v kultuře. Rozlišují se **buňky adherentní**, které rostou pevně přichycené k podkladu a **buňky suspenzní**, které se volně vznášejí v médiu. Mezi suspenzní buňky patří krevní buňky, které se i v organismu nacházejí volně v krevním řečišti. V oboru tkáňového inženýrství jsou nejčastěji využívány makrofágy pro studium imunitní reakce a další krevní buňky pro testování hemokompatibility viz následující kapitola 5. Krevní buňky a jejich využití v tkáňovém inženýrství. U suspenzních buněčných kultur musí být zajištěno jejich stálé promíchávání, aby nedocházelo k přisednutí buněk k podkladu. Suspenzní buňky se tedy kultivují nejčastěji na kývací míchačce, v rotačních válcovitých nádobách nebo ve speciálních zařízeních obsahujících míchadlo. Další možný přístup zabránění adheze suspenzních buněk na povrch kultivačních nádob je potažení jejich povrchu antiadhezivní látkou, k tomu účelu se využívá např. agaróza, která je příliš hydrofilní a neumožňuje buňkám adherovat k povrchu. Většina buněk v organismu patří mezi adherentní buňky, které vyžadují pevné přichycení k podkladu. V organismu je toto spojení zajišťováno přítomností mezibuněčné hmoty. V podmínkách *in vitro* buňky adherují na dna kultivačních nádob, která jsou pro tyto účely speciálně upravena. Kultivační lahvičky jsou vyráběny z povrchově upraveného polystyrenu, jejichž povrch je mírně hydrofilní, což zlepšuje buněčnou adhezi. Pro některé buňky je potřeba zajistit přítomnost adhezních bílkovin, proto je možné povrch kultivačních nádob potahovat např. fibronectinem, lamininem, kolagenem či želatinou.

Dalším aspektem je rozdělení buněk podle jejich stupně diferenciaci. **Kmenové buňky** jsou nediferencované buňky, které mají schopnost se dělit (=proliferace) a zachovat tak svůj potenciál kmenové buňky a zároveň se mohou přeměnit v jiný buněčný typ (=diferenciaci). Díky těmto vlastnostem jsou podstatou regenerativní medicíny, která využívá jejich potenciál pro léčbu závažných onemocnění jako např. diabetes mellitus I. typu, onemocnění nervové soustavy (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), obnova pohybového aparátu apod. Kmenové buňky se dále dělí na embryonální a dospělé. Embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells ESC) mají schopnost diferenciaci v jakoukoliv jinou specializovanou buňku. Tato vlastnost se nazývá pluripotence. Embryonální kmenové buňky zajišťují vývoj jednotlivých orgánů. Jsou považovány za ideální zdroj pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu, problém však bývá s etickými otázkami a s jejich zdrojem. Dospělé kmenové buňky



(adult stem cells) se vyskytují převážně v kostní dřeni, dále v tukové tkáni a v periferní krvi. V dospělosti zajišťují kmenové buňky regeneraci poraněných tkání a orgánů. Jejich schopnost diferenciací je na rozdíl od embryonálních kmenových buněk omezená. Během života je absolutní množství kmenových buněk v organismu konstantní díky jejich sebeobnově. Dospělé kmenové buňky se mohou přeměnit pouze v určité buněčné typy, jsou tzv. multipotentní. Jako příklad lze uvést mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells MSC) nacházející se v kostní dřeni, v pupečnickové šňůře, pupečnickové krvi a v tukové tkáni. Tyto kmenové buňky jsou také významně využívány v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně pro svou schopnost diferenciací v buňky kostní (osteocyty), buňky chrupavky (chondrocyty), tukové tkáně (adipocyty), svalové tkáně (myocyty), srdeční tkáně (kardiomyocyty) či nervové tkáně (gliové buňky). Speciálním typem mezenchymálních kmenových buněk jsou buňky izolované z tukové tkáně (adipose derived stem cells ADSC), které získávají na významnosti v posledních letech díky své dostupnosti. Zdrojem těchto buněk je tuková tkáň odsátá během liposukce. Výhodou použití těchto buněk je velká výtěžnost v porovnání s ostatními zdroji mezenchymálních kmenových buněk. Dále se v dospělém organismu nachází tzv. unipotentní kmenové buňky označované také jako progenitorové buňky, které mohou diferencovat pouze v jeden určitý buněčný typ, mají však stále schopnost sebeobnovy. Mimo kmenové buňky se v organismu vyskytují terminálně diferencované buňky, které vykonávají specializované funkce a mají omezenou schopnost dělení.

#### 4.2. Kultivace buněk v prostředí *in vitro*

Udržování buněk v laboratorním prostředí mimo jejich přirozený výskyt vyžaduje speciální zacházení. Kultivace buněk probíhá ve speciálně vybavených laboratořích, kde musí být zajištěno čisté prostředí, aby nedocházelo ke kontaminaci buněčných kultur. S technikami aseptické práce stejně jako s vybavením laboratoře buněčných kultur budou studenti seznámeni v průběhu praktických cvičení.

Pro správný růst buněk je nutné zajistit **optimální kultivační podmínky**. Laboratorní podmínky se snaží simulovat přirozené tělní prostředí. Optimální teplota kultivace je nastavena na 37°C, udržuje se pomocí inkubátoru, do kterého se buňky v kultivačních lahvíčkách ukládají. Atmosféra inkubátoru je obohacena o oxid uhličitý (5%), který opět napodobuje prostředí mezibuněčné tekutiny, podílí se na udržení pH médií obsahujících bikarbonátový pufr. Dále se v CO<sub>2</sub> inkubátoru udržuje vysoká relativní vlhkost, aby nedocházelo k odpařování média během kultivace. Buněčné kultury v inkubátoru musí být ve sterilním prostředí, proto je nutné udržovat jeho čistotu pravidelnou údržbou a sterilizací povrchů.

Dalším velmi důležitým parametrem pro buněčnou kultivaci je **složení média**. Kultivační médium musí zajistit dostatečnou výživu buněk, obvykle se mění dle potřeby (cca 2x-3x týdně). U adherentních buněk tvoří médium tenkou vrstvu kapaliny nad buňkami, takže je zajištěna optimální difuze plynů (O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>). Složení kultivačního média je velmi komplexní, obsahuje až desítky složek. Každý typ buněk vyžaduje přítomnost specifických *živin a růstových faktorů*, které je možné do komerčně dostupných médií přidávat jednotlivě. Kultivační médium obsahuje anorganické soli, pufr pro udržení pH, glukozu, vitaminy, bílkoviny, peptidy a aminokyseliny, růstové faktory, mastné kyseliny, lipidy a stopové prvky.

*Anorganické soli* jsou nezbytné pro fyziologické funkce buněk, podílejí se na udržení osmotického tlaku média a mají podíl na udržování pH (uhličitan, fosfát). Nejzákladnější ionty vyskytující se v médiích jsou  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ . Další součástí základního média jsou *organické pufr*y, které se také podílí na udržení stálého pH. Během kultivace buněk je udržováno pH 7,4 stejně jako v organismu. Hodnota pH je velmi důležitá pro kultivaci buněk, proto se do média přidává také *acidobazický indikátor* – fenolová červeň. Při správném pH má médium jasně červenou barvu. Během kultivace buňky produkují kyselé odpadní látky, které okyselují médium. To se přítomností indikátoru mění nejprve při pH 7,0 na oranžovou, později až na žlutou při hodnotě pH 6,5. Při posunu do zásadité oblasti pH na 7,8 (může být způsobeno např. vlivem stárnutí média) se médium mění do fialova.

Kultivační médium musí zajistit *zdroje energie* pro buňky ve formě jednoduchých sacharidů, nejčastěji glukózy, případně galaktozy či fruktozy. Dále se jako zdroj energie využívá L-glutamin (neesenční aminokyselina).

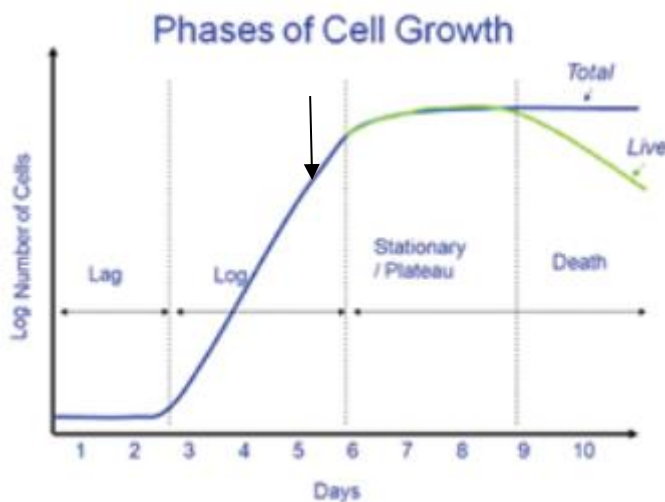
Médium určené pro přímou kultivaci je nutné připravovat vždy čerstvé, aby všechny složky byly aktivní. Stabilita kompletního média se pohybuje v řádu dnů až týdnů (maximální doba použitelnosti bývá 1 měsíc). Kultivační médium se obvykle připravuje ze 3 složek: **médium** (MEM, DMEM), **sérum a antibiotika**. Sérum je zdrojem biologicky aktivních látek jako např. růstových faktorů, adhezních bílkovin, inhibitorů proteáz jako např. antitrypsinu. Přítomnost bílkovin v séru zajišťuje mechanickou ochranu buněk v kultuře. Dále může obsahovat stopové prvky (Zn, Se, Cu, Mn), vitaminy, hormony, lipidy, sacharidy. Sérum obvykle tvoří 5-10% kultivačního média, dodává celý komplex látek důležitých pro kultivaci. Nejčastěji se pro kultivaci buněk využívá fetální bovinní sérum (FBS), které má vysoký obsah růstových faktorů a nízkou hladinu protilátek. Jeho hlavní bílkovinnou složkou je bovinní sérový albumin (BSA). Hlavním problémem s přidáním séra do médií je jeho nedefinované složení, které se liší s každou šarží. Jako každý biologický materiál je zde riziko variability složení, které může kultivaci buněk ovlivnit. Proto jsou dostupná i tzv. bezsérová, plně definovaná média, v rutinní praxi však zatím nejsou plošně využívána díky finanční a uživatelské náročnosti. Existují i další možnosti obohacení kultivačního média o růstové faktory jako např. pomocí lyzátů krevních destiček.

Pro ochranu před kontaminací buněčných kultur se do médií mohou přidávat antibiotika (penicilin, streptomycin) a antimykotika (amfotericin B). Je potřeba mít na vědomí, že přítomnost antibiotik může ovlivnit chování buněk, jejich používání pro rutinní kultivaci by mělo být zváženo. Přidávají se do kompletního média v nízké koncentraci (1%).

### 4.3. Růstová křivka buněk

Růst buněk v kultuře charakterizuje tzv. růstová křivka, která je zobrazena na obr. 10. Po nasazení buněk do nové kultivační nádoby nastává tzv. lag fáze, kdy dochází k aklimatizaci buněk v novém prostředí. Počet buněk je poměrně nízký (obvykle se nasazuje cca  $10^4$  buněk / 1 ml), množení buněk je pozastaveno díky nízké koncentraci růstových faktorů, které jsou normálně produkovány buňkami v kultuře. Po fázi adaptace, která trvá obvykle 2 dny, nastává fáze exponenciálního množení buněk, tzv. log fáze. Během této fáze dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu buněk v kultuře, kdy buňky postupně pokrývají povrch

kultivační nádoby a vyčerpávají živiny z média. Během kultivace se buňky mikroskopicky pozorují a sleduje se tzv. konfluence, která vyjadřuje procento povrchu obsazeného buňkami. Při kultivaci buněk je snaha o udržení log fáze. Při hodnotě konfluence okolo 80% je vhodné provést pasážování buněk, při níž se naředěná buněčná kultura přenesse do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem. Pokud by nedošlo ke zpasážování buněčné kultury, v kultivační lahvičce by nastala fáze plató, kdy je dělení buněk pozastaveno z důvodu nedostatku živin a prostoru. Většina buněk má tzv. kontaktní inhibici. Po dosažení 100% konfluence (vytvoření souvislé vrstvy buněk na povrchu kultivační nádoby = monolayer) se buňky vzájemně dotýkají, což je pro ně signál k zastavení proliferace. U některých buněk dojde k zástavě dělení již v momentě, když dojde ke styku buněčných výběžků. Pokud ani v této fázi nedojde k naředění buněk, nastává fáze odumírání buněk.



Obr. 10: Růstová křivka buněk v buněčné kultuře: lag fáze (1), log fáze (exponenciální, 2), plató fáze (3), fáze odumírání (4). Šipka značí doporučený čas pasážování.

#### 4.4. Pasážování buněk

Proces pasážování buněk (subkultivace) patří k základním technikám v biologické laboratoři, který se provádí několikrát do týdne. Studenti si přesný postup vyzkouší na praktickém cvičení, budou ho dále používat i při nasazení buněk na testované materiály. Jak již bylo zmíněno, pasážování by se mělo provádět při konfluenci buněk cca 80%, kdy buňky pokrývají většinu povrchu kultivační nádoby. Stupeň konfluence se stanovuje pouze odhadem při pohledu do mikroskopu při každodenní kontrole růstu buněčných kultur. Pasážování se provádí v laminárním boxu za aseptických podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci kultury. Po mikroskopické kontrole je nutná příprava všech laboratorních pomůcek (sterilních pipet, odsávačky, zkumavek) a nahřátí reagensů potřebných k provedení pasážování (trypsin, čerstvé médium). Po pečlivé přípravě se v laminárním boxu odsaje médium z kultivační lahvičky (buňky jsou stále adherované ke dnu) a jemně se povrch opláchne **fosfátovým pufrem** (PBS=phosphate buffered saline). Je nutné pracovat rychle, aby nedošlo k vyschnutí buněk. Oplach pufrem se provádí z důvodu odstranění zbytků média, které obsahuje  $\alpha$ 1-antitrypsin blokuje účinnost enzymu trypsinu, který je použit v následujícím kroku. Po oplachu pufrem je do lahvičky přidáno malé množství **trypsinu** tak, aby pokrýval vrstvu buněk. Trypsin je

proteáza (enzym štěpící proteiny), která způsobí narušení vazeb mezi buňkami a povrchem kultivační nádoby. Účinkuje při 37°C, proto se lahvička s trypsinem vkládá na 1-2 minuty do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Během této krátké doby dojde k oddělení buněk od povrchu kultivační nádoby. Buňky také změni svůj tvar, vzniknou zakulacené buňky, které volně plavou. Pokud je část buněk stále přisedlá ke dnu, je možné podpořit jejich uvolnění od povrchu kultivační nádoby jemným mechanickým poklepem na boční stěnu lahvičky. Trypsinizace se mikroskopicky zkontroluje a proces pasážování pokračuje opět ve sterilním prostředí laminárního boxu. Po proběhnuté trypsinizaci se do lahvičky přidá v nadbytku kompletní médium, které díky obsahu  $\alpha$ 1-antitrypsinu inhibuje přítomný trypsin. Působení trypsinu nesmí být příliš dlouhé, aby nedošlo k poškození buněk. Nařaděná buněčná kultura se rozdělí do nových kultivačních lahviček a přidá se čerstvé médium, aby mohlo pokračovat exponenciální dělení buněk.

Při prvotní práci s novou buněčnou kulturou je nutné počítat buňky a nasadit doporučené množství do nových kultivačních nádob. Jedná se o hodnotu doporučenou dodavatelem, označuje se v angl. jako cell seeding density. Obvykle se pohybuje mezi 10<sup>4</sup> buněk/ 1 ml (fibroblastová buněčná linie) a 10<sup>5</sup> buněk/ 1 ml (epitelové buňky). Po tomto ověření se již buňky při pasážování nepočítají a ředí se ve známém poměru.

#### 4.5. Počítání buněk

Stanovení počtu buněk také patří k základním postupům využívaným v biologické laboratoři. Buňky se počítají např. při začátku experimentu, kdy je nutné nasadit ideální počet buněk na testované materiály tak, aby během doby testování mohlo dojít k adhezi a proliferaci buněk na materiálu. Pokud by se nasadilo příliš málo buněk, nedošlo by díky velkému naředění buněk k adhezi a následné proliferaci a výsledky testu by mohly vést k nesprávným závěrům. Pokud by bylo nasazeno příliš mnoho buněk a testování probíhalo několik dní až týdnů, mohlo by dojít k rychlému prorůstání buňkami následované fází plató a poté fází odumírání buněk viz růstová křivka buněk. Proto je nutné na začátku experimentu spočítat buňky a nasadit správné množství.

Při počítání buněk je nutné pracovat rychle, jedná se tedy spíše o řádové odhady. Buňky se počítají v suspenzi, což pro adherentní buňky není přirozené prostředí. Před počítáním buněk je nutné suspenzi řádně, avšak jemně, promíchat. Poté se buněčná suspenze napipetuje do příslušné počítací komůrky, obvykle postačí velmi malé množství (jednotky  $\mu$ l). Nejzákladnější pomůcka používaná pro počítání buněk je tzv. Bürkerova komůrka. Jedná se o speciální podložní mikroskopické sklíčko, které je tvořeno soustavou čtverců o přesně definovaných rozměrech. Na podložní sklíčko je umístěno krycí sklíčko ve výšce 0,1 mm. Jsou tedy přesně známé objemy nad jednotlivými ohraničenými čtverci a je možné tak spočítat buňky v přesném objemu a pomocí trojčlenky pak určit počet buněk na 1 ml. Práci s Bürkerovou komůrkou si studenti osvojí během praktického cvičení. Další možností určení počtu buněk je využití automatických analyzátorů se speciálními sklíčky, do kterých se kápne buněčná suspenze a přístroj spočítá buňky v suspenzi. Analyzátoři počtu buněk mohou hodnotit i další parametry jako např. velikost buněk apod. Využití jednotlivých technik závisí na zvyklostech a vybavení jednotlivých laboratoří.

Mimo počet buněk je ještě možné rozlišit živé a mrtvé buňky. Během procesu trypsinizace, která je nutná pro uvedení buněk do suspenze, může dojít k poškození určité části buněk. Často

se tedy stanovuje nejen počet buněk, ale zejména počet viabilních (=životaschopných) buněk. K tomuto rozlišení se využívá speciálního barvení, které se přidá k buněčné suspenzi před počítáním buněk. K nejrozšířenějším barvivům patří trypanová modř, která se dostane pouze do neživých buněk s porušenou cytoplazmatickou membránou. Viabilní buňky trypanovou modř nepropustí a jeví se v mikroskopu jako neobarvené kulaté buňky. Mrtvé buňky jsou v mikroskopu zbarveny do tmavě modré. Trypanová modř se přidává do buněčné suspenze v poměru 1:1, toto zředění buněčné suspenze je nutné zohlednit při výpočtu koncentrace buněk při použití Bürkerovy komůrky.

#### **4.6. Příklady buněčných kultur**

Pro testování tkáňových nosičů se využívá mnoho buněčných kultur, výběr vždy záleží na specifické aplikaci scaffoldu. Prvotní testy jsou obvykle prováděny na fibroblastových buněčných liniích, s kterými se v laboratorních podmínkách dobře pracuje. Další pokročilé testování se volí dle účelu využití scaffoldu, volí se buňky dané tkáně, která má být materiálem obnovena. V následujících odstavcích jsou uvedeny příklady buněčných kultur a jejich vlastnosti.

*3T3 fibroblasty* – jedná se o buněčnou linii myších fibroblastů, jejíž název je odvozen od způsobu kultivace, tzv. 3T3 protokolu. Každý třetí den se buňky pasážovaly a přenášelo se (z angl. „transfer“)  $3 \times 10^5$  buněk do nové kultivační lahvičky. Myší 3T3 fibroblasty patří k adherentním buňkám. Mikroskopicky lze pozorovat buněčné jádro s jadérky a četné výběžky cytoplazmy. Pasážování by mělo probíhat alespoň dvakrát do týdne, násada buněk by se měla pohybovat kolem  $3-5 \times 10^3$  buněk /  $\text{cm}^2$  kultivační nádoby (kultivační lahvička, Petriho miska) nebo testovaného materiálu.

*L929* – také patří mezi adherentní fibroblastovou buněčnou linii izolovanou z myši. Tato linie je doporučována normou CSN EN ISO 10993 pro testování biologické bezpečnosti zdravotnických prostředků.

*MG-63 osteoblasty* – Osteoblasty pochází z lidské kosti, jedná se o nádorovou buněčnou linii (buňky jsou izolovány z osteosarkomu – kostního nádoru). Morfologicky jsou podobné fibroblastům, kultivace v laboratorních podmínkách probíhá také obdobně.

*HeLa buňky* – Jedná se o buněčnou linii lidských epiteliálních buněk izolovaných z karcinomu děložního hrdla pacientky Henrietty Lacks. Mohou se neomezeně množit v laboratorních podmínkách, jsou využívány v mnoha oblastech výzkumu. Příběh vzniku těchto buněk dokumentuje kniha i stejnojmenný film „Nesmrtelný život Henrietty Lacksové“.

#### **4.7. Uchování a transport buněk**

Namnožené buňky je možné dlouhodobě uchovávat v  $-80^\circ\text{C}$  (měsíce až roky). Také nově zakoupené buněčné linie jsou dodávány zamražené, což je nejbezpečnější forma transportu buněk. Biologické laboratoře proto bývají vybaveny potřebnými zařízeními pro tzv. kryokonzervaci buněk. Jedna z možností uchovávání buněk je umístění do par kapalného dusíku. Další možností je umístění zamražených buněk do hlubokomrazicího boxu, který udržuje potřebnou teplotu.

Zamražení buněk musí probíhat šetrně, aby nedošlo k poškození buněk vznikajícími krystalky ledu. Snižování teploty musí probíhat velmi zvolna a řízeně (ochlazování cca o 1°C / min). K tomu účelu jsou využívány speciální nádoby s otvory na ependorfovy zkumavky se zamraženou buněčnou suspenzí, které se umístí do hlubokomrazicího boxu. Nádoby jsou naplněné nemrznoucím roztokem isopropanolu, který zajišťuje správnou rychlost chlazení. Do buněčné suspenze se pro ochranu buněk přidává větší množství séra (cca 20%) a kryoprotektivum, kterým je nejčastěji dimethylsulfoxid (DMSO).

Rozmražení buněk je naopak nutné provést co nejrychleji. Ependorfova zkumavka se zamraženou buněčnou suspenzí se po vyndání z hlubokomrazicího boxu umístí do vodní lázně nahřáté na 37°C, po rozmražení se její obsah přenesou do nadbytku kompletního média v kultivační lahvičce. Po adhezi buněk na povrch lahvičky (cca 1-4 hodiny) se vymění médium, aby došlo k odstranění kryoprotektiva, které je pro buňky toxické. Případně se buňky po rozmražení zcentrifugují a přenesou do čerstvého nahřátého média.

Zamražení buněk umožňuje plánování experimentů (rozmražení buněk dle potřeby). Před experimentem by buňky měly být alespoň jednou zpasažovány, aby došlo ke stabilizaci buněčné kultury. Také je díky kryoprezervaci možné vytvářet si zásoby buněk – z jedné ependorfovy zkumavky buněk je možné namnožit několik zkumavek „zásobních“. Po rozmražení nové buněčné linie je nutné sledovat číslo pasáže (kolikrát byly buňky zpasažovány), některé buněčné linie mají pouze omezený počet pasáží, kdy si zachovávají své vlastnosti a mohou být pro testování využívány.

#### **4.8. Kontaminace buněčných kultur**

Při práci v laboratoři buněčných kultur je velmi důležité dodržovat zásady aseptické práce, aby nedošlo ke kontaminaci. Kontaminace je způsobena mikroorganismy, které se množí rychleji než eukaryotické buňky. Nejčastěji dochází ke kontaminaci bakteriálními kmeny, které jsou přítomny v okolním prostředí. Jako ochrana před bakteriální kontaminací se proto přidávají antibiotika do kompletního média. Bakteriální kontaminace je viditelná při běžné mikroskopické kontrole. Dochází k rychlému vyčerpání živin média, médium rychle žloutne. Při větším zvětšení (400x) lze pozorovat bakterie pohybuující se v médiu. Dále může dojít ke kontaminaci kvasinkami a plísněmi, tato kontaminace je patrná i makroskopicky. Virová kontaminace buněčných kultur je poměrně vzácná a těžko se detekuje.

Pokud dojde ke kontaminaci buněčné kultury, je zapotřebí provést několik opatření. Infikovanou kulturu je nutné zlikvidovat, stejně tak jako používané médium a další roztoky, které mohly být zdrojem kontaminace. Dále je zapotřebí provést důkladnou sterilizaci a dezinfekci celé laboratoře. Po důkladném vyčištění lze obnovit buněčnou kulturu ze zmražené zálohy, připravit čerstvé roztoky a kultivační médium. Výskyt kontaminace v laboratoři je velkým problémem, proto je skutečně zapotřebí věnovat pozornost správné laboratorní praxi v čistých prostorech.

**Použitá a doporučená literatura:**

Vejražka M. *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami*. Praha, 2004

Šebek J. *Buněčné kultury v medicíně*. Praha: Galén, 2018. ISBN: 978-80-7492-380-7

Freshney R.I. (ed.) *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2nd Ed., Oxford: University Press, 1992. ISBN 0-19-963213-8

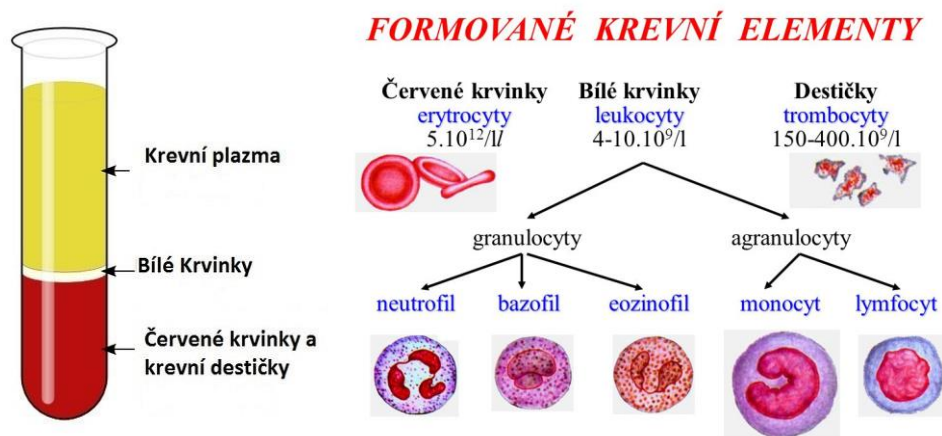
## 5. Krevní buňky a jejich využití v tkáňovém inženýrství

Jana Horáková

*Důležité pojmy: krevní plazma, sérum, červené krvinky, bílé krvinky, neutrofilní granulocyty, lymfocyty, monocyty, makrofágy, krevní destičky, hemokompatibilita*

Krevní buňky patří mezi tzv. suspenzní buňky, jelikož se přirozeně vyskytují jako pevná část krve. Krev je tvořena suspenzí krevních elementů (45% objemu krve - červených a bílých krvinek, krevních destiček) v krevní plazmě (55% objemu krve), jak je zobrazeno na obr. 11A. Fyziologické pH krve je 7,40, je udržováno na konstantní hodnotě ( $\pm 0,04$ ) pufracími systémy.

Pro tkáňové inženýrství jsou velmi důležité znalosti o krvi, resp. o interakci mezi krví a implantovaným materiálem. U materiálů určených pro implantaci do těla pacienta vždy dochází k interakci s krví, proto je důležité znát a předpovědět toto chování. Biomateriály musí být tzv. hemokompatibilní. K tomuto účelu slouží laboratorní testy, které budou nastíněny v závěru této kapitoly.



Obr. 11: Složení krve (krevní plazma + krevní elementy a jejich poměrné zastoupení v krvi, A), rozdělení krevních buněk (B).

### 5.1. Krevní plazma

Krevní plazma je nažloutlá tekutina tvořená převážně vodou (>90%). Dále obsahuje anorganické látky (cca 1% - Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a organické látky (cca 8% - bílkoviny – albumin, fibrinogen<sup>3</sup>, antitrypsin, imunoglobuliny; glukóza, aminokyseliny, lipidy, močovina, cholesterol). Z plazmy lze připravit sérum, které má využití např. při *in vitro* pěstování buněk. Sérum vzniká centrifugací krve, ve které proběhlo krevní srážení

<sup>3</sup> Fibrinogen – plazmatický protein účastnící se srážení krve (=koagulační faktor I). Působením trombinu (koagulačního faktoru II) je fibrinogen štěpen za vzniku fibrinu, který tvoří síť vláken během srážení krve.



(=hemokoagulace<sup>4</sup>), neobsahuje tedy fibrinogen a koagulační faktory. Pro pěstování buněčných kultur je hojně využíváno tzv. fetální bovinní sérum (FBS).

Pro tkáňové inženýrství jsou zajímavé proteiny krevní plazmy, resp. jejich interakce s povrchem scaffoldu. Jejich navázání pak předurčuje adhezi buněk. Pokud se naváží na povrch scaffoldu vazebné proteiny ve správné konformaci (laminin, fibronectin, vitronektin), dochází následně k adhezi buněk. Může ale nastat situace, kdy se na povrch tkáňového nosiče naváží tzv. nevazebné proteiny jako např. albumin a poté k adhezi buněk nedochází. Je možné testovat *in vitro* interakci scaffoldu s krevní plazmou a stanovovat navázané proteiny. Jedná se však o techniky vyžadující speciální laboratorní vybavení, proto bývá mnohdy jednodušší testovat přímo interakci s buněčnými liniemi.

## 5.2. Červené krvinky

Červené krvinky (erytrocyty) jsou bezjaderné elementy obsahující červené krevní barvivo hemoglobin. V krvi jsou zastoupeny v nejhojnějším počtu (cca  $5 \times 10^{12}$ / l krve) Nejedná se o buňky v pravém slova smyslu, jelikož neobsahují jádro ani některé orgány. Erytrocyty neobsahují mitochondrie, proto jsou závislé na příjmu glukózy pro zajištění metabolismu. Jejich plazmatická membrána je velmi elastická, červené krvinky prochází volně i nejtenčími kapilárami. Na povrchu membrány je tzv. glykokalyx, jehož složení určuje krevní skupinu jedince.

Jejich hlavní funkce je přenos dýchacích plynů ( $O_2$ ,  $CO_2$ ). Mají bikonkávní tvar, jejich velikost se pohybuje kolem 7,5  $\mu m$ . Krevní buňky jsou neustále obnovovány, životnost erytrocytů v periferní krvi je cca 120 dní. Tvoří se v dospělosti v kostní dřeni, odbourávají jsou převážně ve slezině.

## 5.3. Bílé krvinky

Bílé krvinky (leukocyty) se významně podílejí na imunitní odezvě organismu. Jejich zastoupení v krvi je asi o 3 řády nižší než počet červených krvinek ( $4-9 \times 10^9$ / l krve), z celkového objemu krve zaujímají asi 1 % (viz obrázek 11A). Jedná se o buňky obsahující jádro. Jejich velikost je různorodá, pohybuje v řádech jednotek až desítek mikrometrů. Podle přítomnosti granulí v cytoplazmě (vnitrobuněčné váčky ohraničené membránou) se dělí na tzv. granulocyty a agranulocyty.

**Granulocyty** obsahují v cytoplazmě specifická granula, vyznačují se členěným jádrem na několik segmentů, bývají proto označovány jako polymorfonukleární leukocyty. Granulocyty jsou dále děleny podle barvitelnosti granulí na neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty.

*Neutrofilní granulocyty* jsou nejhojněji zastoupené leukocyty, tvoří asi 60-70 % bílých krvinek v organismu. Mají velký význam v protiinfekční imunitě, podílejí se na akutní fázi zánětlivé odpovědi. Členěné jádro neutrofilu je tvořeno 2-5 segmenty. Granula jsou při běžném barvení jemná, světle růžová. Tvoří se v kostní dřeni, kde se nachází zásobárna těchto buněk (>90 %

---

<sup>4</sup> Hemokoagulace – soubor dějů vedoucí k zástavě krvácení díky vytvoření fibrinové sítě, ve které se zachytávají krevní elementy a vytvoří se tzv. trombus (=krevní sraženina). Jedná se o kaskádovité děje řízené aktivací tzv. koagulačních faktorů.

neutrofilů). Pouze část z celkového počtu neutrofilů se vyskytuje v periferní krvi. Při aktivaci imunitního systému pomocí cytokinů a chemokinů dochází k přesunu neutrofilů do místa zánětu. Přestup z cévního řečiště do tkáně nastává v kapilárách procesem tzv. diapedézy (prostoupení mezi endoteliálními buňkami). Životnost neutrofilu je krátká, cca 6-12 hodin v krevním oběhu a 4-5 dní ve tkáni. Neutrofily jsou jedny z prvních buněk účastnící se imunitní odpovědi organismu. Jsou schopné fagocytózy (pohlcení cizorodých částic), degranulace (vylití obsahu granulí do extracelulárního prostoru) a produkce dalších cytokinů regulujících zánětlivou odpověď.

*Eosinofilní granulocyty* obsahují dvoulobózní jádro a specifická granul barví se do tmavě růžova. Tvoří asi 1-3 % leukocytů v organismu, jejich životnost v periferní krvi je 8-12 hodin. Jejich hlavní funkcí je ochrana před parazitárními infekcemi a účast na alergických reakcích.

*Bazofilní granulocyty* obsahují obvykle dvoulobózní jádro, které však bývá při běžném barvení skryto specifickými granulemi barvícími se do tmavě fialova. V krvi cirkulují po dobu 2-3 dnů. Jejich zastoupení nejmenší ze všech bílých krvinek (< 1 %). Podílejí se na alergických reakcích, jejich degranulací dojde k uvolnění látek (histaminu), které vedou k charakteristickým projevům alergií.

**Agranulocyty** neobsahují v cytoplazmě specifická granula, dělí se na lymfocyty a monocyty.

*Lymfocyty* jsou kulaté buňky s jedním jádrem, které vyplňuje většinu objemu buňky. Tvoří 24-40% všech leukocytů v periferní krvi. Lymfocyty mají schopnost cirkulace mezi krví a tkáněmi. Zajišťují tzv. specifickou imunitu, což znamená, že mohou reagovat na antigeny, se kterými se již organismus setkal. Přežívají v organismu po dlouhou dobu (roky). Rozlišují se 3 typy lymfocytů – B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky. *B-lymfocyty* jsou zodpovědné za imunitu zprostředkovanou protilátkami, tvoří asi 15 % lymfocytů v periferní krvi. B-lymfocyt je schopen rozpoznat antigen, začít se množit a vytvářet tzv. *plazmatické buňky*, které produkují protilátky namířené přímo proti danému antigenu. B-lymfocyty mají velký význam pro imunitní paměť, čehož se využívá i pro očkování. *T-lymfocyty* zajišťují specifickou buněčnou imunitu zejména proti nádorovým buňkám a buňkám napadeným virem. *NK buňky* (z angl. natural killers) se podílí na nespecifické imunitě, jsou schopné indukovat apoptózu v cílových buňkách, které rozpoznají jako nebezpečné pro organismus.

*Monocyty* jsou velké buňky s jedním jádrem, které je nevýrazně zbarveno. Tvoří asi 3-8 % z celkového počtu leukocytů. Jejich životnost v krevním řečišti je asi 8 hodin, poté vstupují do tkáně, kde se mění na efektorové buňky, tzv. makrofágy. *Makrofágy* jsou větší než monocyty, obsahují větší množství lysozomů a povrchových receptorů. Makrofágy zajišťují fagocytózu poškozených či „nebezpečných“ buněk, produkci cytokinů a tzv. prezentaci antigenu. Makrofág na svém povrchu „prezentuje“ krátké peptidy pohlcených částic dalším složkám imunitního systému (zejména T-lymfocytům). Makrofágy mají obrovský význam při vzniku zánětu v organismu, kde jsou zodpovědné za rychlou nespecifickou reakci. Rozlišují se 2 podtypy makrofágů – tzv. M1 a M2 makrofágy. M1 makrofágy jsou označovány jako prozánětlivé, produkují cytokiny zesilující zánětlivou odpověď. M2 makrofágy jsou označovány jako tzv. regenerační. Po implantaci tkáňových nosičů je proto žádoucí polarizace makrofágů do M2 podtypu, aby byl podpořen remodelační proces tkáně.

#### 5.4. Krevní destičky

Krevní destičky (trombocyty) jsou bezjaderné krevní elementy, které zajišťují zástavu krvácení. Jejich počet v periferní krvi se pohybuje v rozmezí  $150-300 \times 10^9$  v 1 l krve. Trombocyty se tvoří z megakaryocytů v kostní dřeni. Krevní destičky jsou fragmenty cytoplazmy těchto obrovských buněk. Jejich životnost v periferní krvi je 9-12 dní. Jedná se o nejmenší krevní elementy dosahující velikosti cca 2-4  $\mu\text{m}$  v průměru. Nejedná se o pravé buňky, jelikož neobsahují jádro. Obsahují však mitochondrie a četná granula s obsahem růstových faktorů, látek ovlivňujících srážení krve apod.

Růstové faktory vyskytující se v krevních destičkách jsou velmi využívány v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství. Jedná se o směs několika proteinů, které mají vliv na krevní srážení a na proces hojení. Dají se použít jako tzv. plazma bohatá na destičky (PRP platelet rich plasma) nebo ve formě lyzátů krevních destiček (lyofilizát destiček obsahující růstové faktory). Mezi nejvýznamnější růstové faktory nacházející se v krevních destičkách patří destičkový růstový faktor (PDGF platelet derived growth factor), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF vascular endothelial growth factor), fibroblastový růstový faktor (FGF fibroblast growth factor), inzulinu podobný růstový faktor (IGF insulin like growth factor), transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF  $\beta$  transforming growth factor  $\beta$ ), destičkový faktor 4 (PF 4 platelet factor 4), interleukin 8 (IL 8). Kombinací těchto růstových faktorů a cytokinů dochází k ovlivnění buněčné proliferace, angiogeneze, syntézy mezibuněčné hmoty, chemotaxe a celkově na průběhu zánětu.

#### 5.5. Testování hemokompatibility

Testování hemokompatibility se provádí podle normy CSN EN ISO 10993-4 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Výběr zkoušek na interakce s krví, která je rozdělena do několika částí. Materiály mohou ovlivňovat všechny krevní elementy i průběh krevního srážení (hemokoagulaci).

Interakce s červenými krvinkami se testuje tzv. testem hemolýzy. Pokud materiál naruší cytoplazmatickou membránu červených krvinek, dojde k uvolnění krevního barviva – hemoglobinu do roztoku. Červené zbarvení pak indikuje poškození erytrocytů. Test lze provést jednoduše inkubací materiálu ve zředěné plné krvi. Jako kontrola je používán pufr (PBS) a voda. Prostředí pufru nezpůsobuje žádné poničení erytrocytů (0% hemolýza), naopak vodné prostředí vede k narušení membrány červené krvinky a k vylití obsahu hemoglobinu (100% hemolýza). Po hodinové inkubaci je zředěná krev centrifugována a supernatant obsahující uvolněný hemoglobin je měřen pomocí absorbance pro kvantifikaci hemolýzy.

Dále může materiál ovlivňovat krevní srážení (hemokoagulaci). Hemokoagulace spočívá ve vytvoření fibrinové sítě, ve které jsou zachytávány krevní elementy, a vzniká tzv. trombus. Hemokoagulace probíhá celou řadou dějů, které se označují jako koagulační kaskáda, účastní se jí několik koagulačních faktorů. Laboratorně lze měřit krevní srážení pomocí automatických analyzátorů – měří se aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) nebo protrombinový čas (PT). Test materiálu probíhá po inkubaci s plazmou, kdy se měří změna koagulačního času.

Velmi důležitou charakteristikou je tzv. trombogenicita materiálu. Laboratorně lze inkubovat materiál s plazmou bohatou na krevní destičky (PRP) a sledovat množství adherovaných trombocytů (pomocí mikroskopických technik – SEM, měřením jejich metabolické aktivity). Zvýšené množství trombocytů pak signalizuje trombogenicitu materiálu, což je nežádoucí vlastnost, zejména pro materiály určené pro aplikace v kardiovaskulárním systému.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Pecka M. *Přehled laboratorní hematologie*. Praha: Galén, 1995. ISBN 8085824280

Horakova J., Mikes P., Saman A., Svarcova T., Jencova V., Suchy T., Heczkova B., Jakubkova S., Jirousova J., Prochazkova R. Comprehensive assessment of electrospun scaffolds hemocompatibility. *Materials Science and Engineering C* 2018, 82: 330-5. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.011

TECHNICKÉ NORMY ČSN. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků* ČSN EN ISO 10993-4 (855220) Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Výběr zkoušek na interakce s krví, 2017

## 6. Mezibuněčná hmota

Jana Horáková

*Důležité pojmy: fibrilární bílkoviny - kolagen, elastin, adhezni bílkoviny - fibronektin, laminin, amorfni hmota - proteoglykany, glykosaminoglykany*

Mezibuněčná hmota neboli extracelulární matrix (ECM) je materiál, který se nachází hojně mezi buňkami především pojivových tkáních. Nejedná se o pouhý „výplňový materiál“, má nezbytné funkce pro správné fungování organismu. Znalost struktury a funkcí mezibuněčné hmoty je velmi důležitá v oboru tkáňového inženýrství. Jelikož vyvíjené tkáňové nosiče musí co nejlépe napodobovat přirozené prostředí buněk, je nutné znát složení a vlastnosti mezibuněčné hmoty dané tkáně. Zastoupení buněk a mezibuněčné hmoty se v jednotlivých typech tkání velmi liší. Zatímco u pojivových tkání převládá množství mezibuněčné hmoty nad zastoupením buněk, v epitelové tkáni se nachází jen minimum mezibuněčné hmoty. Následující popis extracelulární matrix se týká pojivové tkáně.

Mezibuněčná hmota se skládá ze 3 základních složek: vláknenné proteiny, adhezni bílkoviny a amorfni hmota tvořená proteoglykany. Schéma složení mezibuněčné hmoty a propojení s buňkou je zobrazeno na obr. 12.

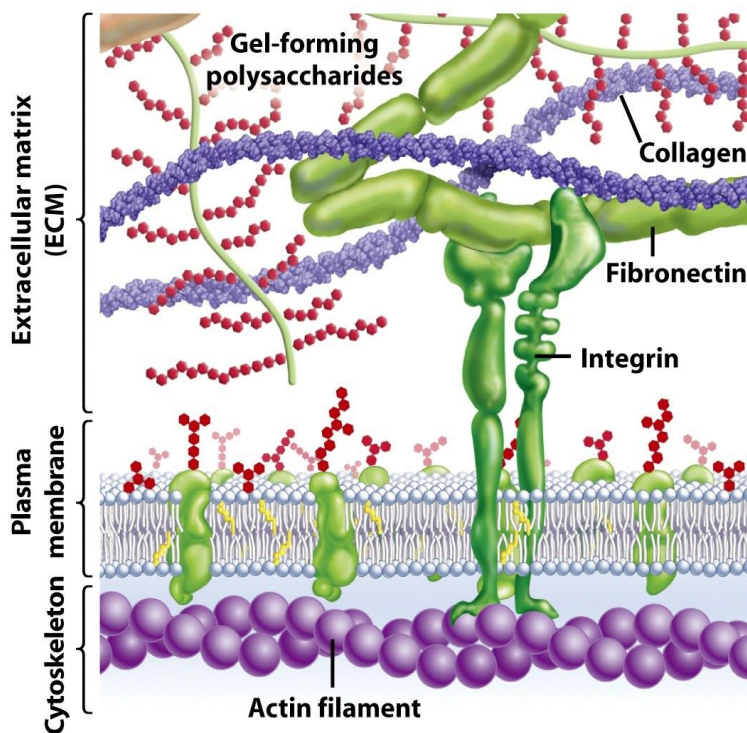


Figure 8-4 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Obr. 12: Schéma interakce buňky a mezibuněčné hmoty přes integrinový receptor v cytoplazmatické membráně buněk a adhezivní bílkovinu fibronektin, která je dále napojena na kolagenová vlákna.

## 6.1. Vlákenné proteiny

Mezi vlákenné (fibrilární) proteiny vyskytující se v mezibuněčné hmotě patří kolagen, elastin a retikulární vlákna. Přítomnost a zastoupení jednotlivých bílkovin určuje mechanické vlastnosti tkáně – kolagen zajišťuje pevnost v tahu, elastin zajišťuje elasticitu tkáně. Retikulární vlákna jsou extrémně tenká vlákna, která tvoří v některých orgánech rozsáhlé sítě. Jsou tvořené převážně kolagenními fibrily typu III. Vlastnosti vlákenných proteinů (kolagenu a elastinu) jsou podrobně popsány v sekci A. Scaffoldy, v kapitole 2. Přírodní materiály pro výrobu tkáňových nosičů.

## 6.2. Adhezní bílkoviny

Další významnou složkou mezibuněčné hmoty jsou adhezní bílkoviny. Jejich úlohou je zajištění spojení mezi fibrilárními bílkovinami (kolagenem) a buňkami, jak je zobrazeno na obr. 12. Mezi zástupce adhezních bílkovin patří *fibronectin* zajišťující toto spojení v pojivové tkáni a *laminin*, který spojuje buňky s mezibuněčnou hmotou v epitelové tkáni. Jedná se o glykoproteiny, které se jednou částí molekuly váží na mezibuněčnou hmotu a druhou částí na integrinové receptory v cytoplazmatické membráně buněk. Adhezní bílkoviny obsahují ve své struktuře aminokyselinové sekvence, které jsou rozpoznávány buněčnými integrinovými receptory. Příkladem může být sekvence 3 aminokyselin arginin-glycin-kyselina asparagová (Arg-Gly-Asp), označovaná jako RGD sekvence. Existují i jiné aminokyselinové sekvence o délce několika jednotek aminokyselin, které mohou být rozpoznány integriny a přes něž dochází k vazbě buněk. Adhezní bílkoviny se vyznačují tím, že ve své struktuře tyto specifické aminokyselinové sekvence obsahují. Integrinové receptory jsou dále uvnitř buňky napojeny na aktinová vlákna cytoskeletu. Tímto spojením je tedy zajištěno propojení a komunikace mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou oběma směry. Informace z okolí buňky (mezibuněčné hmoty) se přes integrinové receptory a aktinová vlákna dostanou až do jádra, kde mohou ovlivňovat buněčné funkce. Adhezní bílkoviny jsou velmi zásadní pro interakci buněk s tkáňovými nosiči. Jejich adsorpce na povrch scaffoldů předurčuje buněčnou adhezi, více je zmíněno v samostatné kapitole Interakce mezi buňkami a biomateriálem.

## 6.3. Proteoglykany

Třetí důležitou složkou extracelulární matrix jsou proteoglykany, které zabraňují stlačování tkáně díky zajištění hydratace. Jejich struktura je zobrazena na obr. 13. Jedná se o obrovské molekuly o molekulové hmotnosti v řádech milionů tvořené jádrovým proteinem, na kterém jsou navázány glykosaminoglykany (GAGs). Glykosaminoglykany jsou tvořené opakujícími se disacharidovými jednotkami. Sacharidová složka tvoří většinu struktury (až 95 %). Glykosaminoglykany jsou silně hydrofilní. Obsahují mnoho negativních nábojů, které přitahují osmoticky aktivní kationty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Proto GAGs zajišťují hydrataci tkáni. Dochází tak ke vzniku botnavého tlaku, který je v rovnováze s napětím kolagenových vláken. Mezi další funkce proteoglykanů patří vazba růstových faktorů a signálních proteinů, které ovlivňují buněčné funkce. Glykosaminoglykany tvoří díky své velké molekulové hmotnosti gely i při velmi nízké koncentraci. Takové prostředí zajišťuje mezibuněčné hmotě regulaci průchodu molekul. Mezi zástupce glykosaminoglykanů patří např. kyselina hyaluronová (více informací viz sekce A. Scaffoldy, Kapitola 2. Přírodní materiály pro výrobu tkáňových nosičů), heparan sulfát, chondroitin sulfát, keratan sulfát, dermatan sulfát.

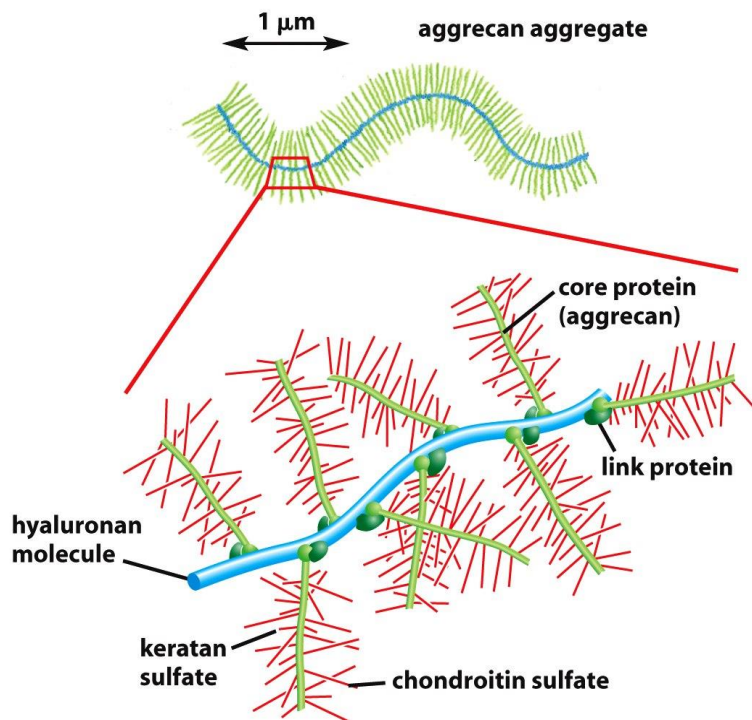


Figure 19-60b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Obr. 13: Uspořádání proteoglykanových agregátů tvořených kyselinou hyaluronovu, jádrovým proteinem a navázanými glykosaminoglykany.

#### 6.4. Funkce mezibuněčné hmoty

Mezibuněčná hmota má tedy unikátní složení, které jí zajišťuje mnoho významných funkcí. Především poskytuje buňkám přirozené prostředí, dochází k přenosu signálů do nitra buněk a v tkáních je tak zaručena ideální buněčná adheze, růst, migrace, diferenciace. Buňky i mezibuněčná hmota jsou velmi dynamické struktury, které se v čase mění v závislosti na okolních podmínkách. Mezibuněčná hmota je produkována buňkami ve formě prekurzorů, které jsou v mimobuněčném prostoru uspořádány do specifické struktury. Mezibuněčná hmota může tedy být označována jako bioaktivní díky přímému propojení s buňkami. Toto spojení je zajišťováno adhezními bílkoviny (fibronektinem, lamininem). V mezibuněčné hmotě se nachází mimo jiné i růstové faktory, které ovlivňují buněčnou proliferaci. Další neméně významná funkce ECM je zajištění mechanických vlastností. Pevnost dodává kolagen, elasticitu elastin, proteoglykany zajišťují odolnost proti stlačení. Uspořádání fibrilárních proteinů ovlivňuje mechanické vlastnosti i uspořádání buněk v tkáních.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-2-0

Nečas O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3

Institut Galenus [online], 2023 [cit. 2023-10-26]. Dostupné z: <https://www.galenus.cz/clanky/biochemie>

Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* 2008, 17 (4): S467-9. DOI: 10.1007/s00586-008-0745-3



## 7. Tkáně

Jana Horáková

*Důležité pojmy: epitelová tkáň, kadheriny, integriny, pojivová tkáň, vazivová tkáň, chrupavčitá tkáň, kostní tkáň, fibroblast, chondrocyt, osteoblast, osteocyt, osteoklast, mineralizace kostní tkáně, svalová tkáň, aktin, myozin, nervová tkáň, neuron, trofická tkáň, tkáňový mok, lymfa*

V předchozích kapitolách byly popsány buňky jako základní stavební kameny živé hmoty a mezibuněčná hmota, která je obklopuje. Soubor morfologicky podobných buněk plnících určitou funkci se specificky uspořádanou mezibuněčnou hmotou se nazývá tkáň. Tkáň má tedy složku buněčnou (obvykle obsahuje více typů buněk) a bezbuněčnou. Studium tkání se zabývá obor histologie. Rozlišujeme 5 základních typů tkání: *epitelová tkáň, pojivová tkáň, svalová tkáň, nervová tkáň a trofická tkáň*. Ve vybraných aplikacích tkáňového inženýrství bude zaměřena pozornost především na náhrady epitelové a pojivové tkáně, proto budou tyto typy tkání zmíněny podrobněji než ostatní.

### 7.1. Epitelová tkáň

Epitelová tkáň je tvořena především buňkami, mezibuněčná hmota se vyskytuje v minimálním množství. Epitel se označuje také jako krycí tkáň, jelikož se nachází na povrchu těla a vystýlá všechny tělní dutiny. Jeho funkce však nespočívá pouze v pasivním krytí, ale může vykonávat také funkci smyslovou, žlázovou (sekrece hormonů, slz), absorpční (výstelka střeva), smyslovou (fotoreceptory oka, vláskové buňky ucha). Epitelová tkáň neobsahuje krevní cévy, výživa tkáně je zajišťována difuzí. Epitelové buňky mohou mít nejrůznější tvar (plochý, kubický, cylindrický), mohou být uspořádány do jedné vrstvy (např. u výstelky střeva) nebo do více vrstev (např. v kůži). Mezibuněčná hmota je zastoupena tzv. bazální laminou, což je tenká vrstva, na které leží buňky. Bazální lamina má tloušťku několik desítek nanometrů (30-100 nm), je viditelná pouze elektronovým mikroskopem. Odděluje epitelovou tkáň od ostatních tkání. Obsahuje kolagen typu IV a glykoprotein laminin, který zajišťuje spojení s buňkami. Buňky epitelové tkáně jsou tzv. polarizovány, lze rozlišit apikální a bazální stranu, která se morfologicky i funkčně liší. Tato polarizace buněk je velmi důležitá pro funkci epitelů. Apikální strana je v kontaktu se vzduchem nebo vodným roztokem, bazální strana nasedá na bazální laminu a zajišťuje kontakt s dalším typem tkáně, obvykle se jedná o pojivovou tkáň, jak je znázorněno na obr. 14.

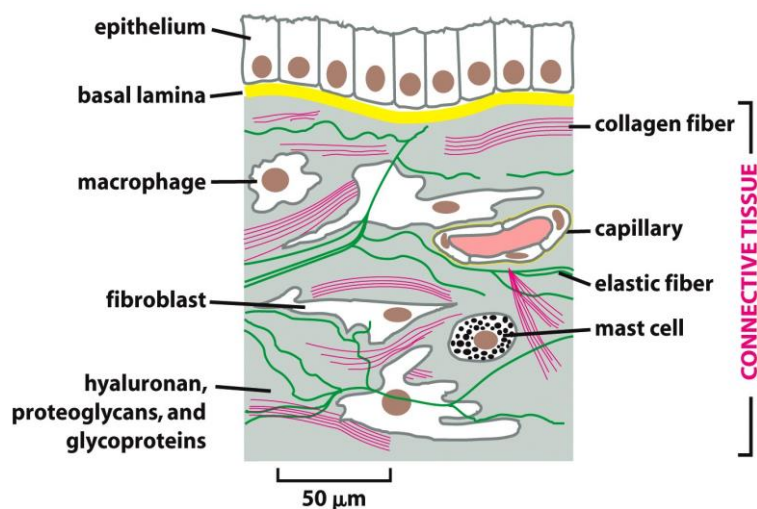
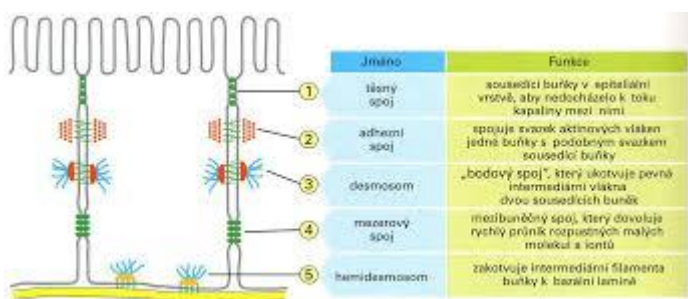


Figure 19-53 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Obr. 14: Schematické znázornění uspořádání epitelové a pojivové tkáně.

### 7.1.1. Mezibuněčné spoje

Buňky v tkáních musí pracovat součinně tak, aby byla zajištěna funkčnost celých tkání. V epitelové tkáni tvoří buňky souvislé vrstvy, proto u nich existuje několik typů buněčných spojů, které jsou shrnuty na obr. 15. Spojení mezi buňkami také zvyšuje odolnost epitelové tkáně. Jedná se o dynamická uskupení, spoje mezi buňkami se mohou vytvářet a zanikat podle aktuálního stavu tkáně. Pouze těsný spoj je charakteristický pro epitelovou tkáň. U ostatních typů tkání se vyskytují modifikované podoby mezibuněčných spojů typu adhezního spoje, hemidesmosomu, mezerového spoje.



Obr. 15: Hlavní typy spojů nacházející se mezi buňkami.

Mezibuněčné spoje zajišťují transmembránové proteiny, tzv. *kadheriny*. Jejich funkčnost je závislá na přítomnosti vápenatých iontů (odtud pochází i jejich název). Skládají se z pěti extracelulárních domén (3 z nich váží  $Ca^{2+}$ ), a jedné intracelulární domény, která je vázána na cytoskelet buňky. Kadheriny patří mezi tzv. homofilní molekuly, což znamená, že se váží na stejnou molekulu v membráně sousední buňky. Zajišťují mechanické (adhezní) spoje a spojení typu desmosom.

Další skupinou transmembránových proteinů zajišťujících spojení buněk jsou *integriny*. Jejich funkce je především pro zajištění spojení mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou, případně její náhradou tvořenou scaffoldy. Integrinové receptory se vyskytují u hemidesmosomů a dále u

tzv. fokálních adhezí, které jsou podrobněji popsány v následující kapitole Interakce mezi buňkami a biomateriálem.

**Těsný spoj** (tight junction, zonula occludens) zajišťuje v epitelových tkáních neprodyšnost. Tato funkce je velmi důležitá v trávicím systému. Těsné spoje se vyskytují např. ve střevě, kde dochází k regulovanému vstřebávání látek. Dále se nachází v žaludku, kde udržují kyselinu chlorovodíkovou na žaludeční sliznici a zabraňují jejímu přestupu do krve a ve slinivce, kde zabraňují pronikání trávicích enzymů do krevního oběhu. Těsné spoje udržují polaritu epitelových buněk tím, že zabraňují difuzi membránových proteinů z apikální do bazální strany a opačně, čímž jsou zachovány rozdílné vlastnosti obou pólů buněk. Těsné spoje vypadají tak, že dojde v určitých místech ke spojení membrán sousedních buněk provazci proteinů. Tímto těsným spojením je zabráněno průtoku kapalin mezi buňkami. Těsné spoje mohou také sloužit k průniku malých iontů a vody mezi buňkami takto spojenými.

**Adhezní spoj** (zonula adherens, pásový desmosom) je tvořen kadheriny, které jsou uvnitř buněk napojeny na svazky aktinových vláken cytoskeletu. V epiteliálních tkáních se často nachází pod zónou těsných spojů, kde mohou vytvářet souvislý adhezní pás. Díky napojení na cytoskelet zajišťují mechanickou oporu.

**Desmosom** (macula adherens) je mezibuněčný spoj zajišťovaný kadheriny napojenými na intermediární filamenta buněčného cytoskeletu. Desmosomy jsou velmi pevné typy spojů, vyskytují se ve střevním epitelu, v kůži.

**Mezerový spoj** (gap junction, vodivý spoj, komunikační spoj) se vyskytuje u většiny tkání. Je charakteristický tím, že mezi interagujícími plazmatickými membránami dvou sousedních buněk jsou vytvořeny kanálky o šířce 2-4 nm. Tato štěrbina je tvořena proteinovými komplexy tzv. konexony, které vytváří komunikační kanál. Umožňují průchod malých molekul (iontů, malým vodorozpustným molekulám do 1000 Da) přímo z buňky do buňky. Mezerové spoje jsou uzavíratelné, při zvýšené koncentraci vápníku dochází k jejich uzavření.

**Hemidesmosom** je typ spojení mezi epiteliálními buňkami a bazální laminou, konkrétně s adhezním proteinem lamininem. Buněčný spoj je uskutečňován mezi integrinovými receptory, které jsou dále v buňce napojeny na intermediární filamenta.

## 7.2. Pojivová tkáň

Pojivová tkáň se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty, jejíž zastoupení je mnohem výraznější, často zaplňuje většinu objemu tkáně. Schematický náčrt pojivové a epitelové tkáně je zobrazen na obr. 14. Složení buněčné a bezbuněčné složky pojivové tkáně se liší podle konkrétního typu tkáně. Mezi pojiva patří např. *vazivo*, *chrupavka*, *kost*. Buňky jsou tvořeny buněčnými typy produkujícími mezibuněčnou hmotu (tzv. blasty – fibroblasty, osteoblasty, chondroblasty), klidové buňky (fibrocyty, osteocyty, chondrocyty) a buňky odbourávající danou tkáň (osteoklasty). Mezibuněčná hmota pojivových tkání je složena z vlákenných proteinů (kolagen, elastin, retikulární vlákna), z adhezních proteinů (fibronectin) a z amorfni hmoty (proteoglykany). Jednotlivé komponenty jsou blíže popsány v předchozí kapitole 6. Mezibuněčná hmota.

### 7.2.1. Vazivová tkáň

Vazivová tkáň se v těle vyskytuje v podobě šlach a vazů, tvoří blanitá pouzdra orgánů a výplně mezi orgány. Buněčná složka vazivové tkáně je tvořena především z fibroblastů a fibrocytů. Fibroblasty jsou protáhlé, vřetenovité buňky, které produkují mezibuněčnou hmotu. Fibroblast se může přeměnit ve fibrocyt, což je metabolicky méně aktivní buňka. V těle se vyskytuje několik typů vaziva lišících se složením mezibuněčné hmoty např. *řídke kolagenní vazivo* vyskytující se mezi orgány a v podkožním vazivu, *husté kolagenní vazivo* (hlubší vrstvy kůže, šlachy), *elastické vazivo* (žluté vazy u obratlů, hlasové vazy), *retikulární vazivo* (obsahuje retikulární vlákna a retikulární buňky, vyskytuje se v kostní dřeni, slezině), *tukové vazivo* (bílá / hnědá tuková tkáň, obsahuje tukové buňky).

### 7.2.2. Chrupavčitá tkáň

Chrupavčitá tkáň je pevná a pružná. Buněčná složka je zastoupena především chondrocyty, výjimečně se mohou vyskytovat chondroblasty produkující mezibuněčnou hmotu. Chondrocyty mají velmi nízkou proliferační aktivitu a nejsou schopny regenerace. Buňky nejsou v chrupavčité tkáni příliš početné, největší část tkáně zaujímá mezibuněčná hmota. V mezibuněčné hmotě je hojně zastoupena amorfní složka tvořená proteoglykany a glykosaminoglykany, dále je zastoupen kolagen typu II. Povrch chrupavek kryje vazivový obal tzv. perichondrium, který zajišťuje látkovou výměnu a případné hojení. Doposud se nepodařilo najít ideální scaffold pro náhradu chrupavčité tkáně, jelikož je její regenerace složitá vzhledem k obtížné kultivaci chondrocytů a faktu, že se jedná o bezcévnou tkáň. Rozlišují se 3 typy chrupavky lišících se složením. *Hyalinní chrupavka* (sklovitá, kloubní chrupavka) je tvrdá, hladká a křehká, vyskytuje se na površích kostí a kloubů, v dýchacích cestách (skelet hrtanu, průdušek). Hyalinní chrupavka obsahuje asi 50 % kolagenních vláken II. typu, má uspořádané uskupení kolagenních fibril odpovídající zatížení chrupavky. *Elastická chrupavka* je tvořena kolagenními (II. typ) a elastickými vlákny. Má žluté zabarvení, je velmi pružná a ohebná díky přítomnosti elastických vláken. Vyskytuje se v ušním boltci, v příklopce hrtanové (epiglottis), ve stěně průdušek. Třetím typem je *vazivová chrupavka*. Je tvořena silnými kolagenními vlákny I. a II. typu, které jí dodávají vysokou mechanickou odolnost. Vyskytuje se v meziobratlových ploténkách.

### 7.2.3. Kostní tkáň

Kostní tkáň je tvrdá mineralizovaná pojivová tkáň, která představuje díky své struktuře nejtvrdší a nejpevnější pojivo v těle. V kostní tkáni se vyskytují 3 typy buněk, které zajišťují neustálou přestavbu tkáně, tzv. remodelaci. Osteoblasty produkují mezibuněčnou hmotu a podílí se na mineralizaci kostní tkáně díky produkci enzymu alkalické fosfatázy. Osteocyty jsou již součástí kostní tkáně – jsou začleněny do mezibuněčné hmoty a uzavřeny mineralizovanou kostí. Jejich schopnost syntetizovat mezibuněčnou hmotu je nižší než u osteoblastů, podílí se na řízení uvolňování minerálů (především vápníku) z kostní tkáně. Osteocyty také slouží jako mechanoreceptory. Třetím typem buněk nacházejícím se v kostní tkáni jsou osteoklasty, které zajišťují odbourávání kosti působením enzymů kolagenázy a kyselých fosfatáz. Součinnost všech tří typů buněk v kostní tkáni je velmi důležitá pro správnou funkci kostní tkáně. Mezibuněčná hmota je tvořena z vláknitého kolagenu typu I (až 90 % organické hmoty kosti), který dává kosti pružnost. Dále je přítomna amorfní hmota tvořená proteoglykany. Tvrdost a

pevnost tkáně zajišťuje mineralizace. Minerální složka je tvořena především fosforečnany vápníku, které jsou prostorově uspořádány jako hydroxyapatit. Podíl minerální složky v kosti tvoří cca 60-70 %, dalších 25 % připadá na organické látky, 5 % na vodu. V lidském těle jsou zastoupeny 2 typy kostí podle uspořádání. *Vláknitá kost (fibrilární)* se vyznačuje nepravidelným uspořádáním kostní hmoty, proto je méně odolná mechanickému namáhání. Vyskytuje se u mladých jedinců, v dospělosti v některých kostních výběžcích či v místech svalových úponů. *Vrstevnatá kost (lamelární)* tvoří převážnou část skeletu dospělých jedinců. Kolagenní fibrily jsou upořádány do lamel, které jsou dále organizovány a vytváří pravidelnou strukturu odolnou mechanickému namáhání. Mezi lamelami jsou přítomné osteocyty v tzv. lakunách (komůrky zvápenaté kostní matrix). Lamelární kost se dále dělí na hutnou (kompaktní) kost nacházející se na povrchu kosti a houbovitou (spongiózní) kost vyskytující se uvnitř kosti.

### 7.3. Svalová tkáň

Svalová tkáň zajišťuje aktivní pohyb pomocí přeměny chemické energie v kinetickou energii. Mezi charakteristické vlastnosti svalové tkáně patří excitabilita (dráživost – schopnost reagovat na podněty), kontraktibilita (schopnost zkracovat se), distenzibilita (schopnost prodloužit se), elasticita (schopnost vrátit se do původního stavu po zatížení). Pohyb je zajištěn kontraktilními bílkoviny – aktinem a myozinem, které tvoří tzv. myobrily. Při stahu myofibril dochází k zasouvání tenkých aktinových vláken mezi tlustá vlákna myozinová. Aktinová vlákna jsou součástí cytoskeletu, jak je popsáno v kapitole zabývající se popisem cytologie. Ve svalových buňkách jsou aktinová vlákna stabilní. Myozin se řadí mezi tzv. molekulové motory. Svalový stah je zajišťován chemickými reakcemi (vzrůstem koncentrace vápenatých iontů), je podmíněn zásobou energie ve svalu.

V těle se nachází 3 typy svalové tkáně lišící se svou vnitřní strukturou a funkcí. *Hladká svalovina* se nachází ve stěnách většiny dutých orgánů (zažívací trakt, močový měchýř, cévy), ve vazivu kůže. Funkce hladké svaloviny jsou řízeny nervově a hormonálně, nelze je ovládat vůlí. Hladká svalovina je složena z protáhlých jednojaderných buněk. *Příčně pruhovaná (kosterní) svalovina* je základní tkání kosterních svalů. Je ovladatelná vůlí. Mikroskopicky je patrné žíhání tkáně, které je zapříčiněno pravidelným střídáním aktinu a myozinu v myofibrilách. Každý sval se skládá ze svazků svalových vláken, které jsou tvořeny velkou mnohoadernou buňkou. *Srdeční svalovina* se nachází v srdeční stěně (myokard). Srdeční stahy nelze ovládat vůlí. Základní buněčnou jednotkou srdeční svaloviny je kardiomyocyt, jednojaderná svalová buňka obsahující myofibrily. Buňky tvoří trojrozměrnou síť propojenou tzv. interkalárními disky. Sousedící buňky jsou spojeny elektrickými spoji, které zajišťují srdeční činnost. Mikroskopicky také jeví srdeční svalovina příčné pruhování.

### 7.4. Nervová tkáň

Nervová tkáň zajišťuje přenos informací prostřednictvím specializovaných buněk – neuronů. Dále se v nervovém systému vyskytují buňky gliové, které plní podpůrnou, vyživovací a ochrannou funkci. Neurony již nemají schopnost se dělit, proto představují náhrady nervové tkáně velkou, dosud nevyřešenou, výzvu. Neurony se skládají z buněčného těla a dvou typů

výběžků – několika dendritů a jednoho axonu. Tělo neuronu obsahuje buněčné jádro s velkým jadérkem, výrazné endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, mitochondrie a lysozomy. Dendrity slouží k příjmu informací do nitra neuronu, jedná se o krátké, bohatě větvené výběžky. Axon (neurit) vede informaci z neuronu na další efektorovou buňku, kterou může být neuron či svalová buňka. Spojení s další buňkou se nazývá synapse. V tomto místě dochází k přenosu informací pomocí chemických signálů. Axony mohou být velmi dlouhé, nejdelší nervový výběžek měří asi 1 m, dosahuje od páteře po konečky prstů na nohou. Axony jsou obvykle obaleny myelinovou pochvou, která je přerušována tzv. Ranvierovými zářezy. Tato stavba neuronu umožňuje rychlý přenos šíření vzruchů pomocí šíření tzv. akčního potenciálu. Cytoplazmatická membrána neuronu je velmi bohatá na iontové kanály. Na membráně dendritů a těla se nachází převážně chemicky řízené iontové kanály, v membráně axonu jsou zastoupeny především iontové kanály řízené elektricky.

### 7.5. Trofická tkáň

Trofická (tekutá) tkáň zahrnuje tělní kapaliny jako je tkáňový mok, krev a lymfa. Krev je popsána v samostatné kapitole 5. Krevní buňky a jejich využití v tkáňovém inženýrství. *Tkáňový mok* neboli intersticiální tekutina vyplňuje mezibuněčné prostory. Zajišťuje výměnu dýchacích plynů, přívod živin a odvod zplodin metabolismu mezi buňkami a jejich okolím. Složení tkáňového moku je velmi podobné složení krevní plazmy, z které se tvoří filtraci přes vrstvu endotelových buněk díky jejich propustnosti (permeabilitě). Výjimku tvoří vysokomolekulární látky jako např. bílkoviny krevní plazmy, které přes endotelovou vrstvu neprocházejí. *Lymfa* (míza) vzniká z tkáňového moku. Složením se také podobá složení krevní plazmy s nižším množstvím bílkovin. Lymfa obsahuje značné množství lymfocytů. Proudí v lymfatickém systému, který je tvořen lymfatickými cévami a lymfatickými uzlinami. Lymfa chrání tělo před infekčními a nádorovými onemocněními. V lymfatických uzlinách dochází k filtraci a odvodu škodlivých látek. Dále umožňuje vstřebávání a transport tuků v těle.

### Použitá a doporučená literatura:

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-2-0

Nečas O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3

Institut Galenus [online], 2023 [cit. 2023-10-26]. Dostupné z: <https://www.galenus.cz/clanky/biochemie>

Junqueira L.C.U., Carneiro J., Kelley R.O. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.

Uložit

## 8. Interakce mezi buňkami a biomateriálem

Jana Horáková

*Důležité pojmy: adhezní bílkoviny, RGD sekvence, integrinové receptory, fokální adheze*

V oboru tkáňového inženýrství je důležité sledovat interakci mezi scaffoldy a buňkami. Převažují aplikace, kdy je zapotřebí, aby byl tkáňový nosič osídlen buňkami v celém svém objemu, materiál postupně zdegradoval a byl nahrazen mezibuněčnou hmotou produkovanou buňkami. V takovém případě je nutné, aby povrch scaffoldu umožňoval adhezi buněk, která je závislá na adsorpci adhezních proteinů, jak bude vysvětleno v této kapitole. Po této prvotní buněčné adhezi a vytvoření pevných spojů mezi buňkami a tkáňovým nosičem dostanou buňky signál k dalšímu množení (proliferaci), které vede k prorůstání buněk do 3D struktury scaffoldu. Existují však i aplikace, kde je adheze buněk nežádoucí (např. glaukomové drenážní implantáty, kde adheze fibroblastů může způsobit nefunkčnost daného materiálu, antiadhezní materiály po chirurgických operacích viz kapitoly poslední sekce skript). Adsorpce adhezních proteinů a tím i adheze buněk je ovlivnitelná materiálovými vlastnostmi, které budou diskutovány v této kapitole.

### 8.1. Adhezní bílkoviny

Interakce mezi buňkami a povrchy biomateriálů jsou zprostředkovány pomocí adhezních bílkovin, podobně jako je tomu u buněk přirozeně se vyskytujících v tkáních (spojení buněk s ECM). V prostředí *in vitro* dochází k adsorpci těchto tzv. adhezních proteinů z kompletního média, ve kterém se buňky kultivují. V prostředí organismu (*in vivo*) dochází k adsorpci proteinů z okolních tělních tekutin (plazma).

Mezi adhezní proteiny zajišťující spojení buněk s povrchy biomateriálů patří např. fibronektin, fibrinogen, vitronektin či laminin. Jedná se o glykoproteiny vyskytující se v tělních tekutinách. Adhezní bílkoviny obsahují aminokyselinové sekvence, které jsou rozpoznávány integrinovými receptory v membráně buněk. Jedná se např. o tripeptid arginin-glycin-kyselina asparagová (Arg-Gly-Asp), označovaný jako RGD sekvence. Tyto specifické aminokyselinové sekvence musí navíc být ve správné konformaci tak, aby byly přístupné vazbě na integrinové receptory. RGD není jediná aminokyselinová sekvence, která se může vázat na integriny. Existuje mnoho dalších aminokyselinových sekvencí obvykle o délce několika jednotek aminokyselin, které bývají specifické pro určitý typ buněk. RGD sekvence je „univerzální“ sekvence, proto se používá např. pro modifikaci povrchu tkáňových nosičů s cílem zlepšení buněčné adheze.

**Fibronektin** je glykoprotein vyskytující se v organismu ve dvou formách – volné a vázané. Rozpustný fibronektin je syntetizován jaterními buňkami (hepatocyty) a nachází se volně v krevní plazmě. Nerozpustný fibronektin se vyskytuje vázaný na povrchu buněk, je součástí mezibuněčné hmoty. Tato forma fibronektinu je syntetizována buňkami pojivové tkáně, mezi které patří např. fibroblasty. Fibronektin se v organismu účastní hojení ran a ovlivňuje buněčnou adhezi, růst, migraci a diferenciaci.

**Fibrinogen** je taktéž glykoprotein, který se nachází v krevní plazmě a v  $\alpha$ -granulích krevních destiček. Je syntetizován v játrech. Jeho úloha v organismu je nezbytná zejména během zástavy

krvácení (hemostáza), při hojení ran, během zánětlivých procesů a při novotvorbě krevních cév (neoangiogeneze).

**Laminin** je glykoprotein tvořící základní složku bazální laminy epitelových tkání, kde zprostředkovává vazbu buněk s integrinovými receptory. Tímto propojením ovlivňuje buněčnou adhezi, migraci a diferenciaci.

## 8.2. Fokální adheze

Buňky rozpoznávají tyto adhezivní proteiny skrze **integrinové receptory** vyskytující se v cytoplazmatické membráně buněk (viz kapitola 2.2. Eukaryotní buňka – cytoplazmatická membrána). Jedná se o transmembránové receptory glykoproteinové povahy, které zajišťují spojení a komunikaci mezi buňkou a jejím okolím. Uvnitř buňky jsou integriny přímo napojeny na další cytoplazmatické proteiny jako např. talin, vinkulin a dále na aktinová vlákna cytoskeletu, která jsou dále propojená s jádrem buňky. Po vytvoření pevné vazby mezi adhezními bílkovinami a integrinovými receptory dojde k vytvoření tzv. fokálních adhezí. **Fokální adheze** zajišťují spojení mezi buňkou a jejím okolím, které umožňuje výměnu informací oběma směry. Účastní se jí asi stovka proteinů, jedná se o velmi komplexní a dynamickou strukturu. Zjednodušená struktura fokálních adhezí je znázorněna na obr. 16.

## 8.3. Vlastnosti scaffoldů ovlivňující vazbu adhezních proteinů

Vazba proteinů na povrch biomateriálů je tedy klíčová pro následnou interakci s buňkami. Adsorpce proteinů je ovlivněna zejména povrchovými vlastnostmi materiálu – jeho chemickým složením, smáčivostí, topografií povrchu a mechanickými vlastnostmi tkáňového nosiče. Každý typ buněk vyžaduje rozdílné materiálové podmínky pro správnou buněčnou adhezi. V prostředí tělních tekutin (*in vivo*) nebo po smočení materiálu kompletním médiu (*in vitro*), nastává okamžitá interakce s proteiny, které se mohou vázat na povrch tkáňového nosiče v závislosti na výše jmenovaných vlastnostech. Pro pevnou buněčnou adhezi a vytvoření fokálních adhezí je nutné, aby došlo k adsorpci adhezních bílkovin na povrch materiálu ve správné konformaci. To znamená tak, aby byly buněčným integrinovým receptorům přístupné příslušné aminokyselinové sekvence (např. RGD) zodpovědné za rozpoznání a navázání.

### 8.3.1. Smáčivost povrchu

Ideální povrch biomateriálu umožňující adsorpci proteinů ve správné konformaci je mírně hydrofilní (kontaktní úhel cca 50-80°) viz schéma adsorpce proteinů a interakce s buňkou na obr. 16. V tomto případě dojde k adsorpci adhezních proteinů tak, že jsou aminokyselinové sekvence přístupné integrinovým receptorům buněk a může dojít k vytvoření fokálních adhezí. V případě materiálů s extrémně hydrofilními povrchy (kontaktní úhel < 50°, např. materiály obsahující polyethylenoxid, polyvinylalkohol) dochází k velmi slabé adsorpci proteinů, která bývá následována odtržením těchto proteinů z povrchu. U hydrofobních materiálů s kontaktním úhlem větším než 100° (např. polykaprolakton, polylaktid, polyethylentereftalát, polytetrafluoethylen), dochází k adsorpci adhezních proteinů v denaturované<sup>5</sup> nebo rigidní<sup>6</sup> formě, takže adhezní aminokyselinové sekvence neumožňují vytvoření fokálních adhezí.

<sup>5</sup> Denaturace – změna prostorové struktury zapříčínující ztrátu funkčnosti bílkoviny

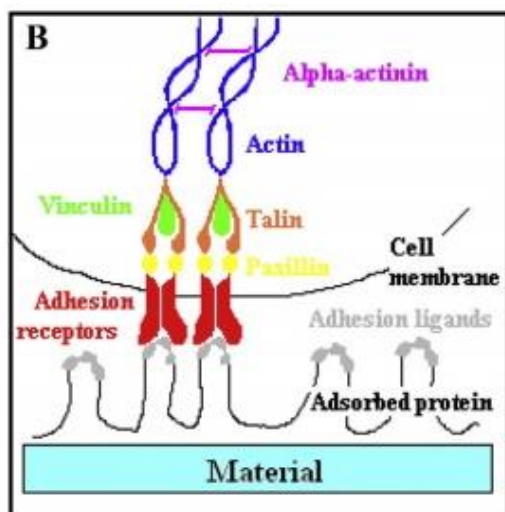
<sup>6</sup> Rigidní – tuhá, neohebná



Povrchové vlastnosti materiálů lze ovlivnit fyzikálními či chemickými metodami. Např. sterilizační techniky jako ozáření (gamma záření), působení plasm, ethylen oxidu či peroxyoctové kyseliny mohou mít vliv na smáčivost povrchu.

### 8.3.2. Mechanické vlastnosti

Dalším zmiňovaným parametrem ovlivňujícím adsorpci proteinů, a tím i buněčnou adhezi, jsou mechanické vlastnosti. Při vazbě buněk dochází k působení síly buňky na povrch materiálu. Pokud není materiál dostatečně pevný, je znemožněna tvorba fokálních adhezí. Každá tkáň vykazuje odlišné mechanické vlastnosti (např. tuková tkáň vs. kostní tkáň), neexistují tedy „ideální hodnoty“. Tkáňový nosič sloužící pro adhezi buněk by měl napodobovat tyto přirozené vlastnosti i z hlediska mechaniky. Buňka při tvorbě fokálních adhezí působí na substrát určitými silami. Ty jsou z hlediska detekovatelnosti velmi malé, nicméně je nutné, aby biomateriál byl schopný těmto malým silám odolat a poskytnout tak dostatečnou mechanickou oporu. Snadno se deformující materiály jako např. velmi tenké nanovlákněné vrstvy či hydrogely tuto oporu neposkytují a přestože mohou mít ideální hodnoty smáčivosti, k adhezi buněk nemusí docházet. Mechanické vlastnosti jsou důležité nejen pro buněčnou adhezi, ale dochází i k ovlivnění buněčné migrace, proliferace a diferenciace.



Obr. 16: Schéma adsorpce proteinů na mírně hydrofilní povrchy a vytvoření fokálních adhezí (A).

### 8.3.3. Drsnost a morfologie povrchu

Drsnost a morfologie povrchu jsou dalšími důležitými parametry pro adsorpci proteinů a následnou buněčnou adhezi. Drsnost lze rozdělit z hlediska rozměrů na makro-, mikro-, submikro- a nanodrsnost. Makrodrsnost je viditelná pouhým okem, její rozměry jsou udávány od 100  $\mu\text{m}$  do řádu milimetrů. Její vliv na buněčnou adhezi je minimální, jelikož buňky takto velké rozměry nerozeznávají. Makrodrsnost může podporovat uchycení tkáňového nosiče v organismu. Mikrodrsnost se pohybuje v rozměrech 1-100  $\mu\text{m}$ , submikronová drsnost 100 nm - 1  $\mu\text{m}$ . Jejich vliv na buněčnou adhezi se v různých studiích liší, byl popsán jak pozitivní, tak negativní efekt. Tyto rozměry již jsou pro buňky rozeznatelné (adherentní buňky v suspenzi po trypsinizaci měří obvykle 10-50  $\mu\text{m}$ , po rozprostření na povrchu biomateriálu zabírají plochu

několika stovek až tisíců  $\mu\text{m}^2$ ). Problém s jasným závěrem vlivu sub/mikrodrsnosti může spočívat v tom, že je obvykle vyhodnocována pouze střední aritmetická odchylka profilu  $R_A$ . Pro buněčnou adhezi jsou velmi důležité i další topografické parametry povrchu jako vzdálenost mezi nerovnostmi, jejich tvar a špičatost. Drsnost o rozměrech menších než 100 nm se označuje jako nanodrsnost a byl pozorován její pozitivní vliv na buněčnou adhezi. Podpora buněčné adheze se vysvětluje na základě podobnosti s mezibuněčnou hmotou, která je také organizována v nanoměřítku. Povrchy s nanodrsností umožňují proto adsorpci proteinů ve správné konformaci s adhezními aminokyselinovými sekvencemi přístupnými pro buněčné integrinové receptory. Nanodrsnost také přispívá ke snížení imunogenicity materiálu a snižuje zánětlivou odpověď organismu.

#### **8.4. Analýza adhezních proteinů**

Detekce adsorpce proteinů na povrch je důležitou charakteristikou biomateriálů. Je možné ji sledovat v podmínkách *in vitro* a predikovat tak interakci tkáňových nosičů s buňkami. Lze sledovat typy proteinů, které jsou adsorbovány na povrch, jejich množství. Sofistikovanější metody umožňují i sledování konformace proteinů, jedná se však o pokročilejší analýzy.

#### **Použitá a doporučená literatura:**

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-2-0

Nečas O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3

Salmerón-Sánchez M., Altankov G. Cell-Protein-Material interaction in tissue engineering. *Tissue Engineering*, Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7, IntechOpen, 2010, p. 77-102. DOI: 10.5772/8584

Bacakova L., Filova E., Parizek M., Ruml T., Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* 2011, 29: 739-767. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004

## 9. *In vitro* testování tkáňových nosičů

Jana Horáková

*Důležité pojmy: in vitro testování, podmínky in vitro testování, světelná mikroskopie buněk, fluorescenční barvení buněk, LIVE/DEAD assay, elektronová mikroskopie pro pozorování buněk, metabolické testy (MTT), test cytotoxicity – extrakt / přímý styk, testování buněčné adheze a proliferace, statická / dynamická kultivace buněk*

Při vývoji tkáňového nosiče je nejprve navržen produkt, který je řádně charakterizován z hlediska materiálových vlastností (viz kapitola sekce A. Kapitola 5. Charakterizace tkáňových nosičů). Následně se přistupuje ke zkouškám *in vitro* neboli testování „ve zkumavce“, které představuje testování materiálů mimo živý organismus, obvykle s využitím buněčných kultur. Tento proces předchází testům na zvířecích modelech (*in vivo*) a klinickým zkouškám na pacientech.

Metody *in vitro* jsou velmi široký pojem, který zahrnuje mnoho typů zkoušek. Neexistuje přesný návod, jak daný scaffold charakterizovat s buněčnými kulturami, vždy velmi záleží na jeho konečném použití (místo implantace, doba degradace, mechanismus účinku apod.). Pro průkaz bezpečnosti biomateriálu je nutné provést certifikované zkoušky (viz ČSN EN ISO 10993), které jsou standardizovány. Pro nově vyvíjené materiály jako např. nanovláknenné scaffoldy však může být použití testů dle platné metodiky komplikované a musí se proces modifikovat.

Při testování musí být vybrána správná buněčná linie, opět záleží na aplikaci scaffoldu. Obvykle se testuje nejprve se „standardní“ buněčnou linií jako jsou např. fibroblasty (3T3, L929), které jsou „odolnější“. Dále by měly být využity i specifické buněčné linie pro danou aplikaci (například endotelové buňky a hladkosvalové buňky pro scaffoldy určené jako náhrada krevních cév). Nejcitlivější jsou pak primární buněčné kultury izolované přímo ze tkáně, které lze také využít pro testování nově vyvíjených materiálů.

*In vitro* testování probíhá za sterilních podmínek, které musí být dodrženy během celého procesu. Tento fakt se podepisuje na nákladech *in vitro* testování, které jsou vyšší díky používání jednorázového sterilního plastiku apod. Materiály tedy musí být pro *in vitro* testování již správným způsobem sterilizovány. Je nutné zacházet s materiály pečlivě, aby nedošlo k jejich poškození např. při manipulaci pomocí pinzet. Sterilizace a zacházení s materiálem může mít velký vliv na výsledky testování, na což je potřeba myslet při provádění experimentů.

Další velmi důležitý vliv na výsledky *in vitro* testů mají zvolené podmínky testování jako je složení média (zejména obsah séra, množství živin – glukózy, četnost výměny média během testování), doba kultivace buněk na scaffoldu (hodiny – týdny), způsob kultivace (statická / dynamická). Všechny tyto aspekty mohou mít vliv na výsledky *in vitro* testů. Jelikož buňky jsou živý „systém“, je nutné počítat vždy s poměrně vysokou biologickou variabilitou.

Pro hodnocení interakce scaffoldu s buňkami je možné využít celou řadu metod. Tato kapitola bude zaměřena pouze na vybrané metody, které jsou nejčastěji používány pro hodnocení

nanovláknenných materiálů s buněčnými kulturami. Jedná se o mikroskopické metody a metabolické testy.

### **9.1. Metody hodnocení interakce buněk s tkáňovými nosiči**

Pro hodnocení interakce scaffoldu s buňkami je možné využít celou řadu metod. Tato kapitola bude zaměřena pouze na vybrané metody, které jsou nejčastěji používány pro hodnocení nanovláknenných materiálů s buněčnými kulturami. Jedná se o mikroskopické metody a metabolické testy.

#### **9.1.1. Mikroskopické metody**

Pro pozorování buněk na tkáňových nosičích se využívají všechny typy mikroskopického pozorování – světelná, fluorescenční i elektronová mikroskopie. Již během kultivace buněk se buňky pravidelně sledují pomocí invertovaného světelného mikroskopu, který postačí k zobrazení buněk na plastiku. Při běžném zvětšení (100x) je patrný tvar buněk a je viditelné jádro. Při větším zvětšení (200x) lze pozorovat i větší detaily buněk jako např. dělicí se jádro apod. Nepoškozené buňky mají typický tvar – např. myší 3T3 fibroblasty mají četné výběžky. Pokud dojde k poškození buněk působením cytotoxické látky, dojde k zakulacení buněk, které nejsou přisedlé k podkladu a jsou hůře pozorovatelné. Již pouhým okem lze tedy říci, zda jsou buňky „zdravé“ či poškozené.

Buňky by měly také vykazovat určitou rychlost růstu, měly by postupně zaplňovat povrch plastiku / scaffoldu. Jedná se o tzv. stupeň konfluence, který se určuje pouze odhadem zaplnění plochy povrchu buňkami.

*Světelná mikroskopie* má velmi široké využití pro pozorování buněk převážně na plastiku. Hodnocení buněk na scaffoldech obvykle není možné. Výjimku tvoří průhledné tenké folie, kde je možné pozorovat buňky na povrchu nosiče. Ostatní materiály jsou objemné a neprůhledné, a proto nelze buňky na povrchu či v jejich objemu pomocí světelné mikroskopie pozorovat.

K zobrazení buněk na scaffoldech je mnohem více využívána fluorescenční a elektronová mikroskopie. Před pozorováním je však nutné buňky zafixovat pomocí fixačních činidel (glutaraldehyd, metanol). Správně provedená fixace způsobí rychlé a šetrné usmrcení buněk s co nejmenším vlivem na jejich strukturu. Po fixaci je nutné vzorky speciálně připravit pro další mikroskopické pozorování.

*Fluorescenční mikroskopie* umožňuje zvýraznění vybraných buněčných struktur. Nejčastěji se barví buněčná jádra, která jednoznačně „identifikují“ každou buňku. Pro barvení jader lze využít několik fluorescenčních barev jako např. propidium jodid (PI – barví jádra červeně) nebo DAPI (4, 6-diamidino-2-fenylindol – barví jádra modře). Buněčné jádro mívá obvykle kulatý či elipsovitý tvar, je možné tyto obarvené struktury kvantifikovat a stanovovat tak počet buněk na plochu. Toto počítání buněk lze provádět manuálně (počítáním buněčných jader na definované ploše pozorovaného preparátu) nebo automaticky (např. pomocí softwaru MATLAB).

Kromě buněčných jader je zajímavé pozorovat i tvar buněk. Toho je možné docílit obarvením aktinových filament pomocí phalloidinu. Tvar buněk také vypovídá o „vhodnosti“ testovaného

materiálu. Pokud jsou buňky rozprostřené a zaujímají svůj typický tvar jako na kultivačním plastiku, jedná se o vhodný materiál pro danou buněčnou kulturu. Pokud jsou buňky zakulacené, neproběhla zde pevná adheze buněk k povrchu scaffoldu.

Na trhu je celá řada dalších komerčně dostupných fluorescenčních barviv, které zvýrazňují nejrůznější struktury buněk – např. specifické markery buněk, fokální adheze, buněčné orgány apod. Výhodou fluorescenční mikroskopie je, že je možné kombinovat jednotlivá barvení pro zobrazení více struktur v jednom zorném poli. K běžné kombinaci barvení patří například obarvení jader pomocí DAPI (modrá barva) a cytoplazmy pomocí phalloidinu (zelená barva).

Pomocí fluorescenčního značení lze také barvit nativní buňky a rozlišit tak živé a mrtvé buňky. Test se označuje jako LIVE/DEAD assay, obsahuje 2 sady barvení. Mrtvé buňky jsou označeny červeně pomocí propidium jodidu, který pronikne poškozenou buněčnou membránou do jádra. Živé buňky barvivo do jádra nepropustí a dojde k obarvení cytoplazmy pomocí například kalceinu. Na zorném poli je tedy možné pozorovat současně živé a mrtvé buňky a určit procento živých buněk.

Zobrazení pomocí světelné a fluorescenční mikroskopie umožňuje sledování buněk, zpravidla však neumožňuje sledování buněčné interakce se strukturou samotného tkáňového nosiče. Tento nedostatek umí „vyřešit“ *elektronová mikroskopie*, která má větší rozlišovací schopnost. Scaffoldy s buňkami je též možné pozorovat pomocí elektronové mikroskopie, je však nutná speciální příprava vzorků. Jak již bylo zmíněno, nejprve je nutné buňky na scaffoldu zafixovat, k tomuto účelu se nejčastěji používá glutaraldehyd. Poté je nutné buňky odvodnit, aby nedošlo k poškození skenovací elektronové mikroskopie. Tento krok se provádí pomocí smáčení vzorků ve vzrůstající etanolové řadě (např. 30-100 % etanolu), kdy dochází k postupnému nahrazení vody etanolem, který se poté vypaří. Suché vzorky již lze pozorovat pomocí skenovací elektronové mikroskopie, kdy je patrná jak struktura scaffoldu, tak i rozptřeni buněk. Po několika hodinách od nasazení buněk jsou patrné jednotlivé adheované buňky, po několika dnech je vytvořen monolayer buněk a struktura scaffoldu není patrná. Skenovací elektronová mikroskopie nepřináší zpravidla žádné kvantitativní výsledky jako např. počet buněk, ale umožňuje sledovat morfologii buněk a zaplnění scaffoldu buňkami. Dnes jsou na trhu i pokročilá zařízení umožňující pozorovat i vzorky s obsahem vody potažmo živé buňky. Nepatří to však k rutinním analýzám.

### **9.1.2. Metabolické testy**

Metabolické testy umožňují kvantifikaci metabolismu buněk, nepřímou vypovídají i o počtu buněk na scaffoldech. Na trhu je dostupná celá řada testů založených na různých metabolických dějích. Obecný princip spočívá v inkubaci buněk s určitým substrátem, který buňky metabolizují (odtud název metabolické testy) a přeměňují ho na určitý produkt, který lze detekovat například fotometricky.

Jak příklad poslouží např. MTT test, který se běžně používá pro testování viability buněk. K buňkám je přidán žlutý roztok MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid), který je přeměňován mitochondriálními enzymy na nerozpustný formazan. Ten se v dalším kroku rozpustí a zabarvený roztok se měří pomocí fotometrie při vlnové délce 570 nm.

Hodnota absorbance roztoku vypovídá o množství buněk a jejich metabolické aktivitě (aktivní buňky s četnými mitochondriemi budou vykazovat vyšší hodnoty než buňky v klidové fázi). Nelze tedy hodnoty absorbance přepočítat na množství buněk, přestože kalibrační křivka závislosti počtu buněk na absorbanci lze sestavit. Experiment vypadá tak, že do mikrotitrační destičky jsou nasazeny buňky o známé koncentraci a po určité době (řádově hodiny) je měřena absorbance roztoku (viz sekce A. Scaffoldy, kapitola Charakterizace tkáňových nosičů - Obr. 22). Původní počet buněk však již nemusí odpovídat, jelikož mohlo dojít k dělení buněk, k úhynu buněk, které plně neadherovaly k podkladu apod. Naměřená absorbance by se měla ideálně pohybovat v rozmezí 0,1-1. Nižší hodnoty (kolem 0,1) jsou na hranici meze detekce. Hodnota absorbance vyšší než 1 již také není přesná (neplatí již linearita odezvy mezi metabolickou aktivitou a naměřenou absorbancí) a v tomto případě je nutné roztok naředit a do výsledné absorbance započítat koeficient ředění.

Další metabolický test hojně využívaný pro testování metabolické aktivity buněk je cck-8, který patří do skupiny testů označovaných jako WST (water soluble tetrazolium salt). Tyto testy mají výhodu oproti MTT v tom, že jsou „jednokrokové“. K buňkám je přidán substrát a po inkubaci se přímo měří absorbance roztoku bez nutnosti rozpouštění. Tento mezikrok vnáší u MTT testu další chybu měření. Metabolismus substrátu používaného v cck-8 testu probíhá také v mitochondriích, produktem je rozpustná oranžová látka, která se uvolňuje do roztoku. Po inkubaci se také měří absorbance roztoku. Další výhodou cck-8 testu je vyšší citlivost a díky snadnějšímu provedení test vykazuje menší rozptyl naměřených hodnot. Nevýhodou je jeho vyšší cena.

## **9.2. Typy *in vitro* testování**

Pomocí výše zmíněných metod je možné testovat interakce materiálu s buněčnými kulturami. Na každý scaffold jsou kladeny jiné požadavky z hlediska materiálového chování i buněčných interakcí. V každém případě se musí jednat o materiály, které nebudou vykazovat cytotoxický účinek. Co se týká interakce s buňkami, obvykle je žádoucí adheze a proliferace určitého buněčného typu a naopak nežádoucí adheze a proliferace jiného buněčného typu, který by mohl znemožnit adherovat specifickým buňkám podílejících se na regeneraci tkáňového nosiče v organismu. Tyto interakce je možné testovat s jednotlivými buněčnými liniemi v izolovaných experimentech, což je jednodušší na provedení a vyhodnocení. Náročnější techniky pak spočívají v tzv. kokultivaci dvou buněčných linií.

### **9.2.1. Cytotoxicita materiálu**

Testování cytotoxicity materiálu vychází z normy ČSN EN 10993-5 Zkouška na cytotoxicitu *in vitro*. V této normě jsou popsány 3 kategorie zkoušek, z nichž 2 jsou nejvíce využívány pro testování cytotoxicity tkáňových nosičů. Jedná se o testování extraktu vzorků a zkouška přímým stykem. Samotné testování cytotoxicity pak probíhá pomocí metabolického testu (např. MTT / cck-8) v kombinaci s mikroskopickým pozorováním buněk.

### ***Testování extraktů vzorků***

Extrakce vzorků pevných materiálů probíhá ve vhodném prostředí – např. v pufru, v médiu. Vždy je důležitý poměr navážky vzorku a objemu extrakčního činidla. Připravuje se co nejvíce „koncentrovaný“ extrakt, který se dále testuje v různém ředění tak, aby byla stanovena cytotoxická koncentrace. Například nanovláknenný materiál je nastříhán, navážen a vložen do plastové zkumavky. Test obvykle probíhá po dobu 3 dnů. **První den** jsou nasazeny buňky do 96jamkové testovací destičky o vhodné koncentraci (pro 3T3 myši fibroblasty je doporučována koncentrace  $10^4$  buněk na jamku). Koncentrace buněk musí být taková, aby buňky měly do 48 hodin měřitelnou hodnotu viability a mohl se projevit případný cytotoxický účinek testovaného materiálu. Zároveň je připraven extrakt testovaného materiálu. Do připravené zkumavky je přidáno kompletní médium (nebo pufr) v příslušném objemu (např. 10 mg materiálu na 1 ml média). Materiál v médiu je inkubován při 37 °C v inkubátoru nebo na třepačce obvykle po dobu 24 hodin. Doba inkubace může být zvolena i delší s ohledem na použití scaffoldu. V případě testování cytotoxicity tekutých vzorků (např. látek, které jsou přidávány do tkáňového nosiče) se pouze naředí daná látka v koncentračním rozmezí, které reflektuje koncentraci inkorporovanou do materiálu a vyšší, aby byla stanovena hranice cytotoxického působení.

**Druhý den** testování proběhne mikroskopická kontrola buněk v mikrotitrační destičce, buňky by měly být adherované k povrchu a pokrývat většinu plochy jamky. Připraví se přidávané extrakty / koncentrační řady testované látky a kontroly (pozitivní a negativní). Mělo by být testováno více opakování (obvykle 8-10) pro každou testovanou koncentraci / kontrolu. Odsaje se médium u buněk a do jamek je přidáno 100  $\mu$ l vzorků / kontrol. Jako negativní kontrola je použito čerstvé médium. Buňky inkubované v prostředí média vykazují 100 % viabilitu, ke které se poté vztahuje výsledná viabilita testovaného materiálu. Jako pozitivní kontrola je použit materiál, který naopak vyvolá maximální cytotoxickou odezvu – např. Triton X-100. Viabilita buněk po inkubaci s pozitivní kontrolou by měla dosahovat 0 %. Takto připravená destička se opět ponechá inkubovat po dobu 24 hodin při 37°C.

**Třetí den** testování opět proběhne mikroskopická kontrola buněk. Je možné pořídit snímky buněk, které vypovídají o viabilitě buněk. Mrtvé buňky jsou zakulacené a mohou plavat v médiu (pozitivní kontrola), živé buňky mají zachovaný svůj tvar a pokrývají povrch kultivační jamky. Po této kontrole se odsaje médium, přidá se roztok MTT / cck-8 a ponechá se inkubovat 2-4 hodiny. V případě použití MTT je pak nutné vzniklé fialové krystaly rozpustit použitím isopropanolu a měřit absorbancí při 570 nm. Při použití cck-8 je možné měřit absorbancí po inkubační době. Výsledná viabilita ( $Abs_e$ ) je poté vztažena k viabilitě negativní kontroly ( $Abs_{nc}$ ) dle vzorce: viabilita (%) =  $Abs_e / Abs_{nc} * 100$ . Dle normy je stanovena hodnota cytotoxicity na hranici 70 % viability oproti kontrolním buňkám inkubovaným v médiu. Záleží však i na mnoha dalších faktorech jako jsou například podmínky extrakce materiálu, přítomnost séra v médiu, které „chrání“ buňky apod.

### ***Zkouška přímým stykem***

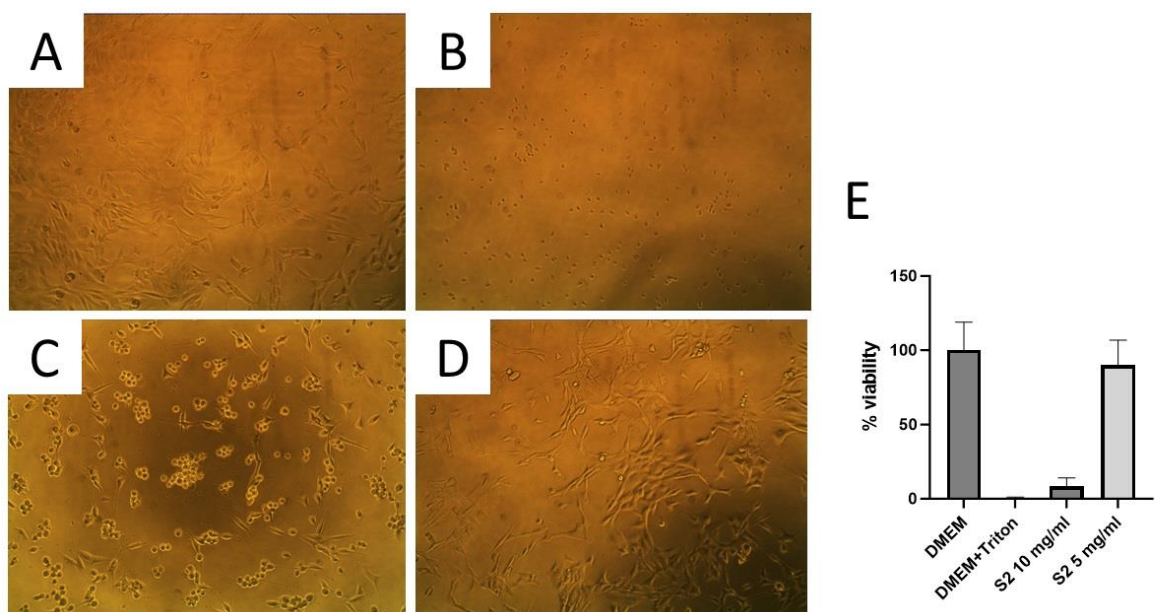
Zkouška cytotoxicity přímým stykem se využívá pro materiály, které přisedají na dno testovací jamky. U materiálů, které se v médiu vznášejí (jako např. některé nanovláknenné materiály), není

tato zkouška vhodná a volí se spíše testování extraktů těchto vzorků. Pro zkoušku cytotoxicity přímým stykem se obvykle využívají destičky větších rozměrů, plocha testovaného materiálu by měla zabírat 1/10 plochy jamky. Test probíhá obdobně ve 3 dnech. První den jsou nasazeny buňky do jamek ve správné koncentraci. Druhý den po mikroskopické kontrole je vyměněno médium, použijí se též výše zmiňované kontroly (negativní – médium, pozitivní – médium s obsahem Tritonu X-100). Do příslušných jamek se vloží testovaný materiál. Třetí den proběhne vyhodnocení zejména pomocí mikroskopie, lze však využít i měření metabolické aktivity buněk. Mikroskopicky se zkoumá rozhraní materiálu a narostlých buněk. V případě netoxického materiálu mají buňky zachovaný svůj tvar a pokrývají plochu jamky. U toxických materiálů jsou na rozhraní materiálu pozorovány poškozené buňky a zakulacené mrtvé buňky, které volně plavou v médiu. U měření viability je nutné počítat s redukcí viability díky menší ploše růstu buněk. Tento fakt lze obejít testováním netoxického materiálu o stejném rozměru jako testované vzorky.

Pro příklad je zde uveden test cytotoxicity fólií s obsahem nanočástic mědi. Nylonové folie byly vybrány pro demonstraci tohoto testování z důvodu, že jsou průhledné a je možné testovat cytotoxicitu extraktu materiálu i přímý kontakt s materiálem. Pro cytotoxicitu extraktů byl materiál smáčen po dobu 24 hodin v kompletním médiu v koncentraci 10 mg/ml (vzorky byly zváženy a poté bylo přidáno příslušné množství média). Pro testování byly připraveny také kontroly – buňky v kompletním médiu (DMEM) a v médiu s obsahem Tritonu X-100 (DMEM+Triton). Extrakty materiálu (S2) byly testovány v původní koncentraci 10 mg/ml a v poloviční koncentraci 5 mg/ml, která se připravila ředěním původního extraktu. Celkem bylo testováno 12 opakování pro každý extrakt / kontrolu. Testování cytotoxicity probíhalo pomocí metabolického testu MTT.

Výsledky testování jsou zobrazeny na obrázku 17A-E. Na snímcích 17A-D jsou zobrazeny snímky z optického mikroskopu. Normální nepoškozené buňky s přirozenou morfologií 3T3 myších fibroblastů jsou vidět na snímku kontrolních buněk v médiu (obr. 17A odpovídající 100 % viabilitě buněk) a na materiálu s ředěnou testovanou koncentrací testovaného materiálu (5 mg/ml – snímek 17D). Nejvíce poškozené buňky (viabilita dosahující 0,9 %) jsou vidět na obr. 17B, kde jsou patrné zakulacené buňky, které volně plavou v médiu. Na snímku 17C jsou zachyceny buňky z větší části poškozené, které mají zakulacený tvar. Naměřená viabilita těchto buněk byla 8,3 %, což je silně pod limitem cytotoxicity (70 % viability kontrolních buněk). Hodnota viability buněk byla stanovena pomocí MTT testu, výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr. 17E.

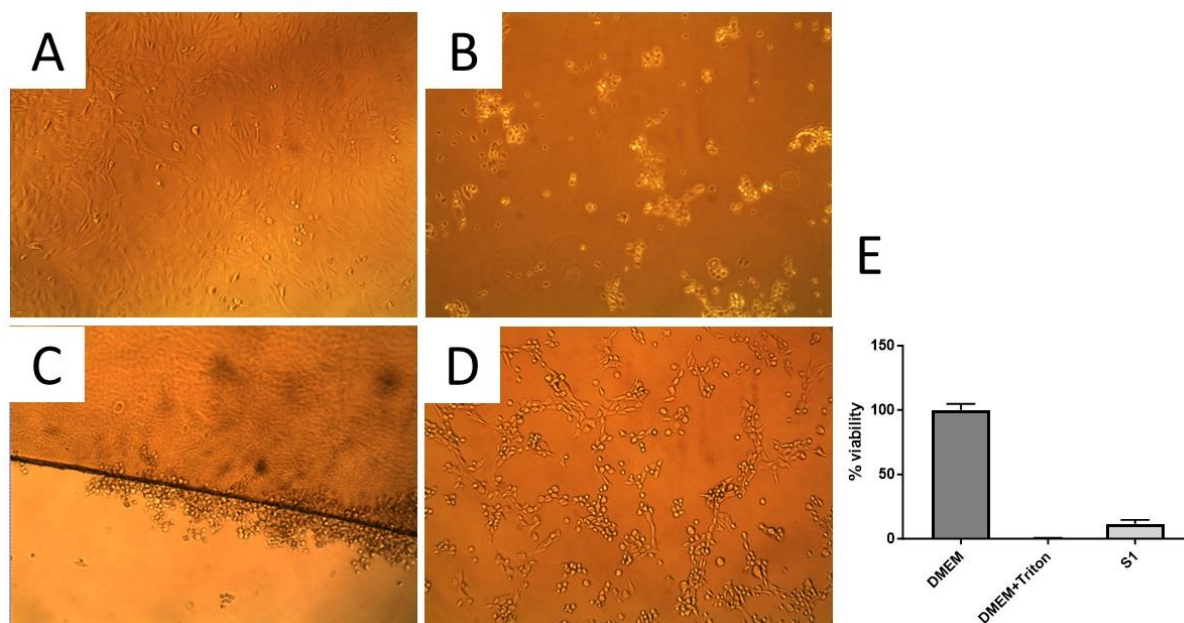




Obr. 17: Snímky z optického mikroskopu po zkoušce cytotoxicity extrahovaného pevného materiálu: negativní kontrola (nepoškozené buňky, A), pozitivní kontrola (poškozené buňky, B), testovaný extrakt materiálu S2 o koncentraci 10 mg/ml (částečně poškozené buňky, C), testovaný extrakt materiálu S2 o koncentraci 5 mg/ml (nepoškozené buňky, D). Graf zobrazující viabilitu buněk měřenou pomocí MTT testu (E).

Podobný typ materiálu byl testován také přímým kontaktem. Buňky byly nasazeny do 12ti jamkové destičky. Po přiměřeném nárůstu buněk byla do jamky přidána testovaná folie a sledovalo se chování buněk v kontaktu s materiálem. Dále byly obdobným způsobem nasazeny kontroly – buňky v médiu a buňky v médiu s obsahem Tritonu X-100, počet opakování byl proveden pouze 4x. Jelikož materiál v médiu volně plaval, nedocházelo k poškození buněk na dně kultivační jamky mechanicky, proto byl proveden také metabolický MTT test pro kvantifikaci buněčné viability. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 18.

Kontrolní buňky zobrazené na obr. 18A vykazující 100 % viabilitu mají opět normální tvar, pokrývají většinu dna kultivační jamky. Buňky v kontaktu s cytotoxickým Tritonem X-100 jsou zakulacené a plavou v médiu (obr. 18B). Na obr. 18C jsou zobrazeny kulaté mrtvé buňky na rozhraní testovaného materiálu. Ve větší vzdálenosti od materiálu pak byly nalezeny buňky převážně zakulacené (obr. 18D). Naměřená viabilita buněk v kontaktu s materiálem dosáhla pouhých 11,5 %, proto byl tento materiál označen jako cytotoxický pro 3T3 myší fibroblasty.



Obr. 18: Snímky z optického mikroskopu po zkoušce cytotoxicity extrahovaného pevného materiálu: negativní kontrola (nepoškozené buňky, A), pozitivní kontrola (poškozené buňky, B), testovaný materiál – rozhraní (C), buňky v testovací jamce s testovaným materiálem (D). Graf zobrazující viabilitu buněk měřenou pomocí MTT testu (E).

### 9.2.2. Testy buněčné adheze a proliferace

Pro tkáňové inženýrství je velmi důležitá interakce scaffoldu s určitými typy buněk. V *in vitro* podmínkách lze testovat, zda dochází k buněčné adhezi a proliferaci pomocí výše zmíněných metod (mikroskopické metody + metabolické testy). Testování obvykle vypadá tak, že na sterilní materiály je nasazena buněčná suspenze a sleduje se v určitých časových intervalech, zda buňky pokrývají povrch scaffoldu či vrůstají dovnitř struktury tkáňového nosiče. Při statických podmínkách kultivace často buňky pokrývají pouze povrchy materiálů. Pro migraci a proliferaci buněk dovnitř scaffoldů je zpravidla nutné využívat dynamickou kultivaci s využitím bioreaktorů.

Při experimentu musí být zajištěno, aby se buňky nasadily skutečně na povrch tkáňového nosiče, což může být u některých typů materiálů obtížné. Například materiály, které v médiu plavou, je nutné zatížit (např. skleněným kroužkem odpovídající velikosti dané kultivační jamky viz obr. 19A). Dále je možné scaffoldy upevňovat do speciálních držáků, tzv. cell crowns (obr. 19B).



Obr. 19: Zatížení nanovláknenných materiálů pro *in vitro* testování pomocí skleněných kroužků (A), upevnění modifikovaného nanovláknenného materiálu do speciálního inzertu, vložení materiálů do testovací destičky (B).

Buněčná adheze nastává řádově během hodin, obvykle se však z praktických důvodů testuje 24 hodin po nasazení buněk (buňky adherují cca 4 hodiny, provedení testů poté trvá dalších cca 6 hodin). Buněčná proliferace poté nastává při vhodných podmínkách dokud nedojde ke kompletnímu osídlení scaffoldu. Testování se tedy obvykle provádí v několikadenních odstupech pro sledování kinetiky růstu buněk (např. 1., 3., 7. a 14. den po nasazení buněk).

Ke sledování růstu buněk se používá kombinace metabolických testů a mikroskopických technik. Metabolické testy probíhají tak, že po uplynutí doby inkubace je materiál přemístěn do jamky s obsahem MTT / cck-8, současně jsou testovány i kontrolní buňky na plastiku a v přítomnosti Tritonu X-100. Následně je měřena metabolická aktivita v porovnání s kontrolními buňkami. Při použití MTT testu lze fialové krystaly pozorovat i pomocí světelného mikroskopu, jejich rozmístění vypovídá o přítomnosti buněk.

Pro vizualizaci buněk jsou používány spíše mikroskopické techniky založené na fluorescenční a elektronové mikroskopii. Fluorescenční mikroskopie umožňuje obarvení jader pomocí propidium jodidu či DAPI a tím jejich kvantifikaci, lze porovnávat počet buněk na jednotku plochy (počet buněk / 1 mm<sup>2</sup>). Dále umožňuje obarvení buněčné cytoplazmy (phalloidin) a hodnocení tvaru buněk. Míra rozptřeni buněk (plochy cytoplazmy) také svědčí o „vhodnosti“ materiálu. Malé zakulacené buňky nemají vhodné podmínky k plné adhezi, proto obvykle během pár dní počet buněk a jejich metabolická aktivita klesá. Pokud se na povrchu scaffoldu vyskytují plně rozptřené buňky, bude se zpravidla jejich počet a metabolická aktivita během doby kultivace zvyšovat.

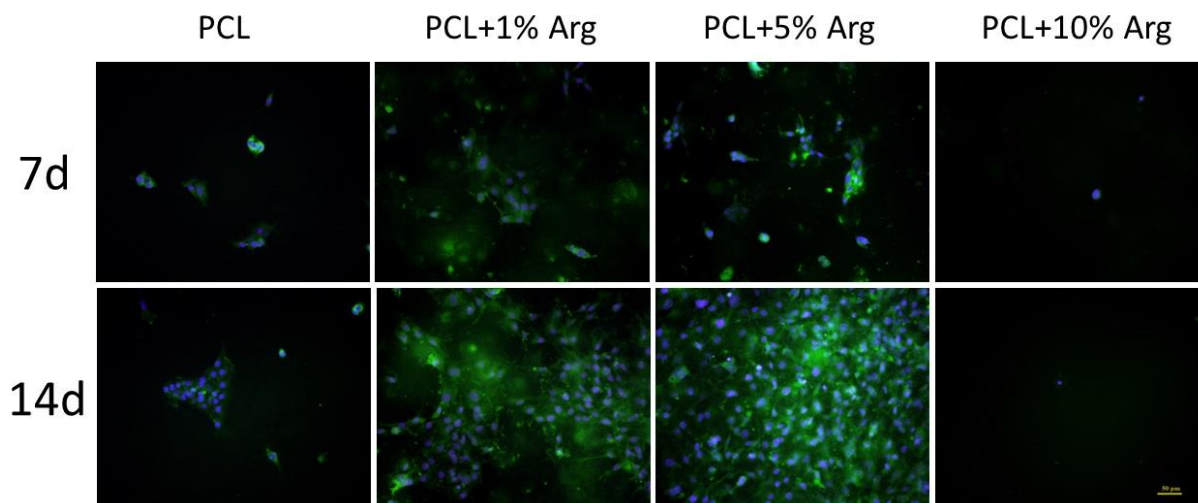
Elektronovou mikroskopií lze pozorovat interakci buněk se scaffoldem. Pomocí SEM není možné rozeznat jednotlivé buňky. První den po nasazení lze hodnotit rozptřeni buněk, v dalších dnech je možné sledovat procento pokrytí povrchu buňkami.

Pro hodnocení buněčné adheze a proliferace je nutné testování většího počtu vzorků. Pro každý testovací den je zapotřebí alespoň 4 vzorky pro metabolický test, 1-2 vzorky pro fluorescenční a elektronovou mikroskopii + kontrolní vzorky buněk na plastiku. Samozřejmě čím vyšší počet

opakování, tím spolehlivější výsledky, ale zároveň je nutné zvážit časovou náročnost každé analýzy.

Pro příklad zde bude uvedeno testování proliferace fibroblastů na elektrostaticky zvlákněném polykaprolaktonu modifikovaném přídatkem L-Argininu (Arg). Byly vyrobeny materiály obsahující 1, 5 a 10 hm% argininu (PCL+1% Arg, PCL+5% Arg, PCL+10% Arg) společně s kontrolním vzorkem polykaprolaktonu (PCL). Nanovláknenné materiály byly nastříhány do velikosti dna 24jamkové testovací destičky a sterilizovány pomocí ethylen oxidu. Po 2 týdnech odvětrání byly materiály zatíženy pomocí skleněných kroužků pro zabránění jejich plavání v médiu díky jejich hydrofobním vlastnostem. Na takto připravené scaffoldy byla aplikována suspenze fibroblastů o koncentraci  $5 \times 10^3$  buněk na jamku. Buněčná proliferace byla testována pomocí fluorescenční mikroskopie, metabolického MTT testu a elektronové mikroskopie.

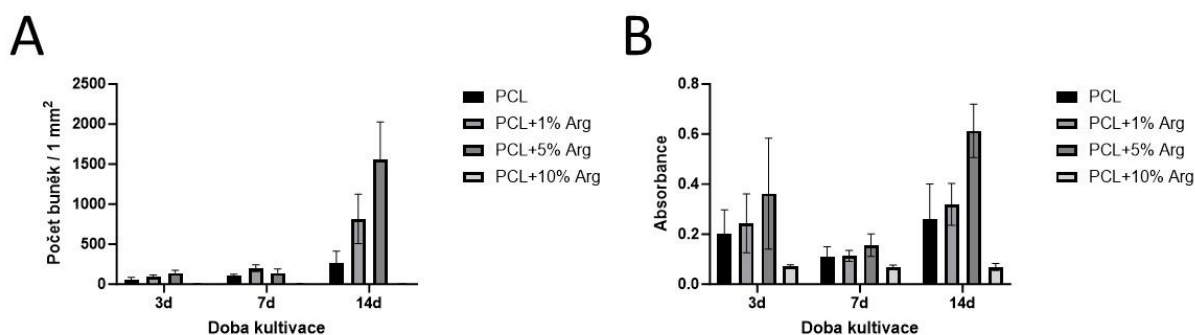
Buňky na nanovláknenném materiálu byly vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie. Pro vizualizaci byla využita kombinace fluorescenčních barev DAPI a phalloidinu. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 20. Na nanovláknenném polykaprolaktonu jsou patrné ostrůvky buněk, které po 14ti dnech kultivace zabírají necelou polovinu plochy scaffoldu. Na nanovláknenném materiálu obsahujícím 1% Arg jsou buňky více rozprostřené a zabírají větší podíl plochy než u PCL po 14ti dnech kultivace. Nejvyšší proliferace byla zaznamenána u materiálu PCL+5% Arg, kde fibroblasty po 14ti dnech pokrývaly souvisle celou plochu testovaného materiálu. Na materiálu s nejvyšším obsahem argininu (PCL+10% Arg) byly nalezeny pouze ojedinělé zakulacené buňky.



Obr. 20: Snímky z fluorescenční mikroskopie fibroblastů kultivovaných na elektrostaticky zvlákněném polykaprolaktonu (PCL) s přídatkem argininu (1, 5, 10%) po 7 dnech (1. řádek) a 14 dnech (2. řádek). Buňky byly obarveny pomocí DAPI (buněčná jádra zbarvena modře) a phalloidinu (aktinová filamenta zeleně), měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

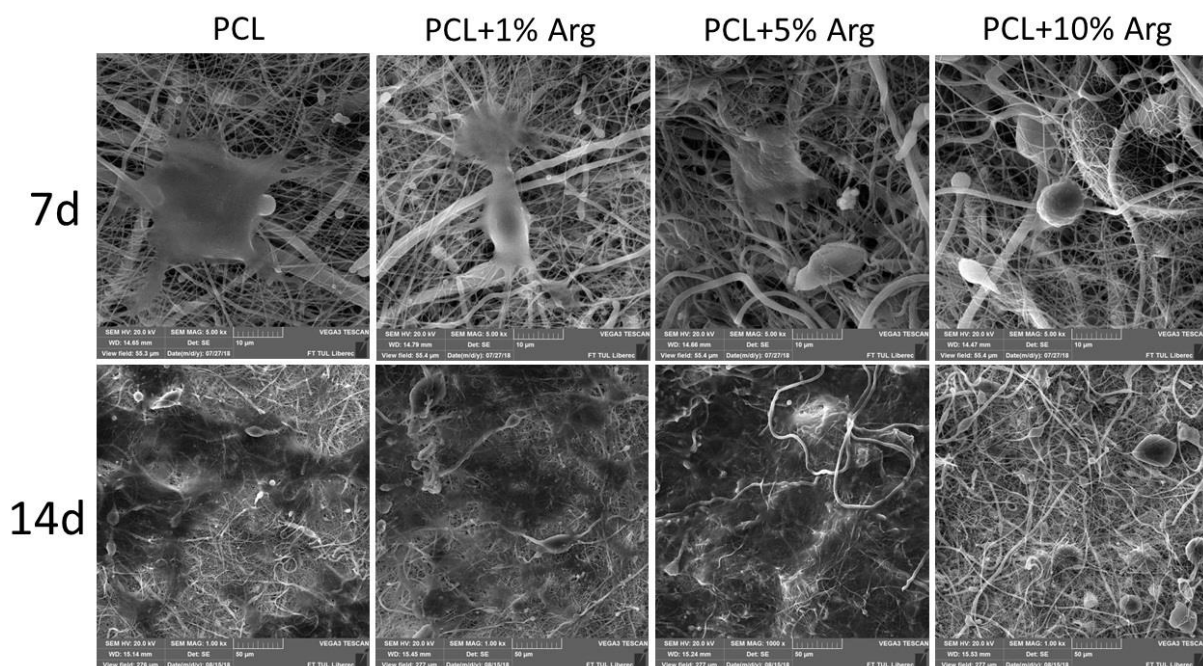
Pomocí obarvení jader byla také provedena kvantifikace buněčných jader pomocí automatického počítání v programu MATLAB. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet buněk na  $1 \text{ mm}^2$ . Výsledky jsou zobrazeny na obr. 21A.

Metabolická aktivita měřená pomocí MTT testu je zobrazena na obr. 21B. První testovací den (3. od nasazení buněk na materiály) byla metabolická aktivita buněk na PCL okolo 0,2, s obsahem argininu 1% a 5% se metabolická aktivita zvyšovala (PCL+1% Arg 0,24, PCL+5% Arg 0,36). Nejvyšší obsah argininu PCL+10% Arg vykazoval nejnižší metabolickou aktivitu (0,07). Druhý testovací den (7. den od nasazení buněk) došlo k mírnému poklesu metabolické aktivity buněk na materiálech se stejným trendem jako po 3 dnech kultivace. Po 14ti dnech kultivace metabolická aktivita na všech materiálech kromě PCL+10% Arg vzrostla – u PCL na 0,26, PCL+1% Arg na 0,32, PCL+5% Arg na 0,61. Nejnižší hodnotu metabolické aktivity konstantě během celého testování vykazoval materiál PCL+10% Arg (kolem hodnoty 0,7 po 3, 7 i 14ti dnech).



Obr. 21: Výsledky počtu buněk na 1 mm<sup>2</sup> povrchu elektrostaticky zvlákněných materiálů (PCL, PCL+1% Arg, PCL+5% Arg, PCL+10% Arg) po 3, 7 a 14ti dnech kultivace (A). Výsledky metabolické aktivity buněk na testovaných materiálech (B).

Pro zachycení buněk byly pořízeny i snímky pomocí elektronové mikroskopie, výsledky jsou zobrazeny na obr. 22. Testování probíhalo první den po nasazení, kde jsou patrné jednotlivé buňky a lze hodnotit jejich rozprostření po povrchu nanovlákněného tkáňového nosiče (1. řádek). U scaffoldu s nejvyšším obsahem argininu je na snímku patrná zakulacená buňka, což obvykle značí nevhodný povrch pro buněčnou adhezi. Na ostatních testovaných materiálech došlo k rozprostření fibroblastů. Dále pak byly pořízeny snímky na konci testování po 14 dnech kultivace, kde lze pozorovat pokrytí povrchu vrstvou fibroblastů. Na materiálu PCL+5% Arg lze vidět téměř konfluentní vrstvu buněk, naopak na materiálu PCL+10% Arg se nevyskytují žádné buňky.



Obr. 22: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie fibroblastů kultivovaných na elektrostaticky zvlákněném polykaprolaktonu (PCL) s přidavkem argininu (1, 5, 10%) po 1 dni (1. řádek, měřítko 10 µm) a 14 dnech (2. řádek, měřítko 50 µm).

### 9.3. Statistická vs. dynamická kultivace

Výše zmíněné postupy popisovaly tzv. statickou kultivaci, při které je buněčná suspenze aplikována na tkáňový nosič a inkubace probíhá v termostatu při 37°C. Obvykle tyto experimenty vedou k osídlení scaffoldu pouze na jeho povrchu, jelikož vnitřek 3D struktury neobsahuje dostatek živin a nepředstavuje tak ideální místo pro růst buněk. Rovnoměrnému rozmístění buněk ve 3D strukturách napomáhá tzv. dynamická kultivace s využitím bioreaktorů, které lépe simulují přirozené prostředí organismu v *in vitro* podmínkách. V bioreaktoru dochází k proudění či promíchávání média, což umožňuje prorůstání buněk do celé struktury tkáňového nosiče. Navíc může být materiál umístěný v bioreaktoru vhodným způsobem stimulován například mechanickým namáháním, což vede ke zvýšené produkci extracelulární hmoty a k „přestavbě“ scaffoldu do správné podoby před implantací. Bioreaktor by měl být zkonstruován s ohledem na cílovou aplikaci. Je nutné použití netoxických materiálů, které jsou snadno sterilizovatelné.

Velikost bioreaktorů při dynamické kultivaci se může značně lišit. Jedním ze směrů je tzv. scale up, kdy je možné využívat objemné bioreaktory např. pro testování 3D tkáňových nosičů. Jejich nevýhodou je vysoká spotřeba média. Druhým směrem je miniaturizace, která vede k vývoji orgánů na čipu, o kterých pojednává následující kapitola.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Swar S., Makova V., Horakova J., Kejzlar P., Parma P., Stibor I. A comparative study between chemically modified and copper nanoparticle immobilized Nylon 6 films to explore their efficiency in fighting against two types of pathogenic bacteria. *European Polymer Journal* 2019, 122: 109392. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109392

Horakova J., Oulehlova Z., Novotny V., Jencova V., Mikes P., Havlickova K., Prochazkova R., Heczkova B., Hadinec P., Sehr S., Wendel H.P., Bell C.M., Krajewski S. The assessment of electrospun scaffolds fabricated from polycaprolactone with the addition of L-Arginine. *Biomedical Physics & Engineering Express* 2020. DOI: 10.1088/2057-1976/ab756f

## 10. Orgány-na-čipu

Markéta Klíčová

*Důležité pojmy: orgán-na-čipu, mikrofluidika, dynamická kultivace*

### 10.1. Úvod

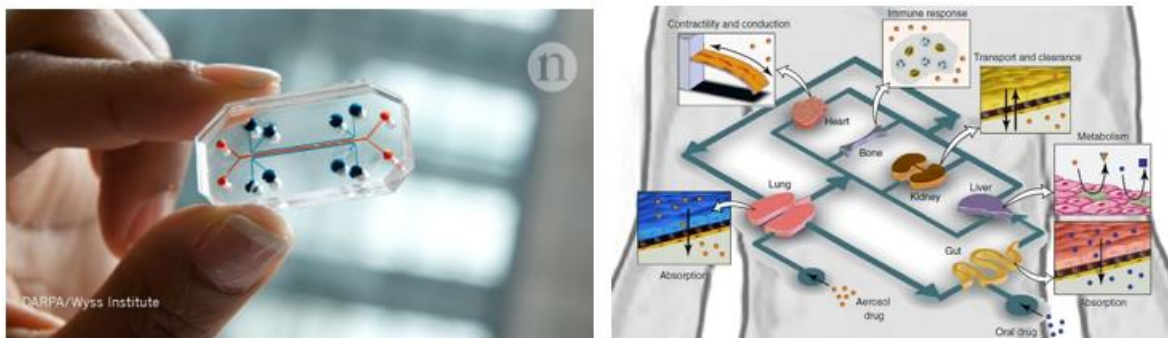
V posledních letech je často skloňován termín „orgán-na-čipu“, vzniká řada odborné literatury, přední světová pracoviště pracují na jejich rozvoji, a dokonce jsou zakládány nové technologické start-upy, které si kladou za cíl komercionalizovat tato testovací zařízení. Orgány-na-čipu nejsou náhrady nativních orgánů a tkání a nejsou ani určené k implantaci do lidského organismu (jako například vyvíjené scaffoldy, o kterých bylo diskutováno v dřívějších kapitolách). Orgány-na-čipu jsou malá (jednotky cm) většinou průhledná zařízení, která napodobují hierarchii, mechaniku a funkci živých lidských orgánů. Takové plíce na čipu se mohou skládat z plicních buněk ve více vrstvách, na které je působeno mechanickými silami tak, že je tkáň natahována a stlačována jako v případě procesu dýchání. Dalším příkladem může být např. srdce-na-čipu, složené z buněk srdečního svalu, které bijí ve stejném rytmu jako lidské srdce. Tento princip umožňuje zkoumat fungování lidského organismu v laboratorních podmínkách. Orgány-na-čipu slouží k co nejpřesnějšímu chování orgánů v našem těle, tak aby mohl být studován např. vliv nových léčiv na orgánovou funkci, a to i bez použití zvířecích modelů. Naše tělo je velmi dynamickým systémem a běžné testování lidských buněk ve statickém prostředí neboli „na Petriho misce“ přestává být dostačující nebo minimálně nestíhá trend rychlého vývoje nových léčiv a jejich komercionalizace.

Dalším podstatným důvodem vedoucím k potřebě vývoje orgánů-na-čipu je personalizovaná medicína. Aktuálně není možné přesně predikovat reakci pacientova těla na konkrétní léčiva, jejich kombinaci, dostačující koncentraci apod. V budoucnu by bylo možné osadit jednotlivé orgány-na-čipu přímo pacientovými buňkami a nejprve laboratorně vyzkoušet jejich odezvu na danou kombinaci léčiv, experimentální léčiva apod. Jednalo by se o rychlou a bezpečnou analýzu bez ohrožení lidského zdraví či použití jiných živých modelů. Tím se dotýkáme další problematiky, kterou by technologie orgánů-na-čipu vyřešila. Aktuálně je naprosto nezbytné otestovat nově vznikající léčiva v preklinických studiích na zvířecích modelech. Taková testování jsou opředena řadou etických otázek, které jsou do jisté míry neřešitelná, jelikož v současné době nejsou vhodné alternativy k ověření biokompatibility vyvíjených látek. Nesmíme také zapomenout na fakt, že žádný zvířecí model přesně neodpovídá realitě chování lidského organismu. Vždy se jedná o pouhé aproximace a v historii existuje několik případů, kdy výsledky zvířecího testování fatálně zkreslily biokompatibilitu nových léčiv. Např. V roce 2016 bylo testováno nové léčivo s účelem léčby symptomů Parkinsonovy choroby. Při testování léčiva BIA 10-2474, nebyla na myších modelech pozorována neurotoxicita, zatímco v malé klinické studii na lidských pacientech léčivo způsobilo závažné neurologické symptomy u testovaných osob, které dokonce v jednom z případů vedly ke smrti dobrovolníka. Pokud by se v budoucnu dokázaly vyvinout dostatečně funkční orgány-na-čipu, pak by se mohly zapojit do orgánových-soustav-na-čipu a vytvořit „tělo-na-čipu“ (viz Obr. 23) a tím minimálně výrazně redukovat počet animálních studií a preventovat ohrožení lidských dobrovolníků pro klinické studie. Na této problematice pracuje řada světově uznávaných vědců.



Hlavní důvody k podpoře vývoje orgánů-na-čipu:

- Urychlení a zlevnění vývoje nových léčiv. Zvýšení účinnosti, koncentrace, dávky apod. s minimálním použitím zvířecích modelů a bez ohrožení lidských pacientů.
- Omezení testování na zvířatech.
- Personalizovaná medicína, která může být realizována pomocí osazení modelových orgánů-na-čipu pacientovými buňkami. Vzniká tak možnost sledovat specifické odezvy i bez přímé expozice.
- Možnosti sledování chování orgánů na buněčném levelu s podstatně vyšším statistickým vyhodnocením. Testování na orgánech-na-čipu může být provedeno v takřka libovolném rozsahu opakování. (Např. stovky opakování v laboratoři na čipech není problém, zatímco na reálných modelech by bylo velice časově náročné realizovat takto rozsáhlý experiment.)
- Možnost studia jednotlivých onemocnění, jejich mechanismu působení, šíření apod., což může vést k zefektivnění postupů léčby, vývoji nových léčebných metod, prevence onemocnění a jejich vymýcení.



Obrázek 23: Plicí-na-čipu, první orgán-na-čipu v historii (vlevo). Možnost propojení jednotlivých orgánů-na-čipu do komplexního systému tzv. těla-na-čipu (vpravo).

Zdroje obrázků: (vlevo) <https://wyss.harvard.edu/media-post/lung-on-a-chip/> (vpravo) <https://www.elflow.com/microfluidic-reviews/organs-on-chip-3d-cell-culture/a-review-about-organ-on-chip/>.

## 10.2. Jak fungují orgány na čipu?

V úvodu bylo vysvětleno, proč jsou pro nás orgány-na-čipu tak prospěšné. Naše tělo není pouhou monovrstvou buněk na planární Petriho misce, která je staticky kultivována v inkubátoru. Některé primární kultury jsou sice v podobném prostředí (za předpokladu přítomnosti vhodného média, teploty a pH) schopné života, nicméně při této kultivaci jsou zcela opomíjeny biomechanické procesy reálných tkání. Nejen proto byly v posledních letech vyzkoušeny další přístupy možnosti kultivace buněk, kdy např. buňky cévního endotelu byly pěstovány v mikrokanálcích, ve kterých konstantně protékalo kultivační médium. Dynamický způsob kultivace je pro tento typ buněk daleko přirozenější v porovnání s vypěstováním planární vrstvy buněk v Petriho misce. Právě přirozeného chování buněk se snažíme dosáhnout v laboratorních podmínkách, jelikož čím více se uměle pěstované buňky přiblíží reálnému chování v lidském organismu, tím „správnější“ odezvu a predikci získáme. Tím se vracíme opět

k orgánům-na-čipu. Orgány-na-čipu představují lidské buňky pěstované na malých (jednotky cm krát jednotky cm) biokompatibilních substrátech. Tyto struktury byly navrženy tak, aby co nejvíce simulovaly tvar, mechaniku a funkci lidských orgánů. Proto se také vědní obor nazývá orgány (buňky) na čipu (mikro-prostředí).

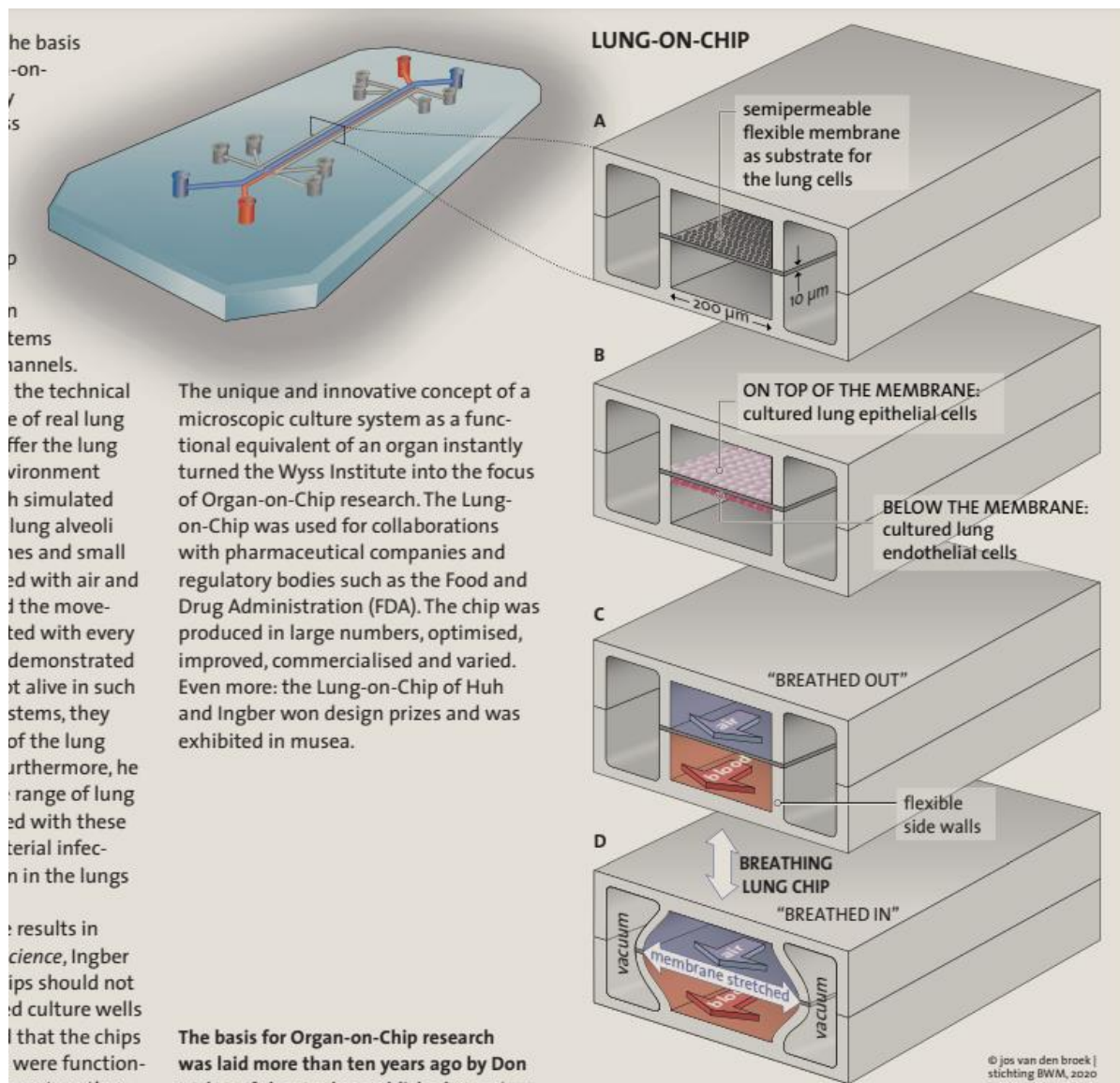
Pro přípravu funkčního modelu orgánu-na-čipu jsou tak potřeba buňky, jejichž typ záleží na konkrétní aplikaci. Plíce na čipu jsou složeny z plicních buněk, které však nejsou jediným typem buněk, které se nativně vyskytují v našich plicích. Běžně se naše orgány skládají z více typů buněk, které jsou uspořádány ve více vrstvách. Plicní sklípky se skládají z epitelových buněk, které se vyskytují v místě proudění vzduch, a které jsou odlišné od buněk, které jsou přítomné na jiných místech plicních sklípků, kde proudí krev skrze cévy. Do čipu mohou být vloženy např. buňky odebrané biopsií přímo od lidských dárců, případně vypěstované buňky z dárcovských kmenových buněk, buňky z nádorových linií apod. Buňky jsou kultivovány na porézních membránách uprostřed čipu, jak lze vidět na Obr. 23.

Čip musí být designován tak, aby bylo co nejvíce napodobeno přirozené prostředí. Kromě toho, že běžné testování na Petriho miskách, které se snaží orgány-na-čipu překonat, neumožňuje působení mechanických sil, je také struktura běžného kultivačního plastiku velmi rigidní. V našem těle jsou však orgány měkké a flexibilní. Z těchto důvodů jsou čipy připravovány z materiálů, které se přizpůsobí mechanickému namáhání. Jedná se často o silikonové struktury (např. na bázi polydimethylsiloxanu – PDMS), jejichž biokompatibilita je dobře ověřena a nedochází tak ke zpomalení buněčné adheze a proliferace. K dynamické kultivaci je pak zapotřebí další zařízení, kterým mohou být mikropumpy pro rozvádění kultivačního média kanálky čipu.

### **10.3. První orgán-na-čipu: plíce**

V roce 2010 publikoval profesor Donald E. Ingber a jeho tým (Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, Harvard Medical School) v prestižních časopise Science zmínku o prvním orgánu-na-čipu na světě, kterým byly plíce. Vědec Dongeun Huh z týmu profesora Ingbera kultivoval různé buněčné typy v malých kultivačních systémech s mikro-fluidními kanálky. Vědci se tehdy soustředili na co nejpřesnější simulaci plicních sklípků. Uprostřed čipu (uvnitř v podélném horizontálním řezu středového kanálku) se vyskytovala polopropustná membrána, na které byly z jedné strany nasazeny plicní epitelové buňky, a z druhé strany membrány byly nasazeny plicní endotelové buňky. Membrána rozdělila kanálek podélně na dvě části. V jedné části kanálku pak proudil vzduch (nad epitelovými buňkami) a ve druhé protékala krev (v kontaktu s endotelovými buňkami). Čip byl mechanicky natahován a stlačován, aby bylo simulováno dýchání. Ve výzkumu bylo ukázáno, že pokud dojde k této speciální kultivaci, zůstane zachována funkčnost plicních buněk a dojde k poměrně přesné simulaci plicních sklípků *in vitro*. Bylo také prověřeno, že tyto plíce-na-čipu mohou sloužit k demonstraci různých plicních onemocnění od bakteriálních infekcí po patologickou akumulaci tekutin. Později v roce 2020 mohl být tento model okamžitě použit při zkoumání onemocnění covid-19. Možnost rychlého laboratorního experimentu bez schvalovacích procesů je naprosto zásadním pokrokem. Profesor Ingber poukázal, že tento vynález není pouze pokročilou metodou dynamické kultivace buněk, ale že se skutečně podařilo napodobit funkci celého orgánu. Vynález byl tak významný, že vývoj orgánu-na-čipu doposud zůstává hlavním výzkumným

směrem prestižních světových pracovišť, plíce-na-čipu byly použity farmaceutickými firmami, FDA (Food and Drug Administration)<sup>7</sup> a dalšími subjekty. Vznikla řada start-upů v tomto oboru. Profesor Ingber se stal jedním z nejcitovanějších vědců světa a obdržel řadu ocenění.



Obr. 14: **PŘEKRESLIT.** Hierarchie plic-na-čipu. Popis mikrofluidního systému a způsobu dynamické kultivace buněk.

<sup>7</sup> Úřad pro kontrolu potravin a léčiv – vládní agentura USA zodpovědná za regulaci potravin, doplňků stravy a léčiv

### **Použitá a doporučená literatura:**

Towards new research models for studying disease and finding treatments: Mini Organs-on-Chip. Biosciences and Society, 2020. Cahier 3. 39th volume. Dutch Foundation BWM. ISBN/EAN 978-94-93232-01-3.

Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level functions on chips. *Science*, 2010, 328 (5986): 1662-1668. DOI: 10.1126/science.1189401

Benam K.H., Mazur M., Choe Y., Ferrante T.C., Novak R., Ingber D.E. Human Lung Small Airway-on-a-Chip Protocol. *Methods Mol Biol*, 2017, 1612: 345-365. DOI: 10.1007/978-1-4939-7021-6\_25. PMID: 28634955.

Bai H., Ingber D.E. What Can an Organ-on-a-Chip Teach Us About Human Lung Pathophysiology? *Physiology* 2022, 37(5): 242-52. DOI: 10.1152/physiol.00012.2022. ISSN 1548-9213

# 11. *In vivo* testování tkáňových nosičů

Jana Horáková

*Důležité pojmy:* *in vivo* testování, modelové organismy, princip 3R, plán pokusu na zvířeti

Předchozí kapitoly pojednávaly o testování v laboratorních podmínkách – *in vitro* při statické kultivaci či s pokročilejšími technologiemi využívajícími modelové tkáň v mikroměřítku. Současná metodika hodnocení bezpečnosti biomateriálů se však opírá mimo jiné i o testování materiálů na laboratorních zvířatech – tzv. testování *in vivo* (=v živých organismech). Tento typ testů předchází klinickému testování na lidských subjektech.

## 11.1. Historie pokusů na zvířatech

Historie experimentů na zvířatech je velmi dlouhá, první písemné zmínky se objevují už od starověkých Řeků a Římanů. Například římský lékař Galén prováděl veřejné zákroky na zvířatech, aby demonstroval, jak fungují živé organismy. Jednalo se o kruté zákroky, které by dnešní medicína neschvalovala, nicméně v dřívějších dobách tyto experimenty napomohly k objasnění mnoha neznámých faktů o lidském těle. Dříve se prosazovala myšlenka pocházející od řeckého filozofa Aristotela o nadřazenosti člověka nad zvířaty. Aristoteles tvrdil, že zvířata jsou předstupněm člověka, mající tzv. citovou duši, lidem pak byla připisována tzv. rozumová duše.

Zpočátku byly experimenty na zvířatech kruté, nicméně co do četnosti se jednalo spíše o ojedinělé pokusy. S postupující dobou však rostla zvědavost a začalo se testovat více systematicky. Jedním z dalších „zvířecích experimentátorů“ byl anglický lékař William Harvey (16.-17. století), který se proslavil objevem krevního oběhu. Svou teorii ověřoval na 90ti živočišných druzích. Poprvé správně popsal fungování srdce a cévního systému. Ve stejném období působil i filozof René Descartes, který tvrdil, že zvířata nemají duši ani vědomí, a tudíž nemohou cítit bolest. Jeho myšlenky tak „legalizovaly“ tehdejší experimenty na zvířatech.

Dalším významným vědcem využívajícím zvířata pro své objevy byl francouzský biolog a chemik Louis Pasteur (19. století). Studoval přenos infekčních chorob a položil základy vakcinace. Vyvinul očkování proti vzteklině.

Ve 20. století dochází k dalším významným objevům díky využití laboratorních zvířat. Kanadský lékař Frederick Banting získal Nobelovu cenu za objev léčebného účinku insulinu (1923), což vedlo k průlomům v léčbě diabetu. Své experimenty začínal na psech, později je potvrdil také na kravách.

Výčet významných objevů by mohl být mnohem delší, je však nad rámec této kapitoly. Využití zvířat pro výzkum přineslo mnoho významných objevů, které zachránily nespočet lidských životů. Na druhou stranu je využití zvířat otázkou etiky. V dřívějších dobách nebylo experimentování na zvířatech nijak regulováno, dnes samozřejmě je využití zvířat zakotveno v legislativě, v České republice se konkrétně jedná o zákon č. 246-1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání.

## 11.2. Princip 3R

Snahy o řešení regulace testování na zvířatech se vyskytují od 19. století v Evropě i v USA. V roce 1959 biologové Russel a Burch stanovili tzv. koncepci 3R v knize „Principy humánní experimentální techniky“, která má zajistit odpovědné použití zvířat ve vědeckých studiích. Jedná se o zkratku 3 slov: Replacement, Reduction, Refinement. Prvním principem je tzv. nahrazení (Replacement). Pokud existuje alternativní metoda pro dosažení stejného vědeckého poznatku, měla by být primárně využita. Jako příklad lze uvést *in vitro* modely tkání nebo orgány-na-čipu. Druhým principem je snižování (Reduction). Ve studii by mělo být použito co nejméně zvířat pro získání dostatečné informace. Z každého experimentu by také mělo být získáno co nejvíce informací (např. aplikace více materiálů na jedno zvíře, pokud je to možné – např. kožní kryty apod.). Příliš nízký počet zvířat by ale mohl vést k neprůkaznosti testované hypotézy, proto je vhodná konzultace s odborníky na statistiku. Posledním principem je tzv. zmírňování (Refinement), které má zajistit zmírnění potenciálního utrpení zvířat během experimentů.

## 11.3. Experimenty se zvířecími modely

Pro výzkum se nejčastěji používají laboratorní myš a potkan díky nízkým nákladům, snadné manipulaci a rychlé reprodukci. Laboratorní myš domácí (*Mus musculus*) je nejpočetněji využívané laboratorní zvíře pro *in vivo* experimenty. Potkan (*Rattus norvegicus*) je větší než myš, jedná se o druhý nejčastěji využívaný druh pro experimenty. Dále se hojně využívají králíci, morčata, kočky, psi, prasata (domácí / miniprasata), ovce, primáti. Zvířata jsou speciálně chována k testovacím účelům, pokusy musí být schválené na několika úrovních.

Pokud se plánuje experiment na zvířeti jako např. testování vyvíjeného scaffoldu na zvířecím modelu, je nutné sepsat tzv. projekt pokusu, kde je přesně specifikováno, kolik zvířat bude ve studii použito, jak dlouho se bude zvíře sledovat, jaká bude podávána medikace, jaké parametry se budou hodnotit apod. Projekt pokusu je závazný a nelze se od něj během samotného experimentu odchýlit! Pokud by došlo k neplánovaným změnám, je nutné sepsat nový projekt pokusu a ten nechat opět odsouhlasit, což je poměrně dlouhý proces. K projektu pokusu se nejprve vyjadřuje odborná komise pracoviště, kde má testování probíhat. Dále ho schvaluje ministerstvo, pod které pracoviště spadá (Ministerstvo zdravotnictví, Ministerstvo zemědělství, Akademie věd ČR).

Při plánování pokusu na zvířecím modelu je nutné zohlednit několik hledisek a správně navrhnout design experimentu. Klíčový je výběr vhodného modelového organismu pro testování vyvíjeného tkáňového nosiče. Obvykle se v první fázi volí menší živočichové (myš / potkan / králík). Důležité je také místo implantace, doba sledování zvířete, metody sledování během experimentu a metodika hodnocení po ukončení pokusu. Musí být brány v potaz principy 3R, což znamená, že metodu nelze nahradit alternativní *in vitro* metodou, ve studii je použit co nejmenší počet zvířat pro získání relevantního výstupu, experiment je prováděn co „nejšetrněji“ k testovaným zvířatům, hodnocení výstupů experimentů je co nejdetajnější (je provedeno co více analýz pro získání maximálního množství informací).

Pro materiálové inženýry je nutné seznámit se s anatomii cílového orgánu / tkáně testovaného zvířete. Scaffold se obvykle vyvíjí pro aplikace v humánní medicíně, proto některé parametry

jako např. velikost apod. musí být upraveny pro testování na zvířecích modelech. Také je nutné mít neustále na paměti, že výsledky *in vivo* stále nezaručují fungování i na jiných živočišných druzích. Mezi zvířecími druhy existují značné mezidruhové rozdíly, které mohou významně ovlivnit závěry provedených experimentů. Na druhou stranu otestování scaffoldu v živém systému dodá nové informace, které nelze získat v *in vitro* podmínkách. V živém organismu dochází k interakci se všemi tělními systémy – v první řadě se jedná o imunitní systém, který zajistí prvotní interakci s materiálem, dále dochází k interakcím s krevním systémem, nervovým systémem, hormonálním systémem a dalšími.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Houdek F. Krutá historie pokusů na zvířatech. *Vesmír* [online]. 2018 [cit. 2023-10-26].

Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/on-line-clanky/2018/05/kruta-historie-pokusu-na-zviratech.html>

Rozkošová M. *Etický vztah ke zvířatům*. Hradec Králové, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové.

## 12. Etické otázky tkáňového inženýrství

Markéta Klíčová

*Důležité pojmy: kmenové buňky, autogenní/alogenní/xenogenní dárce, Helsinská Deklarace, HeLa buňky*

Z předchozích kapitol je jistě patrný velký vliv tkáňového inženýrství na moderní regenerativní medicínu. Aktuálně je vyvíjena celá řada produktů, které by v budoucnu mohly přinášet zcela nové možnosti léčby a regenerace tkáně. Tkáňové inženýrství tak otevírá další příležitosti, ale také pomáhá odstranit morální dilemata. Co je myšleno morálním dilematem? Pro ilustraci si představme situaci, kdy zdravý jedinec stojí před závažným rozhodnutím, zda darovat ledvinu pacientovi, který je závislý na nalezení vhodného dárce. Přestože rizika takové operace jsou ekvivalentní běžnému středně velkému operačnímu výkonu, stále se jedná o zásah do lidského organismu. Na druhou stranu život nemocného člověka bez jediné funkční ledviny je velice náročný a statisticky kratší. *Měl by tedy darovat orgán či nikoli?* Tkáňové inženýrství si klade za cíl uměle vypěstovat příslušné orgány pro transplantaci, což znamená, že kromě dárců bude existovat další možnost získání orgánu. Tato vědní disciplína tak řeší nastíněné morální dilema, je ale důležité si uvědomit, že na druhou stranu přináší řadu etických otázek, na které vůbec není jednoduché jednoznačně odpovědět. Těmto otázkám se věnuje následující kapitola.

Na konci 20. století došlo k prvnímu úspěšnému klonování savců metodou nukleárního transferu<sup>8</sup>. V roce 1996 se po úspěšném experimentu narodila ovce Dolly, genetická kopie dospělého jedince ovce domácí. Na tento experiment navazuje další výzkum, kdy v roce 2018 došlo k prvnímu klonování primátů a narození identických dvojčat opic. Tento výzkum už je jen krůček vzdálený od klonování lidského druhu, které je jistě silně kontroverzním tématem. Další diskutabilní událostí je operace, provedená v roce 1984, kdy došlo ke xenogennímu dárce orgánu. Novorozenci se smrtelnou srdeční vadou bylo implantováno srdce paviána. Došlo však k rejekci transplantátu a dítě zemřelo za tři týdny od operace. Mladý pacient bez vhodného transplantátu neměl šanci na přežití, uvědomme si ale, že takto byly ukončeny životy dva – pacienta i dárce. Také tento případ zahájil řadu etických diskusí.

Z historie je patrné, že nové vědecké poznatky a experimenty v medicíně, které balancují na hraně kontroverze, přirozeně vyvolávají potřebu reagovat na otázky ohledně etiky. Většina produktů tkáňového inženýrství se zatím nachází ve fázi preklinického výzkumu, nicméně již nyní se k této vědní disciplíně váže řada etických otázek a s rozvojem tkáňového inženýrství jich v budoucnu můžeme očekávat stále více. Aktuálně jsou nejpálčivější dvě otázky. První z nich je více filozofická, týká se narušení „přirozenosti“. Tkáňové inženýrství kombinuje principy inženýrství a přírodních věd pro vývoj produktů, které opravují, udržují nebo vylepšují funkci lidské tkáně nebo orgánu, což je samotná definice tkáňového inženýrství, kterou formulovali Langer a Vacanti v roce 1987. Medicína už nemusí pracovat pouze s dostupným biologickým materiálem, ale najednou je možné vypěstovat zcela novou – třeba i vylepšenou - tkáň. Takové možnosti by jistě bylo vhodné nějakým způsobem regulovat. Druhá aktuálnější

---

<sup>8</sup> Nukleární transfer – forma klonování, kdy dochází k přenosu jádra (s obsahem DNA) buňky do neoplozeného vajíčka, kterému bylo vlastní jádro odstraněno



otázka se týká problematiky získávání kmenových buněk. Kmenové buňky jsou pro tkáňové inženýrství velice prospěšné. Mohou být získány od autogenních, allogenních i xenogenních dárců, ikdyž pro budoucí použití v lidské medicíně se preferuje dárcovství mezi dvěma osobami. Jejich extrakci lze provést například z kostní dřene dospělého jedince, nicméně takto získané buňky je náročné efektivně kultivovat, i při úspěšné kultivaci je komplikací jejich nízká životnost. Navíc dospělé kmenové buňky mají již určený buněčný typ, který nemůže být změněn na jiný a tím pádem je značně limitováno jejich využití v konkrétních aplikacích. Naopak unikátním zdrojem jsou embryonální kmenové buňky. Embryonální kmenové buňky jsou totiž pluripotentní a lze je tak stimulovat k vývoji jiných kmenových a dalších diferenciovaných buněk. Při jejich použití by tak nebylo nutné extrahovat a kultivovat všechny jednotlivé buněčné typy z lidského organismu. Embryonální kmenové buňky lze získat z nadbytečných *in vitro* uměle oplodněných vajíček, které byly kultivovány v rámci léčby neplodnosti. Pokud bylo úspěšně vytvořeno více embryí, než je potřeba pro oplodnění pacientky, nejsou nadbytečná embrya implantována do těla ženy. Naopak, po cca pěti dnech, kdy se oplodněné vajíčko nachází ve fázi blastocysty, může dojít k extrakci kmenových buněk a jejich následné kultivaci *in vitro*. Sice je tak možné získat dostatek buněk, ale dojde ke zničení embrya. *Je to tak správné či nikoli?*

### 12.1. Filozofické přístupy k etickým otázkám

Existují dva přístupy, které se věnují vysvětlení této problematiky. Prvním z nich je takzvaný **konceptualismus**, který říká, že embryo má stejný morální status jako novorozenec, jelikož lidský život začíná v koncepci neboli početí, kdy dojde ke splynutí gamet. Konceptualismus staví na tom, že embrya mají potenciál, aby se staly dítětem, a neexistuje žádný specifický okamžik, ve kterém můžeme tvrdit, že zárodek nebo embryo se stává člověkem. Na druhou stranu proti-argumentem je, že nadbytečná embrya nemohou být použity pro oplodnění, z čehož plyne, že nemají šanci na přežití a tudíž tento potenciál nemají.

Druhým filosofickým přístupem je tzv. **gradualismus**. Gradualismus je založen na schopnosti vnímat. Hlavní myšlenkou gradualismu je, že embryo nedokáže vnímat a prožívat. Problémem této teorie je otázka „*A opravdu nemůže?*“. *A jaký stupeň vnímání je vůbec dostatečný, abychom ho považovali za lidský prožitek?* Cítíme, že na tyto otázky odpovědět neumíme a ani gradualismus tak neřeší všechny etické problémy. Rozdílem těchto dvou přístupů je, že gradualismus popírá stejnou hodnotu embrya a narozeného dítěte. Naopak oba směry se shodují v tom, že morální hodnota embrya je vyšší než ostatních buněk. Opět ale narážíme na problém subjektivity morální hodnoty.

### 10.3. Etické otázky získávání buněk a komercializace produktů tkáňového inženýrství

Další možnost, jak získat kmenové buňky, je extrakce z potracených plodů. Potracené plody také nemají potenciál se stát lidskou bytostí. Navíc stejně dochází k jejich likvidaci, a proto lze položit otázku, zda by nebylo prospěšné neplýtvat tolik významným biologickým materiálem. Odpověď znovu záleží na subjektivním názoru jedince a jeho pohledu na život, který se odvíjí od prostředí a kultury, ve kterých vyrůstá, od náboženství, které vyznává apod. S potracenými plody i nadbytečnými embryi při *in vitro* oplodnění je případně manipulováno za informovaného souhlasu matky (páru).

Další eticky problematickou oblastí je komercializace produktů tkáňového inženýrství. Pokud budou v budoucnu existovat firmy pro dodávání *in vitro* vypěstovaných orgánů, jistě budou chtít ze své činnosti profitovat. *Je to vůbec morální? A měli by dárce buněčných kultur, které byly použity pro vývoj produktů, obdržet finanční kompenzaci?* Existují dva modely, které se touto problematikou zabývají. Prvním z nich je **transplantační paradigma**. Pokud se dárce rozhodne pravidelně darovat například krev, nevybírání si, kdo bude příjemce, konkrétně jakého bude pohlaví, náboženského vyznání, věku, rasy atd. Transplantační paradigma říká, že jakmile darujeme biologický materiál pro transplantaci, nemáme na jeho další osud vliv. Problematiku darování buněk pro tkáňové inženýrství popisuje **výzkumné paradigma**. Existuje tzv. **Helsinská Deklarace**, jejíž cílem je stanovit etické zásady, kterými by se měli lékaři a vědci řídit při výzkumu, který je prováděn buď přímo na lidském druhu, nebo na základě lidského biologického materiálu. Byla poprvé přijata v roce 1964 a od té doby byla několikrát aktualizována. V Helsinské Deklaraci bylo ustanoveno, že dárcovství je dobrovolné po informovaném souhlasu, poskytnuté údaje by měly dárce jednoznačně vysvětlovat, o jaký výzkum se bude jednat, co bude jeho výsledkem apod. To je rozdíl oproti transplantačnímu paradigma, kde si dárce nevybírání, pouze se rozhoduje, zda darovat či nikoli. Další rozdíl se týká budoucnosti darovaného materiálu. Švédská Biobank Act zavedla, že dárce si může materiál vyžádat zpět a zodpovědná osoba rozhodne, zda biologický materiál opravdu žadateli vrátit či zda zůstane uložen, ale bude učiněn neidentifikovatelným. Otázkou zůstává, jak je možné zbavit buněčný materiál identifikace, když jistě obsahuje DNA dárce. Můžeme tedy říct, že dárcovství buněk pro výzkum se opírá o Helsinskou Deklaraci a dárce o svém buněčném materiálu může dále rozhodovat.

V obou paradigmatech je zdůrazňováno, že se jedná o dar, který není finálně odměněn, jelikož lidský biologický materiál nevlastníme a není možné s ním obchodovat (viz nelegální obchod s orgány). *Je tedy v pořádku, aby firma prodávala produkty, které dostala zadarmo?* To jistě není fér vůči dárce, na druhou stranu je nutné si uvědomit multidisciplinaritu tkáňového inženýrství. Tkáňového inženýrství nestojí pouze na dárce a poskytnutých buňkách. Za vývojem scaffoldů stojí celý tým buněčných biologů, materiálových inženýrů, lékařů a expertů ve všech odvětvích přírodních věd. Ti přináší do oboru svou znalost, intelektuální úsilí a samozřejmě fyzickou práci v laboratoři. Na takový výzkum je potřeba specializované pracoviště, které je finančně náročné z hlediska výbavy i údržby. Potom je jistě akceptovatelné, že firmy a vědci mohou profitovat z produktů tkáňového inženýrství, byť realizace jejich výzkumu částečně vychází z darovaných buněk.

Na závěr krátce uvedeme významnou událost tkáňového inženýrství. V roce 1951 byly odebrány rakovinné buňky (cervikální karcinom) pacientce Henriette Lacks. Tehdejší vědečtí pracovníci vyzkoušeli buňky pěstovat *in vitro* a zaznamenali úspěch. Vůbec poprvé v historii se podařilo úspěšně kultivovat lidské buňky a dodnes je tato tzv. HeLa buněčná linie součástí mnoha tkáňových laboratoří. Mluví se o tzv. nesmrtelné linii, jelikož buňky se stále dělí, tedy rozmnožují. V polovině dvacátého století neexistoval žádný etický kodex ohledně odběru lidských buněk pro výzkum, Henrietta Lacks nebyla informována a vlastně nedala souhlas k odběru pro experimentální biologii (odběr proběhl v rámci rutinní cytologie). Avšak její buňky později umožnily vyvinout vakcínu proti dětské obrně, byl na nich prováděn výzkum

rakoviny, AIDS, a dalších závažných onemocnění. Dokonce se HeLa buňky dostaly i do vesmíru, kde na nich byly pozorovány účinky nulové gravitace. Její – byť neinformované – dárcovství nepřímo zachránilo spoustu životů a významně urychlilo medicínský výzkum. O jejím životě existuje kniha *The Immortal Life of Henrietta Lacks* a stejnojmenný film.

V prvním odstavci kapitoly bylo nastíněno řešení nedostatku orgánů pomocí pěstování tkáně *in vitro*. To je elegantním řešením morálního dilematu, nikoli však etických problémů. Většina produktů tkáňového inženýrství se zatím nachází na začátku vývoje, nicméně již nyní se k této vědní disciplíně váže řada etických otázek. Tyto otázky nemohou být zodpovězeny samotnou vědou, ale žádají vznik nových nástrojů, které budou posuzovat a regulovat vývoj nových produktů. Zkuste se samostatně zamyslet nad nastíněnými otázkami a ideálně porovnejte své názory s okolím.

### **Použitá a doporučená literatura:**

Welin S. Ethical issues in tissue engineering, Chapter 22. In: *Tissue Engineering* [online], 2008 Burlington: Academic Press, 685–703 [vid. 2020-07-20]. ISBN 978-0-12-370869-4. Dostupné z: DOI:10.1016/B978-0-12-370869-4.00022-7

Welin S. Ethical Issues in Tissue Engineering, Chapter 23. In: *Tissue Engineering (Second Edition)* [online], 2014. Oxford: Academic Press, 809–838 [vid. 2020-07-20]. ISBN 978-0-12-420145-3. Dostupné z: DOI:10.1016/B978-0-12-420145-3.00023-7

Field D., Davies N. *Biocode: The New Age of Genomics*. B.m.: OUP Oxford, 2015. ISBN 978-0-19-151157-8.