

Editori:

Lucie Wolfová

Lucy Vojtová

Lucie Jurečková

Lenka Kohutová

Úvod do tkáňového inženýrství



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato publikace vznikla v rámci realizace projektu
ESF OPVK Škola molekulárních biotechnologií - Lékařské nanobiotechnologie,
reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0144



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Žadatel projektu a partneři:



Úvod do tkáňového inženýrství

Editoři: Lucie Wolfová, Lucy Vojtová, Lucie Jurečková, Lenka Kohutová

ISBN ???

Toto dílo je chráněno autorským právem. Ustanovení se vztahuje na dílo jako celek nebo jeho části, zejména v případech pořizování překladů, tisku, citace a použití ilustrací. Bez souhlasu firmy Contipro nelze dílo nebo jeho části kopírovat v souladu s právě platným zákonem o právu autorském na území České republiky. Porušení autorských práv bude stíháno v souladu s platnou legislativou.

Adaptované ilustrace vypracovala Hana Kotlandová.

Vytiskla firma MediaBros s.r.o.

ANOTACE

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární vědní obor, který v sobě zahrnuje spojení znalostí z oblasti chemie, fyziky, biologie, inženýrství nebo medicíny. Tento nový vědní obor je definován jako aplikace principů a metod inženýrství a přírodních věd, vedoucí k základnímu porozumění mezi strukturou a funkcí zdravých a poškozených tkání savců a vývoji jejich biologických náhrad, vedoucích k jejich regeneraci, obnovení nebo vylepšení funkce. Cílem tkáňového inženýrství je vývoj biokompozitních materiálů pro regeneraci poškozených tkání a orgánů, a to za pomoci nových materiálů, imitujících strukturu živé tkáně, nebo kombinace buněk a materiálů, tzv. scaffoldů, které slouží pro umělé vytvoření nebo náhradu přirozeného prostředí buněk.

Dle tohoto se tkáňové inženýrství a také tato skripta dělí na tři základní části: první věnující se vývoji vhodných materiálů, druhá zaměřená na buňky, jejich izolaci, kultivaci a zabezpečení jejich dostatečného počtu a kvality pro efektivní léčbu a třetí část věnující se právě kombinaci těchto materiálů a buněk a tak vývoji finálního produktu pro léčbu specifických poškozených tkání nebo orgánů.

ABSTRACT

Tissue engineering is a multidisciplinary field which combines the knowledge of chemistry, physics, biology, engineering or medicine. It is defined as a scientific discipline which applies the principles and methods of engineering and life sciences in order to understand the relationship between structure and function of healthy or damaged mammalian tissue and to develop its biological substitutes that regenerate restore or improve its function. The aim of tissue engineering is the development of biocomposite materials, favourably in combination with appropriate cells, which lead to successful regeneration of damaged tissue and organs and the development of new materials to be used as artificial natural environment for cells or mimicking the structure of living tissue and extracellular matrix.

According to this description, tissue engineering and also this manuscript are divided in three parts: the first part deals with development of suitable materials, the second part focuses on cells and their isolation, cultivation and achieving sufficient quantity and quality for effective treatment, and the final part describes the combination of the materials and the cells to develop the final product for treating damaged tissues or organs.

OBSAH

1	TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	1
1.1	HLAVNÍ SMĚRY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ.....	4
1.2	BUŇKY.....	6
1.3	SCAFFOLDY.....	7
1.3.1	ROZDĚLENÍ SCAFFOLDŮ Z HLEDISKA JEJICH STRUKTURY.....	12
1.3.1.1	HYDROGELY.....	12
1.3.1.2	PORÉZNÍ SCAFFOLDY.....	13
1.3.1.3	VLÁKENNÉ SCAFFOLDY.....	14
1.4	REFERENCE A SLOVNÍK POJMŮ.....	15
2	SYNTETICKÉ POLYMERY A BIOPOLYMERY VYUŽITELNÉ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	19
2.1	ÚVOD.....	19
2.2	SYNTETICKÉ POLYMERY.....	20
2.2.1	POLYESTERY.....	21
2.2.1.1	POLY(α -ESTERY).....	22
2.2.1.2	POLY (β -ESTERY).....	25
2.2.1.3	POLYLAKTONY.....	25
2.2.1.4	BLOKOVÉ KOPOLYMERY S PEG.....	26
2.2.1.5	POLYESTERKARBONÁTY.....	27
2.2.1.6	POLYESTERURETANY.....	28
2.2.1.7	POLYPROPYLENFUMARÁTY.....	28
2.2.1.8	POLYORTOESTERY.....	29
2.2.2	POLYANHYDRIDY.....	29
2.2.3	POLYALKYLKYANOAKRYLÁTY.....	30
2.2.4	POLYIMINOKARBONÁTY.....	30

2.2.5	POLYFOSFAZENY.....	30
2.2.6	POLYFOSFOESTERY.....	31
2.3	BIOPOLYMERY A JEJICH KOMBINACE SE SYNTETICKÝMI POLYMERY.....	31
2.3.1	PROTEINY.....	31
2.3.1.1	TRIPLEPTIDOVÁ SEKVENCE RGD.....	32
2.3.1.2	KOLAGEN.....	32
2.3.1.3	ELASTIN.....	33
2.3.2	POLYSACHARIDY.....	34
2.3.2.1	CHITOSAN.....	34
2.3.2.2	CELULÓZA.....	35
2.3.2.3	KYSELINA HYALURONOVÁ.....	35
2.4	POLYMERNÍ NANOKOMPOZITY.....	36
2.5	REFERENCE A SLOVNÍK POJMŮ.....	36
3	BUŇKY A TKÁŇOVÉ KULTURY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	47
3.1	HISTORIE TKÁŇOVÝCH KULTUR.....	47
3.2	TYPY TKÁŇOVÝCH KULTUR.....	48
3.2.1	LINIOVÉ BUŇKY.....	48
3.2.2	PRIMOKULTURY.....	50
3.2.3	SUSPENZNÍ A ADHERENTNÍ TKÁŇOVÉ KULTURY.....	50
3.2.4	TYPY TKÁŇOVÝCH KULTUR Z HLEDISKA DIFERENCIACE.....	51
3.2.5	SBÍRKY TKÁŇOVÝCH KULTUR.....	54
3.3	KULTIVACE TKÁŇOVÝCH KULTUR.....	54
3.3.1	KULTIVAČNÍ NÁROKY TKÁŇOVÝCH KULTUR.....	54
3.3.1.1	KULTIVAČNÍ PODMÍNKY.....	55
3.3.1.2	MÉDIA A SUPLEMENTY.....	56
3.3.2	BUNĚČNÁ IZOLACE.....	57
3.3.3	BUNĚČNÝ RŮST.....	58
3.4	CHARAKTERISTIKA TKÁŇOVÝCH KULTUR.....	60
3.4.1	MIKROSKOPICKÉ POSOUZENÍ KULTURY.....	60

3.4.2	POVRCHOVÉ ZNAKY.....	62
3.4.3	STANOVENÍ CHARAKTERISTICKÉ FUNKCE BUNĚK.....	63
3.5	REFERENCE A SLOVNÍK POJMŮ.....	66
4	APLIKACE TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ.....	71
4.1	POJIVOVÉ TKÁNĚ.....	71
4.1.1	KLOUBNÍ (HYALINNÍ) CHRUPAVKA.....	71
4.1.1.1	DEGENERACE A REGENERACE CHRUPAVKY.....	73
4.1.1.2	LÉČBA DEFECTŮ CHRUPAVKY.....	74
4.1.1.3	TYP A ZDROJ BUNĚK.....	75
4.1.1.4	STIMULAČNÍ FAKTORY.....	76
4.1.1.5	TRANSPLANTACE CHONDROGRAFTU.....	76
4.1.2	ELASTICKÁ CHRUPAVKA – REGENERACE LIDSKÉHO UCHA.....	76
4.1.3	KOSTNÍ TKÁŇ.....	78
4.1.3.1	KOSTNÍ DEFEKTY A MOŽNOSTI JEJICH LÉČBY.....	80
4.1.3.2	UMĚLÉ NÁHRADY A KOMPOZITNÍ MATERIÁLY.....	81
4.1.4	ZUBNÍ TKÁŇ.....	83
4.1.4.1	SOUČASNÉ ZUBNÍ NÁHRADY VS. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	84
4.2	SVALOVÁ SOUSTAVA.....	85
4.2.1	REGENERACE A NÁHRADA SVALŮ.....	87
4.3	KOŽNÍ SYSTÉM.....	88
4.3.1	KOŽNÍ NÁHRADY.....	89
4.4	KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM.....	91
4.4.1	CÉVY.....	92
4.4.1.1	CÉVNÍ NÁHRADY.....	92
4.4.2	SRDCE.....	96
4.4.2.1	ONEMOCNĚNÍ, LÉČBA, REGENERACE A TRANSPLANTACE SRDCE.....	97
4.4.3	SRDEČNÍ CHLOPNĚ.....	99
4.5	VYLUČOVACÍ SYSTÉM.....	101
4.6	REGENERACE A TRANSPLANTACE JATER.....	102

4.7	DÝCHACÍ SYSTÉM.....	103
4.7.1	PLÍCE A TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ PLIC.....	103
4.7.2	PRŮDUŠNICE, PRŮDUŠKY.....	105
4.7.2.1	BIOLOGICKÉ A UMĚLÉ NÁHRADY.....	105
4.8	NERVOVÝ SYSTÉM.....	107
4.8.1	REGENERACE PERIFERNÍHO A CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU...108	
4.8.2	MÍCHA.....	109
4.8.2.1	DEGENERACE A REGENERACE MÍCHY.....	110
4.9	TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ VE VETERINÁRNÍ PRAXI.....	110
4.10	REFERENCE A POUŽITÉ ZKRATKY.....	112
5	OD VÝZKUMU DO PRAXE.....	119
5.1	VÝZKUM A VÝVOJ.....	119
5.2	PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ.....	122
5.3	KLINICKÉ HODNOCENÍ.....	122
5.3.1	FÁZE I KLINICKÉHO HODNOCENÍ.....	123
5.3.2	FÁZE II KLINICKÉHO HODNOCENÍ.....	123
5.3.3	FÁZE III KLINICKÉHO HODNOCENÍ (ROZŠÍŘENÁ KLINICKÁ STUDIE).....	123
5.3.4	FÁZE IV KLINICKÉHO HODNOCENÍ (POSTREGISTRAČNÍ HODNOCENÍ).....	124

KAPITOLA 1

TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Lucie Wolfová

Vědní obor s názvem Tkáňové inženýrství vznikl v roce 1988 a byl definován jako aplikace principů a metod inženýrství a přírodních věd vedoucí k základnímu porozumění mezi strukturou a funkcí zdravých a poškozených tkání savců a vývoj jejich biologických náhrad vedoucích k jejich regeneraci, obnovení nebo vylepšení funkce. V dnešní době je tomuto oboru věnována velká pozornost a je jedním z klíčových přístupů v rámci regenerativní medicíny.



Obr. 1 Možnosti tkáňového inženýrství (Josie Glausiusz, foto Rebecca Hale, NGM Staff, zdroj: <http://ngm.nationalgeographic.com/2011/03/big-idea/organ-regeneration-text>)

Jedná se o multidisciplinární vědní obor, který spojuje znalosti z chemie, fyziky, biologie, přírodních věd, inženýrství nebo medicíny apod. a zahrnuje výzkum a vývoj v rámci materiálů, buněčné biologie, biomechaniky, povrchů nebo např. z oblasti buněčné interakce s materiály a genetiky. Jedním z hlavních cílů tkáňového inženýrství je *in vitro*¹ vývoj tzv. scaffoldů, vedoucích k dosažení úspěšné regenerace poškozených

¹*in vitro* a *in vivo* jsou odborné termíny používané např. v medicíně nebo biologii a dalších příbuzných oborech, značící obecně podmínky a prostředí v rámci práce s organismy a jejich částmi. Výraz *in vitro* značí práci v umělých podmínkách, např. v laboratoři a výraz *in vivo* práci v přirozených podmínkách, v živém organismu

tkání a orgánů. To vše za pomoci kombinace buněk a tzv. biomateriálů, sloužících pro umělé vytvoření a imitaci přirozeného prostředí buněk pro jejich kultivaci, proliferaci a diferenciaci. Rozvoj anestézie v polovině 19. století umožnil rozvoj medicíny a zrychlil vývoj chirurgických zákroků. Medicína se tak dostala od svého počátku, kdy jejím úkolem bylo „prosté“ zachránění života, bez ohledu na následnou kvalitu života, až ke snaze plné obnovy poškozených orgánů. V dnešní době je za tímto účelem jednou z nejdůležitějších technik transplantace orgánů nebo tkání. Bohužel vhodných dárců pro transplantace je velký nedostatek a i samotná transplantace má svá úskalí a je potřeba potlačit imunitu dárce, aby nedošlo k odmítnutí implantátu. Tomuto se zabraňuje např. podáváním imunosupresiv, které ale mají výrazné vedlejší účinky, jako je např. větší náchylnost organismu k infekci nebo virovým onemocněním. Dalším problémem je také krátká životnost dárcovských tkání a orgánů apod. Na základě potřeby vyřešení těchto problémů miliónů pacientů po celém světě, vzniklo právě tkáňové inženýrství.

Historie tkáňového inženýrství je těžko zmapovatelná právě kvůli její komplexnosti, ale je úzce spojena s vývojem v oblasti biologie (izolace a kultivace buněk, genetika, biochemie), s vývojem v medicíně (transplantace, rozšíření umělých náhrad apod.) a také s vývojem v materiálovém inženýrství, se snahou vyvinout materiál přibližující se co nejvíce mezibuněčné hmotě orgánů a tkání. Lze říci, že první náznaky tkáňového inženýrství jsou spojeny s hojením ran a transplantacemi tkání. Na počátku 20. století byly zaznamenány první úspěšné autologní transplantace kůže, přičemž základy odběru kůže jsou dány již z 1. poloviny 19. století. Během 1. a 2. světové války byl zaznamenán další významný pokrok a rozvoj na poli regenerativní a plastické chirurgie. Důležitými jsou i počátky transplantace orgánů, kdy např. v 70. letech 20. století proběhla první transplantace srdce. Z hlediska biologie je důležitým mezníkem konec 19. Století, kdy bylo zjištěno, že hojení tkáně je způsobeno buněčnou proliferací. Tento objev vedl ke snaze kultivace buněk mimo tělo – tzv. *in vitro* a byl spojený s dalším milníkem v kultivaci buněk s použitím růstových faktorů v 1. polovině 20. století. První roky tkáňového inženýrství byly založeny právě na buněčných kulturách. Na počátku 70. let 20. století byla pak použita kombinace chondrocytů a „scaffoldu“ z kosti, za účelem regenerace chrupavky, resp. produkce nové chrupavčité tkáně, což se ale nepodařilo. Nicméně byl tímto určen směr vývoje tohoto oboru. Také díky rozvoji genetiky, který vedl k důkladnějšímu průzkumu DNA a klonování a díky kterému se dnes např. využívají kmenové buňky.

Aplikace tkáňového inženýrství v soudobé medicíně, tak může přinášet urychlení přirozeného hojení poškození lidského organismu, které je např. omezené u starších pacientů, nebo pacientů trpících různými onemocněními omezujícími hojení a regeneraci tkání jako je např. cukrovka apod. V kombinaci s lepším porozuměním struktury buněk

a tkání, jejich biologii a fyziologii může tkáňové inženýrství nabídnout nové možnosti pro pacienty potřebující náhradu nebo opravu poškozených orgánů jako je např. umělá kůže při léčbě popálenin, dýchacích cest, slinivky, kardiovaskulárního systém (např. náhrada srdeční chlopně, umělé cévy a podobně), léčba defektů kolenní chrupavky nebo kostí, močových cest, v zubním lékařství apod. Tato léčba představuje také reálnou alternativu k léčbě celé řady degenerativních a tzv. civilizačních chorob, včetně onemocnění nervového systému.

V rámci tkáňového inženýrství můžeme rozlišit tři základní typy léčby. Prvním z nich je buněčná terapie, kdy jsou na místo poškození transplantovány pouze buňky; druhým je využití pouze materiálů – scaffoldů bez začleněných buněk a třetím je využití kombinace buněk a scaffoldů popř. biologicky aktivních látek a scaffoldů, nejlépe ovšem všech tří složek, k čemuž se přistupuje v poslední době. Všechny tyto přístupy k léčbě mají své výhody i nevýhody a využití jednotlivých přístupů závisí především na aplikaci.

Co se týká buněčné terapie, její výhodou je jednoduchost, buňky jsou na místo aplikovány většinou pouze injekčně – vpíchnutím do místa defektu. Vynecháním složitých procedur dochází ke zvýšení možnosti efektivní léčby, zmenšení výskytu nežádoucích reakcí a také k případnému zlevnění. Nevýhodou je častá migrace buněk z místa aplikace a defektu (nejsou nijak fixovány), popř. snížení funkčnosti buněk, protože potřebují správnou výživu a prostředí pro růst, což je zprostředkováváno ve většině případů právě mezibuněčnou hmotou, bez které mohou buňky, i uhynout což vede k výraznému snížení efektivity léčby. Buněčná terapie je využívána např. v rámci léčby nervových onemocnění, nebo v rámci léčby cukrovky, která je nyní ve fázi klinického testování.

Využití samostatných bezbuněčných materiálů je jednodušší a časově také výhodnější, protože není potřeba buněčné izolace nebo kultivace, ovšem možnosti aplikace jsou také omezené. Mohou se využívat jako augmentační materiál (výplně) např. v oblasti zubního lékařství, nebo v případech, kdy má poškozená tkáň velkou schopnost regenerace a je předpoklad, že dojde k migraci buněk z okolní zdravé tkáně do scaffoldu. Daný materiál v tomto případě slouží pouze jako dočasná výplň daného defektu. Bohužel u většiny tkání není tato léčba také dostatečně efektivní, protože nedochází k tvorbě nové mezibuněčné hmoty, kterou zabezpečují právě buňky.

Z tohoto důvodu je hlavním cílem tkáňového inženýrství výzkum a vývoj právě buněčných scaffoldů. Jako příklad lze uvést např. léčbu defektů kloubní chrupavky, kdy v případě léčby založené pouze na buněčné terapii nedochází k výraznému zlepšení hojení, protože buňky difundují do okolní tkáně a v místě defektu se uchyťí pouze malé procento. Léčba pomocí bezbuněčných materiálů také není vhodná, protože chrupavčitá tkáň je složena buňkami – pouze asi z 5 %, které nemají tendenci migrovat do výplně defektu a efektivní

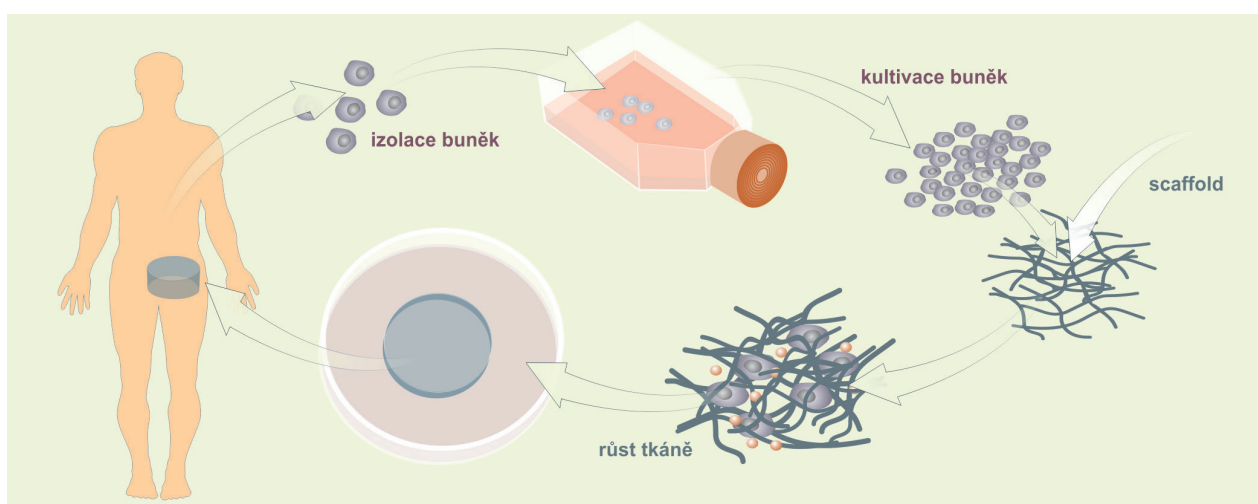
léčba je dosažena pouze u defektů menších než 5–6 mm. Při poranění chrupavky jsou defekty ale z více než 80% větší, a proto nedochází k efektivní léčbě a hojení. Proto je zde s výhodou využíváno právě scaffoldů se zabudovanými buňkami, vedoucích ke slibným výsledkům v rámci léčby a regeneraci poškozené tkáně.

1.1 HLAVNÍ SMĚRY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

Jak bylo řečeno v úvodu, tkáňové inženýrství je zaměřené na oblast léčby tkáňových defektů, regenerace nebo transplantace orgánů apod. a zahrnuje v sobě základní poznání funkcí a složení jak zdravých tak poškozených tkání a vývoj jejich biologických náhrad, za účelem vylepšení, nahrazení, opravení nebo podpory jejich funkce.

Hlavní principy tkáňového inženýrství proto jsou:

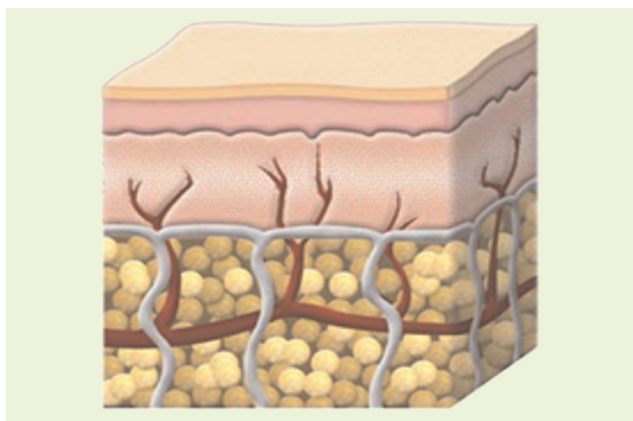
- izolace buněk z tkáně
- navýšení jejich počtu
- jejich in vitro implementace do vhodného materiálu – scaffoldu
- následná buněčná kultivace vedoucí k jejich dalšímu množení a především k produkci mezibuněčné hmoty příslušné tkáně
- aplikace do místa poškození



Obr. 2 Schéma základních principů tkáňového inženýrství (na základě zdroje: http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/Homepage.html)

Z pohledu tkáňového inženýrství jsou tři základní prvky utvářející lidskou tkáň – buňky, mezibuněčná hmota pro buněčnou proliferaci a diferenciaci (přirozený scaffold) a biologicky aktivní látky, jako jsou např. růstové faktory apod.

Tkáně vícebuněčných organismů jsou tvořeny buňkami a mezibuněčnou hmotou tzv. extracelulární matrix (ECM). Ta je buňkami produkována – obklopuje je a také tvoří mimo jiné bariéru mezi jednotlivými tkáněmi. Každá tkáň obsahuje svou vlastní specifickou ECM, sloužící k její funkci a dle toho se také liší složení tkáně z hlediska obsahu ECM a samotných buněk. Například ve svalech je poměr ECM a buněk přibližně 1 ku 10, kdežto v chrupavkách a šlachách je to naopak. Dlouhou dobu se myslelo, že jedinou funkcí ECM je jen „obal“, ovšem poté bylo zjištěno, že interakce buněk s okolním matrixem je jedním z nejdůležitějších prvků určujících chování buňky. Obecně lze říci, že ECM je tvořena z amorfní a vláknité složky. Amorfní složka má v sobě vázanou vodu. Je tuhá a dobře odolává tlaku. Obsahuje hlavně glykosaminoglykany, proteoglykany a strukturní glykoproteiny. Glykosaminoglykany (GAG) jsou složeny z disacharidových jednotek a právě ony mají schopnost vázat na sebe velké množství vody (chondroitinsulfát, kyselina hyaluronová). Proteoglykany jsou tvořeny proteinem a GAG. Strukturní glykoproteiny propojují buněčný povrch k mezibuněčné hmotě a stabilizují samotnou ECM (fibronektin). Vláknitá složka dodává ECM mechanické vlastnosti jako je např. odolnost v tahu, elasticita a do této skupiny patří kolagen – nejvíce zastoupený protein v ECM. Existuje celá řada jeho typů, přičemž nejvíce zastoupený v lidském těle je kolagen I až III. Určité typy kolagenu tvoří vlákna – fibrily, jejichž struktura je složitá a vysvětluje jejich velkou pevnost v tahu. Fibrily jsou složeny z podjednotek – mikrofibril a ty jsou tvořeny molekulami tropokolagenu. Další složkou ECM je elastin – ten dodává tkáni pružnost, tedy např. jejich schopnost



navrácení tvaru (po stlačení se kůže vrátí do původního tvaru). Elastin podobně jako kolagen tvoří vlákna. Další komponenty souvisí s typem dané ECM a s její funkcí. V tkáňovém inženýrství je snaha o vyvinutí umělých matric nebo scaffoldů (viz níže), které by právě co nejlépe simulovali přirozené prostředí buněk – tedy ECM.

Obr. 3 Příklad lidské tkáně

(zdroj: http://sunbeachsurf.hubpages.com/hub/science_of_cellulite)

Co se týká buněk, tak jsou za účelem jejich využití v tkáňovém inženýrství, po jejich izolaci kultivovány v tzv. bioreaktorech. Ten zajišťuje v závislosti na typu požadovaného implantátu ideální prostředí (pH, teplota, biochemický gradient atd.), ale také podněty stimulující a podporující dozrávání buněk, jako např. vliv mechanického namáhání, (chrupavka, kosti), proudění kapaliny (cévy) vzduchu (plíce), elektrické impulzy (srdce), kontrakce (svaly) apod.

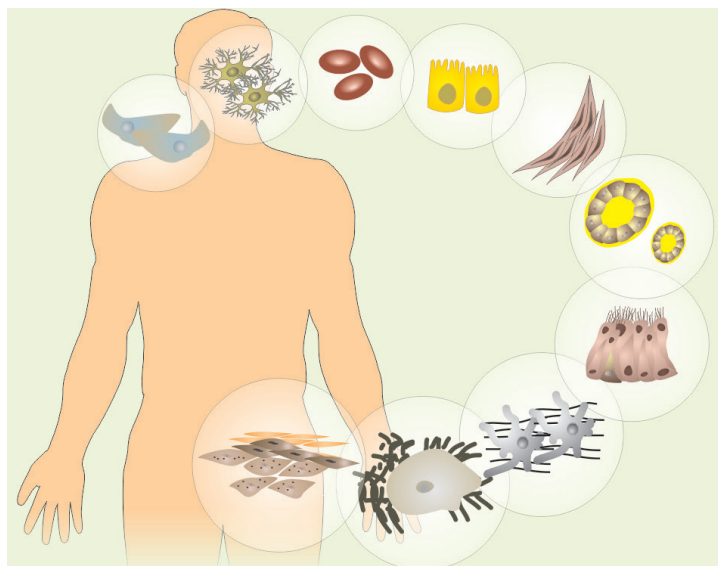
V případě *in vitro* kultivace buněk je k úspěšnému získání požadovaného produktu potřeba také podpořit růst a funkci buněk. K tomu slouží tzv. bioaktivní látky a nejčastěji se využívají cytokiny, což jsou v podstatě „komunikační“ proteiny buněk. Je to rozsáhlá rodina polypeptidů, které jsou schopné navázat se na receptor buňky a tím spustit kaskádu reakcí. Pro naše účely jsou nejdůležitější cytokiny regulující růst – růstové faktory (growth factor – GF). Ty ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk, jejich použitím se urychlí buněčný vývoj a tedy i regenerace tkáně. Některé růstové faktory působí na větší množství typů buněk, jako např. skupina TGF (transforming growth factors), která se účastní proliferace a diferenciaci buněk a hraje roli např. ve formaci kostí, angiogenezi. Oproti tomu BMP (Bone morphogenetic proteins), hrají např. roli především hlavně ve formaci kostní a chrupavčité tkáně.

Dle těchto hlavních částí utvářejících tkáně lze i tkáňové inženýrství rozdělit do třech hlavních směrů.

1.2 BUŇKY

Prvním z nich je část věnující se právě buňkám, které je také věnována kapitola 3. Základní úlohou tohoto směru je zabezpečení jejich dostatečného počtu pro úspěšnou léčbu. V tomto je zahrnuta jejich izolace, charakterizace a namnožení (tzv. proliferace) na potřebný počet. Vzhledem k tomu, že další důležitou podmínkou, proto aby buňky mohly indukovat znovuoobnovení správné funkce cílového orgánu, je odpovídající kvalita buněk, tak se tato část zaměřuje také na zabezpečení správného kultivačního prostředí. Proto se pro buněčnou kultivaci a proliferaci používají tzv. bioreaktory, což jsou zařízení simulující přirozené prostředí buněk.

Buňky použity pro tkáňové inženýrství se volí v závislosti na jejich výsledném umístění – např. fibroblasty do kůže, osteoblasty do kostí nebo chondrocyty do chrupavky atd. Druhou možností je využití kmenových buněk, které mají vysoký potenciál k proliferaci a diferenciaci. Ty mohou být multipotentní, z kterých se diferenciací získávají např. krevní buňky, kostní, nervové atd. nebo pluripotentní – z kterých se získávají buňky v rámci dané tkáně, jako jsou např. různé krevní buňky.



Obr. 4 Obrovské spektrum buněk obsažených v lidském těle

(na základě zdroje: <http://www.stemcellcite.com/stemcell/tissue-engineering>)

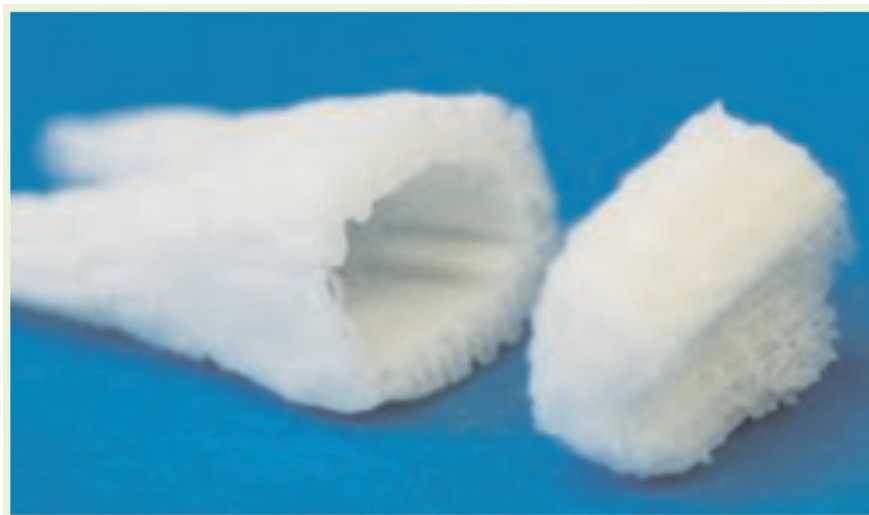
Z hlediska původu se buňky používané pro tvorbu nové tkáně dají rozdělit na tři základní typy, a to na autologní – získané z pacienta, alogenní – získané z dárce, ale jedná se o stejný živočišný druh, nebo v některých případech xenogenní – jiný živočišný druh.

Obecně se tělní buňky dají získávat buď z tělních tekutin – jejich odstředěním a následnou izolací, nebo odběrem z tuhých tkání např. kostní dřeně, kdy se získaná tkáň obvykle namele a degraduje enzymy, aby se odstranila ECM původní tkáně a uvolnily tak buňky, a poté převedením do roztoku a jeho následným odstředěním.

1.3 SCAFFOLDY

Terapie v tkáňovém inženýrství musí být založena na specifitě daných orgánů a tkání. Proto je potřeba pochopit buněčné chování a způsoby a důvody vzniků zranění a degenerace tkáně. Pod termínem buněčné chování se skrývá reakce buněk na určitý povrch z hlediska jeho struktury, mechanických vlastností (tvrdost, elasticita), chemického složení apod. Proto druhou důležitou součástí tkáňového inženýrství je příprava bioaktivních a biodegradabilních materiálů imitujících přirozené prostředí buněk, které jsou označovány jako „scaffoldy“ – v překladu tento výraz znamená lešení. Scaffoldy se podle jejich původu dělí na biologické, získané z lidských nebo zvířecích tkání, nebo scaffoldy syntetické, vytvořené na bázi polymerů. První takový scaffold byl vytvořen v r. 1974. Scaffoldy slouží jako uměle vytvořená mezibuněčná hmota, která se nachází kolem buněk a tak spoluutváří tkáň. Tímto také zabezpečuje chemické

a fyziologické podmínky pro buněčnou proliferaci a diferenciaci, transport výživných látek k buňkám a odvádění odpadních produktů jejich metabolismu apod. Scaffoldy mohou sloužit také jako ochranná bariéra a nosná matrice pro růstové faktory a jiné látky podporující růst nové tkáně, nebo v případě některých defektů, kdy má poškozená tkáň velký potenciál se regenerovat sama, jako jejich dočasná výplň a opora pro růst nové tkáně indukované organismem.



Obr. 5 Ilustrativní obrázek scaffoldu²

Nejdůležitější vlastnosti, které by měl scaffold a tím i materiál pro jeho přípravu splňovat, jsou:

Biokompatibilita – jedno z nejdůležitějších kritérií pro materiály určené do tkáňového inženýrství je, že materiál ani scaffoldy nesmí být toxické a jejich přítomnost v organismu nesmí negativně ovlivňovat buňky a po implementaci do organismu nesmí daný materiál vyvolávat ani protizánětlivou reakci organismu. Materiál musí být také cytokompatibilní, tzn., že musí být kompatibilní s přítomnými buňkami, umožňovat jejich adhezi na povrchu scaffoldů popř. migraci buněk do struktury scaffoldů a nesmí nijak negativně ovlivňovat jejich funkci.

Biodegradabilita – Cílem tkáňového inženýrství a scaffoldů je regenerace orgánů na základě vytvoření nové ECM produkované zabudovanými buňkami. Proto scaffoldy ve většině případů nejsou cílené jako permanentní implantáty a měly by

²Tissue engineering technique yields potential biological substitute for dental implants. [online]. 2010 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/05/100524111724.htm>

umožnit zabudovaným buňkám jejich růst a produkci jejich vlastní buněčné hmoty. Scaffoldy proto musí být biodegradabilní a produkty jejich degradace také musí být biokompatibilní a netoxické. Požadavky na stabilitu scaffoldu v organismu se liší dle typu dané tkáně a degradabilita daných materiálů v organismu by měla být „ušitá na míru“ a co nejvíce korespondovat s nově se tvořící tkání. Z tohoto hlediska by nemělo dojít k destrukci scaffoldu dřív, než bude tato tkáň vytvořena, ale také ani moc později aby scaffold nebránil v růstu nové tkáně.

Vhodné mechanické vlastnosti a struktura – mechanické vlastnosti scaffoldů jako je např. tvrdost, pevnost, ohebnost apod. spolu s jejich stavbou a strukturou, by se měla co nejvíce podobat dané tkáni a tím přirozenému prostředí buněk tak, aby co nejvíce podporovali buněčnou proliferaci, diferenciaci a správnou produkci a organizaci ECM. Ovšem kromě mechanických vlastností je velice důležité brát v potaz také strukturu scaffoldu, která musí být vhodná pro cílenou implantaci do *in vivo* systému. Např. je nutná vaskularizace systému, nebo vlastnosti umožňující případnou infiltraci buněk z okolí. Proto hodně typů scaffoldů s dobrými výsledky *in vitro*, po implantaci selhalo. Je tedy nutné najít vhodnou rovnováhu mezi mechanickými vlastnostmi a vlastnostmi podporujícími inkorporaci materiálu *in vivo*.

Jednou z klíčových vlastností je například porozita. Scaffoldy by měly mít propojené póry v dostatečné hustotě, tak aby byla zajištěna difuze živin a odstraňování odpadních produktů buněk. Kromě porozity je důležitá také velikost těchto pórů, které musí mít dostatečnou velikost na to, aby dovolily buňkám migraci do struktury implantátu a jejich případnou adhezi, pro kterou je potřeba, aby se na povrchu vyskytovaly vhodné ligandy (chemické struktury). Scaffoldy připravené z materiálů běžně se vyskytujících v ECM (např. kolagen nebo hylaruronan) ve většině případů již mají na svém povrchu tyto ligandy např. ve formě sekvence peptidů Arg-Gly-Asp (RGD sekvence). Kdežto scaffoldy připravené ze syntetických materiálů vyžadují cílenou inkorporaci těchto ligandů.

Vyrobitelnost a zpracovatelnost – V případě scaffoldů je také velice důležité možnost převést produkt z malého laboratorního měřítka do komerčně dostupné verze splňující správnou výrobní praxi (GMP). Také je důležité, jak bude produkt dostupný. V klinické praxi se preferují produkty, které jsou jednoduše dostupné a nepotřebují speciální přípravy před jejich aplikací. Ty prodlužují a prodražují celou proceduru od získání buněk nebo jejich několikátýdenní kultivace *in vitro*.

Pro přípravu scaffoldů se používají tzv. biomateriály, které byly v roce 1976 definovány jako neživý materiál používaný v zdravotnickém prostředí, určený pro interakci s biologickými systémy. Později byla tato definice upřesněna na materiály určené pro interakci s biologickými systémy pro léčbu, augmentaci, nebo náhradu jakékoliv tkáně, orgánu nebo tělesné funkce.



Obr. 7 Ulita – biokompozit skládající se z anorganických částic a směsi biopolymerů (např. chitin) (<http://gregormoldavit.blog.cz/1007/anticka-krasa-1-2>)

Biomateriálům je věnována kapitola 2 a nejčastěji se rozdělují do tří skupin a to na keramiku a syntetické a přírodní polymery. Všechny tyto typy mají své výhody i nevýhody a proto se nejčastěji v poslední době využívá jejich kombinací. Hlavními kritérii pro výběr vhodných polymerů v biologických aplikacích jsou především jejich vlastnosti, jako je samotná struktura materiálů, jejich chemické složení, stabilita v organismu, biodegradovatelnost a mechanismus degradace v organismu, nebo např. povrchové napětí, hydrofilita, schopnost absorbovat vodu, stálost mechanických vlastností, lubrikační vlastnosti apod. Různé materiály pak nabízejí možnost přípravy scaffoldů o široké škále vlastností a umožňují tak výběr materiálů odpovídající požadavkům v rámci dané tkáně.

Keramické scaffoldy, jako jsou např. na bázi hydroxyapatitu nebo trikalciumfosfátu, nejsou vhodné pro měkké tkáně, ale široce se využívají pro regeneraci kostí. Pro tyto scaffoldy jsou charakteristické vysoké hodnotami tvrdostí, nízká elasticita a tvrdý a křehký povrch. Z hlediska regenerace kostí mají díky své struktuře a složení, blízké minerální složce kostní tkáně, vysokou biokompatibilitu a je známo, že tyto materiály podporují a zvyšují diferenciaci a proliferaci osteoblastů což je velice důležité pro hojení. Nicméně jejich velkou nevýhodou je např. jejich křehkost a obtížná tvarovatelnost a proto se pro regeneraci ostatních tkání používají velice omezeně.

Co se týká scaffoldů na bázi polymerů, tak bylo a je pro jejich přípravu testováno mnoho materiálů. Vlastnosti polymerů závisí především na struktuře polymerního řetězce, přítomnosti, počtu a velikosti postranních skupin, konformace řetězců apod. Scaffoldy z přírodních materiálů mají z hlediska biokompatibility o hodně lepší biologické vlastnosti než na bázi syntetických polymerů a v četných případech mohou interagovat s buňkami a tím tak podporovat jejich funkci. Jejich interakcí s receptory buněk může ale také docházet k stimulaci imunitního systému a tím tak např. k přenosům nemocí. Kromě tohoto mohou mít v některých případech horší mechanické vlastnosti a díky složitosti jejich struktury lze také o hodně obtížněji předpovídat jejich chování při styku s danou tkání (jako je např. botnání materiálů, degradabilita a stabilita apod.).

Nejvíce využívány jsou polymery ze skupiny bílkovin – kolagen, želatina, fibrinogen, elastin, keratin, aktin a myosin a ze skupiny polysacharidů pak: celulóza, dextran, chitosan, alginát, chitin nebo glykosoaminoglykany. Materiály na bázi kolagenu popř. želatiny mají velice dobré mechanické vlastnosti, jejich velkou nevýhodou je ale živočišný původ těchto materiálů. Většina polysacharidových materiálů nemá tak dobré mechanické vlastnosti, ale je ve většině případů rostlinného původu.

Syntetické materiály nejsou tak biokompatibilní, ale ve většině případů disponují vynikajícími mechanickými vlastnostmi a díky znalosti jejich přesné struktury a fyzikálně-chemických vlastností lze dobře předvídat popř. kontrolovat jejich chování v kontaktu s buňkami nebo organismem. Podle struktury se pak dají rozdělit na materiály na bázi skla, keramiky nebo polymerů. Jejich velkou nevýhodou bohužel ale je, že při jejich degradaci mohou vznikat látky toxické pro buňky nebo vyvolávat zánětlivou reakci a ve většině případů mají výrazně horší vlastnosti v rámci biokompatibility a biodegradability než materiály na bázi přírodních polymerů.

Za důležitý mezník pro využití syntetických polymerů v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství lze považovat období 2. světové války, která vyvolala obrovskou potřebu náhrad tkání. V té souvislosti bylo rovněž pozorováno, že mnoho pilotů zraněných plastovými úlomky z krytu pilotní kabiny (tehdy vyráběné z polymethylmetakrylátu, PMMA) netrpí chronickou odmítavou reakcí imunitního systému vůči těmto úlomkům. PMMA se následně začal hojně využívat např. pro náhrady částí poškozených lebečních kostí nebo i očních rohovek. Pokroky v chirurgii společně s vývojem polymerních materiálů pak vedly v 50. letech minulého století k prvním pokusům o náhrady cév, v 60. letech pak k náhradám srdečních chlopní či tmeleným/cementovaným náhradám kloubů.

Dalším významným příkladem syntetického polymerního materiálu běžně využívaného v klinické praxi jsou cévní náhrady na bázi polyetylentereftalátu (PET), tedy stejný materiál, který se používá pro výrobu PET lahví na nápoje, ale je zpracován odlišným

způsobem ve formě vláken, z nichž je následně připraven scaffold ve formě trubice, zpravidla s krepovanou úpravou, která zajišťuje potřebnou elasticitu.

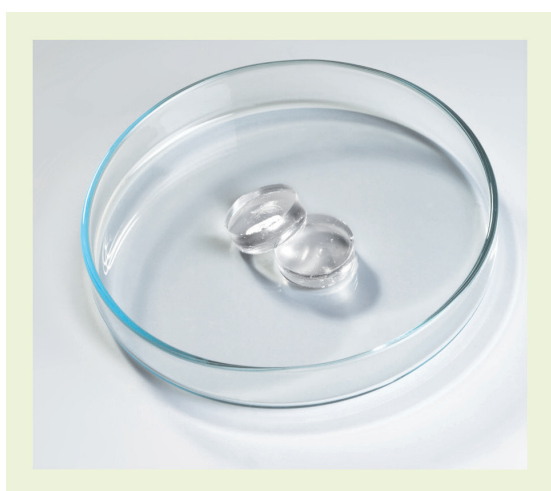
V dnešní době jsou také hojně využívány v rámci syntetických biodegradabilních polymerů, lineární alifatické estery – konkrétně kyselina mléčná a její kopolymery (PLA a PLGA) anebo polyethylen glykol (PEG), jehož nevýhoda ale bohužel je nedostatečná biodegradabilita. Hojně využívány byly také scaffoldy na bázi polyurethanů (PUR), především kvůli jejich dobré pevnosti a elasticitě, ale jejich nevýhodou je také nedostatečná biodegradabilita a přítomnost toxických zbytků z jejich syntézy.

Vzhledem k výhodám i nevýhodám materiálů na bázi pouze biopolymerů nebo syntetických polymerů se v poslední době začala často využívat pro přípravu scaffoldů jejich kombinace. Kdy k syntetickému polymeru s dobrými mechanickými vlastnostmi je přidán biopolymer s dobrou biokompatibilitou, čímž jsou částečně nevýhody obou typů polymerů eliminovány.

1.3.1 ROZDĚLENÍ SCAFFOLDŮ Z HLEDISKA JEJICH STRUKTURY

Obecně se scaffoldy dají rozdělit podle svých vlastností a vzhledu na houby, hydrogely, nebo scaffoldy v podobě vláken. Všechny tyto typy mají své výhody a nevýhody a na výběru vhodného scaffoldu záleží především na jeho cílené aplikaci.

1.3.1.1 HYDROGELY



Obr. 8 Hydrogelové materiály

Hydrogely se dají snadno tvarovat, což umožňuje výplň defektů o různém nepravidelném tvaru a velikosti. Také se do jejich struktury dají snadno zaimplementovat buňky nebo bioaktivní látky. Hydrogely jsou na bázi materiálů schopných síťovat ve vodním prostředí a tvořit tak gel. K zesílení polymerů může obecně docházet např. změnou teploty – termoreverzibilní gely, změnou pH, fotochemicky nebo za pomoci chemických činidel.

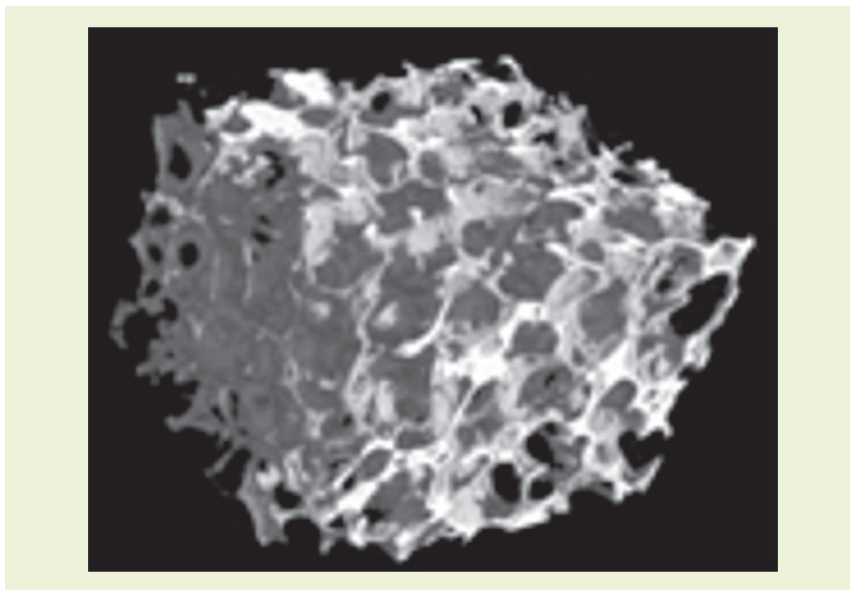
Podle způsobu jejich finální aplikace se pak dále dělí na injekční scaffoldy – injekčně se aplikuje na postižené místo směs buněk a gelotvorného roztoku a k tvorbě nové tkáně dochází *in vivo*, nebo na scaffoldy které se implantují v pevné formě, kdy ke kultivaci buněk a tvorbě nové tkáně dochází *in vitro* a k implantaci dochází až po vytvoření buněčných agregátů vedoucích ke vzniku nové tkáně.

Vlastnosti hydrogelů závisí především na koncentraci a druhu použitého polymeru, na jeho struktuře, molekulové hmotnosti a hustotě zesílení výsledného hydrogelu. Hydrogely podporují transport výživných látek a odpadních produktů buněk a jsou také např. schopny mechanicky stimulovat zabudované buňky a blíže tak napodobovat jejich přirozené prostředí. Jejich nevýhodou jsou ale slabší mechanické vlastnosti.

Pro přípravu tohoto typu scaffoldů se využívají především biodegradabilní polymery schopné síťovat ve vodném prostředí a vytvářet tak gely. Ze syntetických biodegradabilních polymerů jsou v této oblasti nejhojněji využívány lineární alifatické estery – konkrétně kyselina mléčná a její kopolymery (PLA a PLGA), nebo polyethylen glykol (PEG) a polyvinylalkohol (PVA). Z přírodních materiálů se pak nejvíce využívá např. kolagen a želatina, alginát, chitosan, dextran nebo např. kys. hyaluronová.

1.3.1.2 PORÉZNÍ SCAFFOLDY

Dalším typem scaffoldu jsou porézní scaffoldy připomínající svojí strukturou pěny nebo houby (proto v angličtině sponges). Vlastnosti těchto scaffoldů závisí především na typu použitého materiálu, na velikosti pórů, jejich hustotě a také jejich propojení. Na pórovitosti těchto scaffoldů závisí velikost jejich povrchu a možnost buněčné adheze. Na velikosti pórů a jejich propojení pak možnost migrace buněk, difuze výživných látek, transport odpadních produktů nebo distribuce nově produkované mezibuněčné hmoty. Velikost a charakteristika pórů – tedy ovlivňuje výsledné chování produktu, a proto je právě tvorbě pórů věnována velká pozornost. Pro přípravu houbových materiálů existuje několik postupů, mezi které patří například lyofilizace, odstraněním porogenu, zpěňování apod. Zvolením vhodných postupů, lze připravit také materiály s orientovanými póry. Pro přípravu tohoto typu scaffoldu lze použít také keramické materiály, nebo směs polymeru a keramických částic. Pro přípravu houbových scaffoldů je možné použít např. chitosan, hyaluronovou kyselinu, polydioxan a jiné.

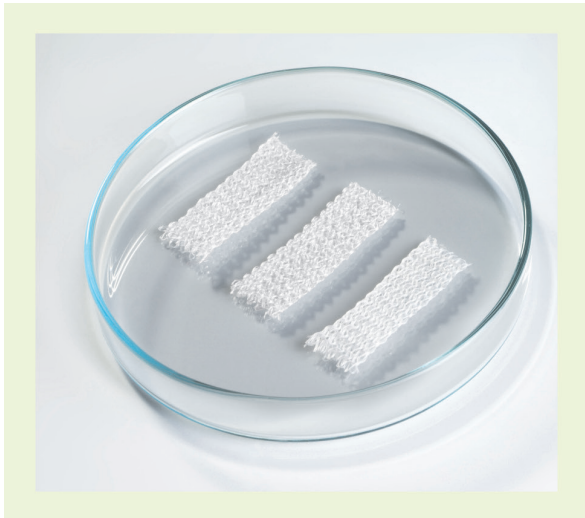


Obr. 9 Houbovitý scaffold

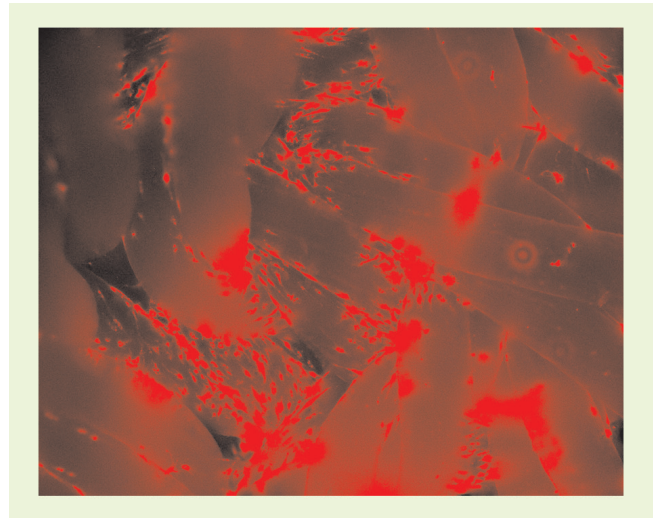
(zdroj: <http://sydney.edu.au/cdip/opportunities/pharmaceuticals/12220.shtml>)

1.3.1.3 VLÁKENNÉ SCAFFOLDY

Třetím typem jsou scaffoldy na bázi vláken. Tyto scaffoldy jsou na bázi textilně zpracovatelných materiálů, většinou polymerů bez velkých postranních skupin v rámci své struktury. Tyto polymery se pak zpracovávají vlákenním z taveniny nebo polymerního roztoku. Je možné připravit tkaná a netkaná vlákna a textilie. Při výrobě lze optimalizovat průměr vláken – nano vs. mikro rozměry. Lze zvolit také velikost a hustotu vláken a tím i průměr vzniklých pórů. Netkané textilie mají větší volný objem a jejich povrch se dobře hodí pro regeneraci tkání. Tkané materiály mají zase větší pevnost a mohou být připraveny s různou velikostí pórů a umožňují také tvorbu strukturně orientovaných scaffoldů, čehož se využívá např. v oblasti léčby nervové tkáně. Jejich nevýhodou je ale vysoká pořizovací cena a u využití syntetických polymerů k jejich přípravě pak také použití toxických rozpouštěcích lázní, popř. výskyt toxických degradačních produktů. Také je náročnější jejich použití při defektech nepravidelného tvaru. Jedním z výrazněji zkoumaných materiálů je např. vláknenný netkaný scaffold z polyglykolové kyseliny (buď samotná, nebo v kombinaci s jinými biokompatibilními materiály), cílená pro tkáňové inženýrství chrupavky, srdečních chlopní nebo cév, ovšem nevýhodou je rychlá degradace tohoto materiálu a špatně kontrolovatelná distribuce pórů. Dále jsou pro přípravu vláknenných scaffoldů např. využívány materiály na bázi polymléčné kyseliny a jejich kopolymerů, polykaprolakton a jiné.



Obr. 10 Textilie



Obr. 11 Buňky kultivované na vlákenném scaffoldu

1.4 REFERENCE A SLOVNÍK POJMŮ

1. O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 2011, vol. 14, issue 3, s. 88–95.
2. Patterson, J., Martino, M. M., Hubbell, J. A. Biomimetic materials in tissue engineering. *Materials Today*, 2010, vol. 13, issue 1-2, s. 14–22.
3. Ma, P. X. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. [online]. 2008, vol. 60, issue 2, s. 184–198. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2271038/pdf/nihms39385.pdf>
4. Lee, K. Y., Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chemicals Reviews*, 2001, vol. 101, issue. 7, s. 181–205.
5. Ma, P. X. Tissue Engineering. In: Kroschwitz JI, editor. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Third. Vol. 12. John Wiley & Sons, Inc.; Hoboken, NJ: 2005. s. 261–291.
6. Malafaya, P. B., Silva, G. A., Reis, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, vol. 59, s. 207–233.

7. van Winterswijk, P. J., Nout, E. Tissue Engineering and Wound Healing: An Overview of the Past, Present, and Future. *Wounds*, 2007, vol. 19, issue. 10, s. 277-284.

8. Meyer, U. The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. [online]. 2009 s. 5–12. [cit. 2014-10-11]. Dostupné z: www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783540777540-c1.pdf?SGWID=0-0-45-683601-p173833704

9. Liu, C., Xia, Z., Czernuszka, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Trans IChemE, Part A, Chemical Engineering Research and Design*, 2007, vol. 85, issue. A7, s. 1051–1064.

10. Silva, E. A., Mooney, D. J., Synthetic Extracellular Matrices for Tissue Engineering and Regeneration. *Current Topics in Developmental Biology*, 2004, vol. 64, s. 181-205.

11. B.M. Holzapfel, et al., How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), doi:10.1016/j.addr.2012.07.009

12. Little, C. J., Bawolin, N. K., Chen, X. Mechanical properties of natural cartilage and tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part B Rev.*, 2011, vol. 17, issue. 4, s. 213-227

13. Furth, M. E.; Atala, A.; van Dyke, M. E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 2007, vol. 28, issue 34, s. 5068-5073.

14. Hou, Q.; de Bank, P. A.; Shakesheff, K. M. Injectable scaffolds for tissue regeneration. *J. Mater. Chem.*, 2004, vol. 14, s. 1915–1923.

Slovník pojmů

Augmentace – vyplnění defektu, objemové zvětšení např. měkkých tkání

Biodegradabilita – schopnost materiálu rozložit se vlivem působení biologických činitelů; v případě využití materiálu v tkáňovém inženýrství je nutné, aby také produkty rozpadu byly plně biokompatibilní

Biokompatibilita – snášenlivost daného materiálu v živém organismu; materiál nevyvolává zánětlivé reakce, není toxický, neuvolňuje potenciálně škodlivé látky...

Biomateriál – obecně je to materiál (syntetický, přírodní) určený ke styku s živou tkání; jeho cílem je regenerace, posílení funkce, léčení, náhrada...

Biopolymer – polymerní materiál přírodního původu

Diferenciace buněk – specializace buněk na buňky určité tkáně

ECM – extracelulární matrix – nebuněčná hmota, která obklopuje buňky a spoluutváří tkáň

Hydrogel – polymerní síť s vysokým obsahem vody (až 98%)

In vitro – práce za umělých podmínek (kultivace buněk)

In vivo – práce v živém prostředí (přenesení materiálu do živého organismu)

Porogen – látka vytvářející póry

Proliferace buněk – množení jejich počtu

Regenerativní medicína – často používáno jako synonymum tkáňového inženýrství

Scaffold – 3D struktura připravená z biomateriálu, poskytuje podporu regenerované tkáně; v případě buněčného scaffoldu poskytuje podporu buňkám a simuluje jejich přirozené prostředí

Tkáňové inženýrství – multidisciplinární obor sloužící k vytvoření náhrady nebo modifikace funkce tkání

Seznam doporučené literatury a odkazy na internetové zdroje

Lanza, R.; Langer, R.; Vacanti, J. P. Principles of Tissue Engineering, 4th ed.; Academic press: USA, 2014.

Ma, P. X. Tissue Engineering. In: Kroschwitz JI, editor. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. Third. Vol. 12. John Wiley & Sons, Inc.; Hoboken, NJ: 2005. s. 261–291.

Ratner, B. D.; et al. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 4th ed.; Elsevier Academic press: UK, 2004.

Palsson, B. O.; Bhatia, S. N. Tissue Engineering; Prentice Hall: USA, 2003.

KAPITOLA 2

SYNTECKÉ POLYMERY A BIOPOLYMERY VYUŽITELNÉ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Lucy Vojtová

2.1 ÚVOD

Jak již bylo řečeno v úvodu, k zajištění optimálního prostředí pro buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci, které jsou nezbytné pro regeneraci a rekonstrukci poškozené tkáně nebo orgánu, slouží v tkáňovém inženýrství scaffoldy a vývoj nových biomateriálů pro tyto scaffoldy a celkově tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu nebo např. řízené uvolňování léčiv, je zaměřený převážně na biodegradabilní biomateriály. Hlavní pozornost je soustředěna převážně na přírodní biopolymery a syntetické biodegradabilní polymery. Přírodní biopolymery jako jsou polypeptidy, proteiny a polysacharidy, mají většinou velmi dobrou biokompatibilitu, ale některé mohou způsobovat nežádoucí imunitní reakci organismu, která může být do jisté míry eliminována použitím neimunogenních syntetických polymerů. Biopolymery jsou na rozdíl od syntetických polymerů velmi těžce chemicky modifikovatelné a některé modifikace mohou mít za následek změnu důležitých vlastností biopolymerů, případně mohou inhibovat jejich biologickou aktivitu, např. interakci s buňkami.

Oproti tomu, syntetické polymery se dají lehce funkcionalizovat (např. hydrofilizovat) a kopolymerovat navzájem s cílem získání širokého spektra vlastností, které mohou být užité na míru požadované biomedicínské aplikace. Biodegradabilní syntetické polymery jsou obecně makromolekuly převážně získané z obnovitelných zdrojů, které mohou být hydrolyticky nebo enzymaticky degradovány na netoxické nízkomolekulární produkty. V lidském těle jsou tyto produkty buď rozpustné v tělních tekutinách a poté z těla vyloučeny nebo jsou reabsorbovány a v Krebsově citrátovém cyklu ideálně přeměněny na CO_2 a vodu. Nejvíce používanými a vyvíjenými syntetickými biodegradabilními biomateriály jsou polyestery, přesněji alifatické polyestery a jejich kopolymery či směsi s jinými biodegradabilními polymery, přírodními polymery nebo různými aditivami, ať už organického či anorganického původu. Tyto materiály jsou využívány pro své příznivé a reprodukovatelné mechanické vlastnosti, dobrou biokompatibilitu, kontrolovatelnou biodegradabilitu a excelentní tvarování a zpracování.

Na druhou stranu, jejich hydrofobicita a nedostatek funkčních skupin brání interakci s buňkami a tím i jejich adhezi. Distribuce osazených buněk je většinou heterogenní s nízkou hustotou buněk vyznačující se pomalým růstem, díky špatné adhezi nebo difuzi buněčného kultivačního média. Nedostatečné množení a diferenciací buněk tak omezuje regeneraci poškozené tkáně a způsobuje nežádoucí reakce okolní tkáně *in vivo*, jako je zánět, infekce, lokální odumření tkáně, enkapsulace implantátu i trombózu. Zvýšení hydrofilní povahy a buněčné afinity syntetických polymerních scaffoldů lze docílit funkcionalizací syntetických polymerů (zavedení funkčních skupin např. $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ atd.) a/nebo kombinací s přírodními biodegradovatelnými polymerem používanými jako biomateriály, které vykazují v porovnání se syntetickými polymerem výrazně lepší biologické vlastnosti ve spojení s buněčnou interakcí s těmito materiály, ale také výrazně slabší mechanické vlastnosti.

Výsledný biomateriál pro tkáňové inženýrství by měl být bezpečný, biokompatibilní, mechanicky odolný, kontrolovaně degradovatelný, s hydrofilním povrchem, vhodnou porozitou pro rozvoj tkáně a bioindukcí umožňující interakce s buňkami. Většina současného výzkumu založeného na syntetických biodegradabilních polymerních materiálech uvedených v této kapitole je stále ve stavu zkoumání a poznávání základních principů a interakcí jednotlivých komponent jak mezi sebou, tak i s živými buňkami. Syntetické polymerem ve srovnání s přírodními biopolymerem nejsou imunogenní a jsou snadněji modifikovatelné a funkcionalizovatelné. Funkcionalizované scaffoldy ze syntetických polymerů mohou být použity nejenom jako nosiče buněk, ale i jako nosiče různých bioaktivních molekul (léčiv, růstových faktorů, peptidů, DNA atd.) díky specifickým interakcím mezi funkčními skupinami imobilizovanými na povrchu pórů scaffoldu a bioaktivními molekulami. Funkcionalizace a modifikace syntetických biodegradabilních polymerů a kopolymerů, ať už chemicky, či za použití přírodních biopolymerů, nanováken nebo nanočástic, rozšiřuje aplikační možnosti těchto biomateriálů v oblasti biomedicíny a především v tkáňovém inženýrství.

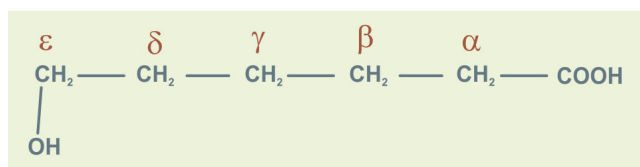
2.2 SYNTETICKÉ POLYMERY

Biodegradabilní syntetické polymerem nabízí díky vysoké variabilitě syntéz možnost připravit polymerem s širokým spektrem vlastností a excelentní reprodukovatelností. Syntetické polymerem vhodné pro tkáňové inženýrství by měly být pevné, degradabilní, nezápálivé, netoxické, jednoduše sterilizovatelné, s dobrou trvanlivostí a s možností formování do různých tvarů s požadovanou morfologií pórů umožňující

lepší prorůstání tkáně. Hlavní výhody syntetických polymerů zahrnují možnost ušít mechanické vlastnosti a kinetiku degradace na míru různým aplikacím. Nejrozsáhleji studované biodegradabilní syntetické polymery patří do skupiny alifatických polyesterů. Nejznámější z nich – polyglykolid, polylaktid, polykaprolakton i polydioxanon byly díky excelentní biokompatibilitě a vhodným mechanickým vlastnostem schváleny americkým Úřadem pro potraviny a léky (U. S. Food and Drug Administration) a získaly CE certifikaci pro používání in vivo v klinické praxi jako např. vstřebatelné stehy, vstřebatelné dlahy a šrouby na fixace kostí nebo jako nosiče pro transplantace buněk a buněčnou terapii.

2.2.1 POLYESTERY

Polyestery tvoří velkou skupinu polymerů, jejichž společným znakem je přítomnost degradovatelných esterových vazeb v hlavním makromolekulárním řetězci obecného vzorce $[R_1COOR_2]_n$. Nejrychlejším a nejvíce účinným degradačním procesem štěpícím esterové vazby v polyesteru je hydrolýza, při které dochází k výraznému poklesu molekulové hmotnosti i mechanických vlastností polymeru. Kyselou hydrolýzou esterů vzniká alkohol a karboxylová kyselina. Produktem alkalické hydrolýzy esterů jsou alkoholy a soli karboxylových kyselin. Alifatické polyestery jsou v současnosti nejvíce studované a používané syntetické degradabilní materiály v biomedicině. Nízká hydrolytická stabilita způsobila jejich využití v biomedicině jako vstřebatelných stehů již v 60. letech 20. století. Lze je syntetizovat přímou katalytickou polykondenzací za sníženého tlaku, azeotropickou polykondenzací, polymerací v pevném stavu, (homo)polykondenzací hydroxykyselin nebo polymerací cyklických esterů/diesterů hydroxykarboxylových kyselin za otevření kruhu. Cyklický ester může být viděn jako kondenzační produkt alkoholové a karboxylové skupiny na stejné molekule (Obr. 12). Lokant určující pozici hydroxylových funkčních skupin v molekule kyseliny je uveden v názvu cyklického monomeru (např. ϵ -kaprolakton).



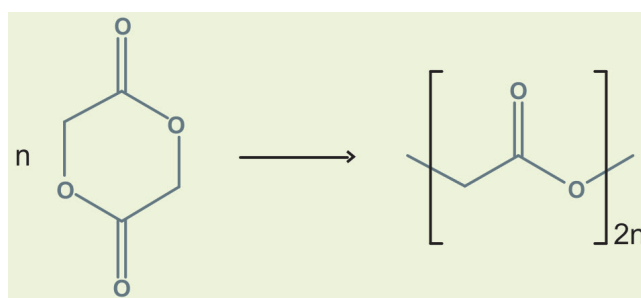
Obr. 12 Pořadí lokantů C atomů vztahované k $-\text{COOH}$ skupině v hydroxykyselině.

2.2.1.1 POLY(α -ESTERY)

Nejvýrazněji jsou v tkáňovém inženýrství používané poly(α -estery) neboli poly(α hydroxykyseliny), jako jsou polymery kyseliny glykolové (semikrystalické) a kyseliny mléčné (semikrystalické i amorfni) a jejich kopolymery. Díky tomu, že velice snadno podléhají hydrolytické degradaci esterových vazeb za vzniku netoxických metabolitů, vykazují tyto kopolymery vysokou biokompatibilitu, netoxicitu a dobré zpracovatelské možnosti do různých forem. Je známo, že biodegradace poly(α -hydroxykyselin) je rychlejší než u β -, γ -, δ - a ϵ -hydroxykyselin a naopak pomalejší se substituenty vázanými k esterovým skupinám (sterické bránění). Hydrolýza je také ovlivněna morfologií a permeabilitou (porozitou) polymeru. Amorfni polymery a kopolymery degradují rychleji (jsou neuspořádané) než jejich semikrystalické analogy. Produkty hydrolýzy in vitro jsou převážně kyseliny a rozpustné dioly, při in vivo degradacích dochází ke štěpení v Krebsově cyklu až na vodu a CO₂. Nevýhodami těchto polymerů je uvolňování kyselých degradačních produktů a ztráta mechanických vlastností velmi brzy během degradace.

Polyglykolid

Polyglykolid, neboli polyglykolová kyselina (PGA), je nejjednodušší lineární alifatický netoxický polyester známý již od r. 1954 jako polymer tvořící pevná biodegradabilní vlákna. Pod názvem DEXON® byl jako první polymer schválen FDA a komerčně používán od r. 1970. PGA je nejčastěji připravován polymerací glykolidu za otevření kruhu (Obr. 13) katalyzované např. oktanoátem cínatým, oxidem antimonitým nebo laktátem zinečnatým, jak za přítomnosti rozpouštědla tak i bez něj.



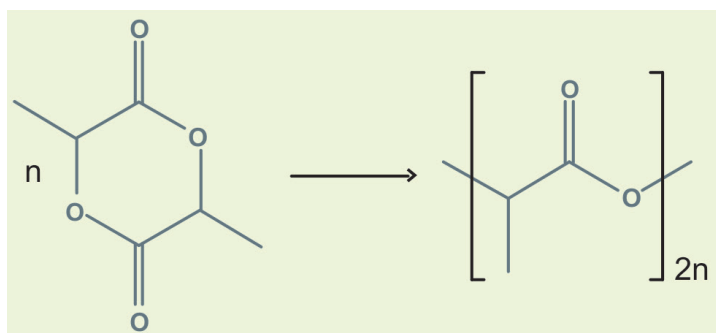
Obr. 13 Polymerace glykolidu za otevření kruhu a vzniku polyglykolidu.

Polyglykolid je tuhý termoplastický polymer s teplotou tání mezi 225–230 °C, teplotou skelného přechodu v rozmezí 35–40 °C a hustotou 1,530 g·mL⁻¹. Jeho vysoká krystalinita (mezi 45–55 %) způsobuje, že je ve vodě nerozpustný. Pokud má PGA vysokou molekulovou hmotnost, je nerozpustný i v řadě organických rozpouštědel (např. v acetonu,

dichlorethanu, chloroformu, ethylacetátu i tetrahydrofuranu), ale je rozpustný ve vysoce fluorovaných rozpouštědlech jako je hexafluoroisopropanol nebo seskvihydrát hexafluoroacetonu používaných na přípravu filmů a zvlákňování. Naproti tomu oligomery PGA jsou rozpustné lépe a mají významně jiné fyzikální vlastnosti. Z PGA byly připraveny porézní 3D nosiče (scaffoldy) pro tkáňové inženýrství s vysokou porozitou, viabilitou buněk, dobrou biokompatibilitou a mechanickými vlastnostmi. Jejich biodegradace je však ovlivněná metodou přípravy. Implantáty z PGA byly připraveny jak litím rozpouštědla do formy či lisováním, tak i vyplavováním porogenu. PGA byl komercializován pod názvem BIOFIX jako prostředek pro vnitřní fixaci kostí. Nicméně vysoká rychlost degradace a nízká rozpustnost spojená s nahromaděním kyselých degradačních produktů, které vedou k zánětlivým reakcím, limituje jeho samostatné využití v biomedicíně.

Polylaktid

Zkratka PLA je v literatuře uváděna pod dvěma názvy podle způsobu přípravy polymeru. Pokud je polymer připraven z kyseliny mléčné polykondenzací, pak je obecně označen jako polymléčná kyselina a pokud je připraven z laktidu polymerací ROP (Obr. 14), pak je označen jako polylaktid, který je známý již od r. 1932.



Obr. 14 Polymerace laktidu za otevření kruhu a vzniku polylaktidu.

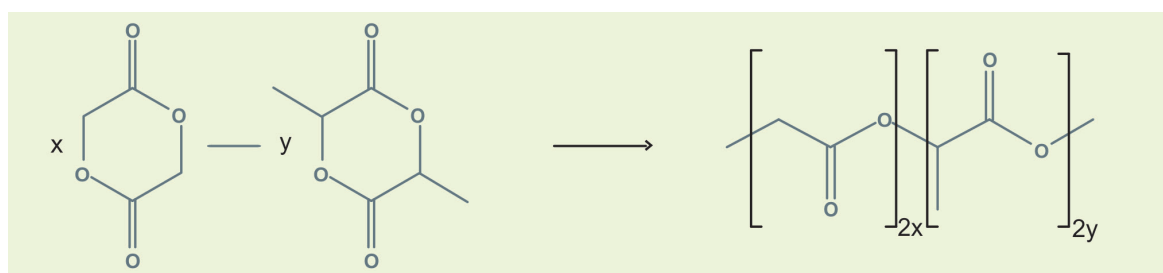
PLA je dostupná ve čtyřech formách: poly(L-kyselina mléčná), poly(D-kyselina mléčná), poly(meso-kyselina mléčná) a poly(D,L-kyselina mléčná). Z hlediska biomateriálů jsou nejvíce zkoumány L-PLA a D,L-PLA. L-PLA je vysoce krystalický izotaktický polymer a je preferován v aplikacích požadujících vysokou mechanickou pevnost a houževnatost jako jsou stehy, sponky a ortopedické prostředky. Jako šicí materiál byl FDA schválen již v r. 1971. D,L-PLA je obecně amorfni a obvykle je využíván jako nosič pro řízené

³<http://www.nationmaster.com/encyclopedia/Polyglycolide>

uvolňování léčiv nebo jako kostní fixační materiál, který je komerčně dostupný pod názvem FIXSORB (Takiron Co. Ltd., Osaka, Japan).

PLGA kopolymery

V mnoha aplikacích jsou spíše využívány kopolymery polymléčné a polyglykolové kyseliny tzv. poly(mléčná-co-glykolová kyselina) (PLGA) (Obr. 15) než jejich samotné formy. Pro klinické použití jsou schváleny již od r. 1966. Běžně jsou připravovány polymerací za otevření kruhu laktidu a glykolidu bez přítomnosti rozpouštědla za vysokých teplot nad 100 °C.



Obr. 15 Polymerace glykolidu a laktidu za otevření kruhu a vzniku poly(mléčné-co-glykolové kyseliny).

PLGA kopolymery mohou být jednoduše připraveny v různé konfiguraci, struktuře či formě a jejich fyzikální, chemické, mechanické a degradační vlastnosti mohou být „ušité na míru“ určité biomedicínské aplikaci. Rychlost degradace a mechanické vlastnosti mohou být řízeny poměrem PGA a PLA a mohou ovlivnit mnoho buněčných procesů zahrnujících růst buněk, regeneraci tkáně a odezvu hostitele. Tab. 1 shrnuje vlastnosti, degradace a aplikace PGA, PLA a PLGA. Kopolymery PLGA jsou obecně více amorfni než čisté homopolymery a tím více náchylnější k hydrolýze. Pokud však vzorek obsahuje vysoké zastoupení jednoho polymeru, pak bude více hydrolyticky stabilnější. Nicméně rozpustnost a houževnatost kopolymeru jsou limitovány jeho složením.

Tab. 1 Vlastnosti a aplikace PLA, PGA a PLGA.

Polymer	Krystalinita	T _g (°C)	Rychlost degradace ^a	Typické aplikace
PGA	Vysoce krystalický (T _m = 225 - 230 °C)	35 - 40	2 - 3 měsíce	Stehy, fixace zlomenin
L-PLA	Semikrystalický (T _m = 173 - 178 °C)	60 - 65	> 2 roky	Fixace zlomenin, náprava vazů
D,L-PLA	Amorfni	55 - 60	12 - 16 měsíců	Doprava léčiv
PLGA	Amorfni	45 - 55	1 - 6 měsíců ^b	Stehy, fixace zlomenin, ústní implantáty, doprava léčiv

^a Rychlost záleží na molekulové hmotnosti polymerů.

^b Rychlost se může měnit v závislosti na poměru LA a GA.

PLGA vykazuje oproti jiným syntetickým materiálům dobrou buněčnou adhezi a proliferaci nezbytnou pro tkáňové inženýrství, proto je tento kopolymer mnohem více studován a využíván v tkáňovém inženýrství než samotné PLA a PGA homopolymery. Mnoho článků a patentů uvádí mikro- a nano- techniky pro přípravu scaffoldů pro zabudování buněk nebo nosičů léčiv. PLGA o složení LA/GA 10/90 byl uznán FDA jako VICRYL® pro vstřebatelné stehy. A jeho využití se také plánuje v oblastech membrán pro řízenou regeneraci tkání (guided tissue regeneration = GTR), v zubním lékařství a pro injektovatelné nosiče léčiv, dále jako cévní štěpy, urologické stenty a kožní substráty. Nicméně stejně jako v případě samotného PGA a PLA mohou kyselé degradační produkty PLGA způsobovat v těle zánětlivou reakci.

2.2.1.2 POLY(β -ESTERY)

Další skupinou polyesterů využívaných v TE jsou lineární poly(β -estery) neboli poly 3 hydroxyalkanoáty (P3HA), které mohou být syntetizovány z cyklického laktonu nebo mikrobiálně pomocí bakterií např. *Bacillus Megaterium*, což je známo již od r. 1920. Kombinace mnoha monomerů vytváří materiály s různými vlastnostmi. Některé z nich vynikají výbornými bariérovými vlastnostmi pro plyny a mohou podléhat hydrolytické degradaci z povrchu erozí štěpením esterové vazby až na D-3-hydroxybutyrovou kyselinu, která je součástí krve.

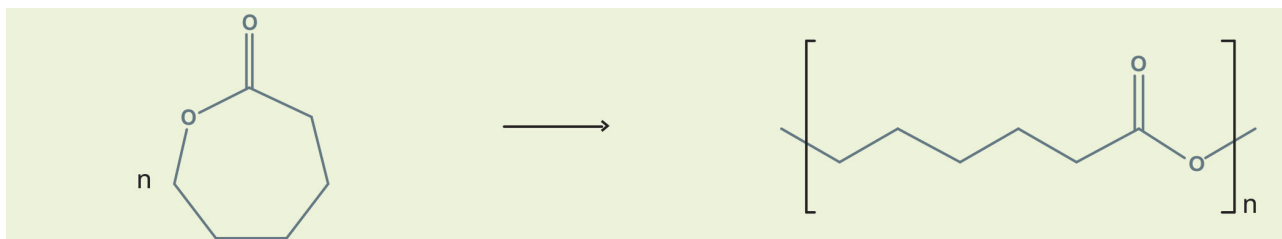
Abiotická hydrolýza PHA je relativně pomalá, mikrobiální hydrolýza je značně rychlejší a může být kontrolována různými technikami přípravy, molekulovou hmotností polymerů, složením kopolymerů nebo různých směsí PHA s přírodními i syntetickými polymery. Kopolymery PHA degradují rychleji než homopolymery a za aerobních podmínek polymery degradují až na oxid uhličitý a vodu. Nejpoužívanější je statistický kopolymer 3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát (PHBV), který se vyrábí od r. 1983 pod komerčním názvem Biopol®. Kopolymery jsou biodegradovatelné bakteriálně v různých médiích. Jejich vysoká cena (10x vyšší než u PP) ale limituje jejich širší využití. Díky jejich biodegradabilitě, biokompatibilitě a dobré zpracovatelnosti jsou P3HA používány jako matrice pro nosiče léčiv a pro tkáňové inženýrství. Jejich piezoelektrické vlastnosti umožňují jejich využití v ortopedii jako výztuže, které stimulují růst kosti.

2.2.1.3 POLYLAKTONY

Polylaktony patří mezi alifatické polyestery vzniklé polymerací cyklických esterů – laktonů se 4–7 členným kruhem.

Poly (ϵ -kaprolakton)

Mezi nejběžnější polylaktony patří poly (ϵ -kaprolakton) (PCL), který je obvykle syntetizován z cyklického ϵ -kaprolaktonu (Obr. 16) podobně jako polylaktidy. Poprvé byl připraven už v r. 1934. V současnosti je PCL vyráběn komerčně v průmyslovém měřítku.



Obr. 16 Polymerace ϵ -kaprolaktonu za otevření kruhu a vzniku poly(ϵ -kaprolaktonu).

Nízkomolekulární PCL se používá jako výrobní elastomer pro polyuretany a pro povrchovou úpravu látek. Vysokomolekulární PCL se využívá jako termoplastické aditivum lepidel a různých polymerů a díky své vysoké biokompatibilitě je PCL využíván také pro biomedicínské aplikace. Vzhledem k tomu, že dle dosavadních výsledků PCL potřebuje přibližně 3 roky na úplné odbourání z těla, je používán jako nosič léčiv pro dlouhodobé uvolňování. V nedávné době byl PCL klinicky použit na biodegradabilní svorky a šití ran. V současnosti je zkoumán z hlediska scaffoldů pro tkáňové inženýrství menisku a kostí.

Kopolymer s PCL

Rychlost hydrolýzy PCL může být řízena kopolymerací např. s valerolaktonem, kdy je degradace mnohem snazší nebo s D,L-laktidem (komerční produkt MONOCRYL®), kdy je degradace mnohem rychlejší. Diblokové kopolymer s PCL-PGA mají velice dobré elastické vlastnosti a scaffoldy s velikostí pórů $250 \pm 50 \mu\text{m}$ a porozitou 93 % po aplikování napětí 120 % vykázaly až 250 % prodloužení a 98 % navrácení do původního stavu. Tyto vlastnosti předurčují tyto materiály pro tkáňové inženýrství svalů. Jak už bylo výše řečeno, kyselé produkty alifatických polyesterů mohou vyvolávat nežádoucí reakce okolní tkáň, proto jsou často připravovány multiblokové kopolymer s LA, GA a CL s ostatními monomery za tvorby polyésteresterů, polyésterkarbonátů, polyésteramidů nebo polyésteruretanů.

2.2.1.4 BLOKOVÉ KOPOLYMERY S PEG

Jiným typem polyésteresteru jsou blokové kopolymer na bázi alifatického polyesteru a polyethylenglykolu (PEG). PEG je hydrofilní, netoxický, biokompatibilní materiál schopný

polymerace za vzniku hydrogelů, které jsou hojně využívány v tkáňovém inženýrství. PEG je připravován polymerací etylenoxidu, je komerčně dostupný v širokém spektru molekulových hmotností od 300–10000 g·mol⁻¹ a byl také uznán FDA jako látka pro možné vnitřní použití. Semikrystalická povaha esterových domén kombinovaná s flexibilně elastickými hydrofilními bloky PEG vytváří nové vlastnosti vzniklých kopolymerů. PEG může vytvořit povrch vysoce odolný biologické kontaminaci a může snížit adsorpci proteinů a rezistenci k adhezi bakteriálních a živočišných buněk. PEG není zřejmě také snadno odhalen imunitním systémem. Díky jeho velice dobré rozpustnosti ve vodě a většině organických rozpouštědel, může být snadno eliminován z těla tělními tekutinami.

Blokové kopolymery mají většinou zcela odlišné vlastnosti ve srovnání s jednotlivými homopolymery. Na bázi alifatických polyesterů a PEG byly připraveny různé druhy blokových kopolymerů, kde A je hydrofobní blok (např. PLLA, PDLA, PCL, PLGA) a B je hydrofilní blok (PEG) – dibloky AB, tribloky ABA nebo BAB, multi-bloky, mohou být rozvětvené, hvězdicovité nebo roubované. Rychlost biodegradace a hydrofilitu blokových kopolymerů je možné řídit právě poměrem jednotlivých složek polyesteru a PEG. Bylo zjištěno, že tyto biodegradabilní kopolymery mají termogelační schopnosti a vykazují vlastnosti fázového přechodu. V závislosti na chemickém složení a strukturálním typu kopolymeru může kopolymer vykazovat buď jeden fázový přechod (sol-gel nebo gel-sol) nebo dva fázové přechody (sol-gel-sol). Gelačních vlastností uvedených amfifilních kopolymerů bylo využito pro vývoj širokého spektra nosičů léčiv, jako jsou mikro/nanočástice, micely, hydrogely či injektovatelné systémy pro řízené uvolňování léčiv. S cílem získání lepších bioaktivních vlastností a případné možnosti síťování byly kopolymery na bázi PLGA a PEG dodatečně funkcionalizovány mnoha funkčními skupinami různými metodami. Kromě kopolymerů PEG s alifatickými estery byly připraveny i kopolymery PEG s aromatickým polybutylentereftalátem (PBT). Díky možnosti nastavení fyzikálních vlastností změnou poměru jednotlivých komponent jsou tyto materiály zkoumány pro mnoho biomedicínských aplikací, jako je náhrada kostí, kůže, nosiče léčiv atd.

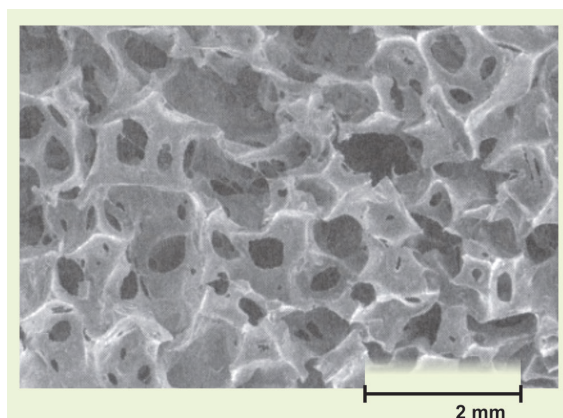
2.2.15 POLYESTERKARBONÁTY

Jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství především měkkých tkání se používají také polyesterkarbonáty. Tyto polymery jsou zkoumány mimo jiné také jako matrice nosičů léčiv. Pro jejich nízkou mechanickou odolnost jsou kopolymerovány s jinými

biodegradabilními polymery. Nejvíce zkoumaným polyesterkarbonátem je polyglykonát, kopolymer glykolidu s TMC. Tento polymer se dostal na trh v podobě flexibilních nití pod označením MAXON® a ortopedických šroubů Acufex®.

2.2.1.6 POLYESTERURETANY

Jako materiály pro umělé srdce a cévní a tracheální protézy jsou intenzivně zkoumány také segmentované polyuretanové elastomery získané reakcí diolů a diizokyanátů. Tyto materiály vykazují výborné mechanické vlastnosti, chemickou všestrannost, biokompatibilitu a biostabilitu. Nicméně polyesteruretany získané reakcí polyesterdiolů jsou hydrolyticky nestabilní. Proto jsou v biodegradabilních polyesteruretanech kopolymery laktid/glykolid nebo polykaprolaktony používány jako měkké segmenty a polypeptidy jako tvrdé segmenty. Pro přípravu scaffoldů je nezbytná také přítomnost velkého množství porogenu (soli nebo želatiny – cca 85 %) pro vznik interpenetrujících pórů. Nedávno byl za tímto účelem vyvinut biodegradabilní elastický polyesteruretan Degrapol. Tyto injekčně aplikovatelné polyuretanové porézní scaffoldy byly připraveny „one shot“ procesem. Scaffold má 95 % porozitu s velikostmi pórů mezi 100–1000 μm (Obr. 17). Degradace při 37 °C v PBS byla zhruba 10 % po 8 týdnech.



Obr. 17 Snímek morfologie injekčně aplikované polyesteruretanové pěny pořízený rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM).

2.2.1.7 POLYPROPYLENFUMARÁTY

Některé biomedicínské aplikace, jako jsou nepravidelné defekty kostí nebo měkké tkáně, vyžadují materiály, které vykazují konzistenci tekutou anebo mají formu pasty,

kteřá může být použita do daného tvaru defektu za fyziologických podmínek. Třídou nenasycených degradabilních polyesterů, která je výrazně studována pro ortopedické injekční aplikace, jsou také polypropylenfumaráty (PPF), které mohou být zesítěny samy se sebou nebo za přítomnosti síťovacího činidla (N-vinylpyrrolidonu) díky nenasycené vazbě pocházející z kyseliny fumarové. Degradacími produkty PPF in vivo je kyselina fumarová, přirozeně se vyskytující v Krebsově cyklu, propylenglykol, který se běžně používá na ředění léků, a kopolymer kyseliny poly(fumarové-co-akrylové). Mechanické vlastnosti jsou často upravovány přidávkem keramických materiálů jako je fosforečnan vápenatý (TCP), uhličitan vápenatý nebo síran vápenatý. Kompozitní materiál vykazuje pevnost v oblasti 2–30 MPa. Takové materiály ztrácí 20 % hmotnosti in vivo od 84 dnů (PPF/TCP) do 200 dnů (PPF/ CaSO₄).

2.2.1.8 POLYORTOESTERY

Polyortoester (POE) byl vyvinut společností ALZA jako hydrofobní polymer s hydrolyticky citlivým hlavním řetězcem a byl uveden pod značkou Alzamer převážně jako nosič léčiv. Vysoce hydrofobní matrice snižuje penetraci vody do polymeru a omezuje hydrolytickou degradaci povrchu. Proto tyto polymery podléhají erozi povrchu a rychlost degradace může být řízena použitím diolů s různým stupněm flexibility řetězce, jakož i inkorporací kyselých a zásaditých pomocných látek. Kromě nosičů léčiv jsou tyto polymery využívány k tlumení postoperačních bolestí a léčbě nemocí očí. Dále byly tyto polymery vyvíjeny pro ortopedické aplikace. Přidávkem bloku laktidu do polymerní struktury POE je možné řídit dobu degradace od 15 do stovky dní. Degradace laktidových bloků poskytuje karboxylové kyseliny, které katalyzují degradaci ortoesteru. Studie POE in vivo potvrdily větší iniciaci růstu kosti ve srovnání s PLGA kopolymerem.

2.2.2 POLYANHYDRIDY

Polyanhydridy (PAH) patří do skupiny syntetických polymerů, které erodují z povrchu a vytvářejí tak nejvíce hydrolyticky nestabilní polymery. Poprvé byly syntetizovány v r. 1909. Alifatické anhydridy byly v r. 1980 navrženy jako vhodné polymery pro nosiče léčiv. Alifatický homopolymer polyanhydrid kyseliny sebakové je vysoce krystalický polymer s vysokou rychlostí degradace, která limituje jeho využití. Snížení rychlosti degradace je dosaženo kopolymerací sebakové kyseliny s vysoce hydrofobními monomery jako jsou

např. lineární dimery mastných kyselin. Nejznámější je kopolymer karbofenoxipropanu a sebakové kyseliny, který byl FDA potvrzen jako nosičová matrice chemoterapeutika na léčbu nádoru mozku pod komerčním označením GLIADEL®. Na zvýšení mechanických vlastností polyanhydridů je možné zabudovat segmenty imidu, které byly také zkoumány jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství.

2.2.3 POLYALKYLKYANOAKRYLÁTY

Polyalkylkyanoakryláty (PACA) jsou unikátní skupinou biodegradabilních polymerů, u kterých jsou vazby uhlík-uhlík štěpeny hydrolýzou. Díky jejich mechanickým vlastnostem mohou být použity jako nosiče na cílenou dopravu léčiv, tkáňová lepidla, embolizační činidla a hemostatické tmely. Jejich rychlost degradace závisí na délce alkylového řetězce a může být řádově hodiny až dny. Nanočástice butylkyanoakrylátu jsou zkoumány jako nosiče peptidů a protirakovinových léčiv. 2-oktylkyanoakrylát byl schválený FDA jako tkáňové lepidlo Dermabond®.

2.2.4 POLYIMINOKARBONÁTY

Neboli pseudo polyaminokyseliny, kde jsou monomery aminových kyselin vázány neamidickými vazbami, jako jsou vazby esterové nebo karbonátové. Nejpoužívanější polymer pseudoaminových kyselin je odvozen od tyrosinu a poskytuje vhodné mechanické vlastnosti. Polykarbonáty derivované od tyrosinu podléhají hydrolýze karbonátových vazeb i esterových vazeb na bočním řetězci. Konečné produkty degradace jsou tyrosin a dioly. Díky pomalé rychlosti degradace a excelentní biokompatibilitě byly tyto materiály použity jako nosiče pro dlouhodobé uvolňování léčiv jako je např. dopamin. Jejich vynikající osteokompatibilita předurčuje tyto tyrosinové polykarbonáty k použití jako ortopedické náhrady.

2.2.5 POLYFOSFAZENY

Polyfosfazeny patří do skupiny anorganických polymerů, které mohou být připraveny různými metodami pro jednotlivé aplikace. Jsou to lineární vysokomolekulární polymery, jejichž anorganický hlavní řetězec obsahuje střídavě atomy fosforu a dusíku, kde fosfor je ložiskem dvou organických vedlejších skupin. Degradací produkty jsou neutrální

a netoxické ze skupiny fosfátů, amoniaku a odpovídajících vedlejších skupin. Biodegradabilní polyfosfazeny jsou studovány jako matrice pro nosiče léčiv, přesněji pro proteiny. Jejich dobrá biokompatibilita umožňuje jejich použití pro tkáňové inženýrství kostí a nervů.

2.2.6 POLYFOSFOESTERY

Polyfosfoestery jsou dalšími anorganickými polymery obsahujícími atomy fosforu na hlavním řetězci. Tyto polymery, objevené v r. 1970, jsou analogické k nukleovým kyselinám. Vhodná je i kopolymerace polyfosfoesterů s jinými monomery za vzniku nových degradabilních polymerů – např. poly(laktid-co-etylfosfát), který je studován pro biomedicínské aplikace. Degradacími produkty jsou fosfát, alkohol a dioly. Matrice poly(laktid-co-etylfosfát) uvolňuje chemoterapeutická léčiva (např. paclitaxol) téměř kinetikou nultého řádu a proto je momentálně klinicky studovaná pod komerčním názvem PACLIMER®.

2.3 BIOPOLYMERY A JEJICH KOMBINACE SE SYNTECKÝMI POLYMERY

Níže jsou uvedeny nejpoužívanější přírodní polymery z oblasti proteinů a polysacharidů a jejich kombinace s biodegradabilními syntetickými polymery pro aplikace v biomedicině a tkáňovém inženýrství.

2.3.1 PROTEINY

První velkou skupinou biopolymerů jsou proteiny. Jedná se o vysokomolekulární přírodní látky s relativní molekulovou hmotností 10^3 až 10^6 složené z více než 100 aminokyselin. Naproti tomu oligopeptidy jsou složené z 2–10 aminokyselin a polypeptidy z 11–100 aminokyselin. Aminokyseliny jsou vzájemně vázány peptidovou vazbou –NH–CO–. Jejich samouspořádávání neboli „self-assembly“ se využívá k syntéze nových nanostrukturovaných materiálů pro širokou oblast biomedicíny včetně nosičů léčiv nebo hydrogelů pro tkáňové inženýrství. V posledních deseti letech se pozornost soustředí na kopolymery polyester–polypeptid, protože funkční karboxylové –COOH skupiny kyseliny

asparagové a glutamové v kombinaci s $-NH_2$ skupinami lysinu mohou zvýšit interakci polymeru k proteinům a buňkám nebo mohou být kovalentně navázány na léčiva, protilátky nebo DNA.

2.3.1.1 TRIPEPTIDOVÁ SEKVENCE RGD

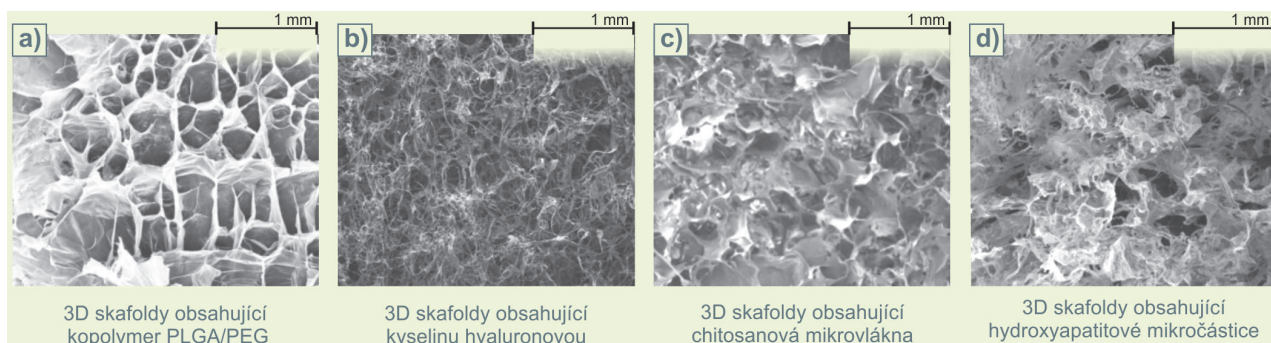
Od doby, kdy bylo zjištěno, že tripeptidová sekvence arginin-glycin-asparagová kyselina (Arg-Gly-Asp) neboli RGD je nejméně buňkami rozeznatelná sekvence v mnoha extracelulární matrix proteinů a krevních bílkovin, jsou peptidy obsahující RGD zabudovávány i do mnoha syntetických a nedegradabilních polymerů obsahujících hydroxylové nebo karboxylové skupiny, např. polyuretany. Později byly připraveny biodegradabilní kopolymery PLLA-lysin, na které byly navázány také oligopeptidové sekvence GRGDY. Nedávno byla sekvence GRGDS např. naroubována na PCL chemickou metodou „klik“ nebo také byly vyvinuty super pH citlivé multifunkční polymerní micely kopolymerací PLLA, PEG, poly(L-histinu) a biotinu jako nosiče léčiva dexorubicinu, nebo byla buněčná afinita u nově navrženého termocitlivého diblokového kopolymeru kyseliny polyasparagové a PLA a triblokového kopolymeru PGL-PLLA-PGL kyseliny polyglutamové (PGL), kde na polymerní řetězce byl také naroubován RGD protein.

2.3.1.2 KOLAGEN

Nejpoužívanějším proteinem v tkáňové inženýrství je kolagen, který vyniká nízkou antigenicitou, výbornou biokompatibilitou a interakcí s buňkami. Je to nejrozšířenější bílkovina, která zaujímá 20–30 % ze všech bílkovin v organismu savců. Kolagen je i přes to, že je ve vodě nerozpustný, také plně biodegradabilní a je známých jeho 27 různých druhů. Sekundární struktura tvoří trojřetězovou helikální strukturu tzv. trojšroubovici. Kolagen podléhá in vivo multienzymatickému odbourávání, kdy jsou vlákna proteinu degradována z povrchu za odštěpování N-terminálních skupin alfa-helixu. Hydrolýzou za teplot vyšších než 40°C dochází k denaturaci kolagenu a vzniká želatina, která ztrácí mechanické vlastnosti kolagenu i biologickou aktivitu.

Kolagen je nejhojněji používaným proteinem na přípravu scaffoldů pro TE metodou lyofilizace – neboli sušením pomocí vymražování vodného rozpouštědla. Samotný kolagen má však příliš malé póry, slabou interkonektivitu a není schopen udržet prostorovou integritu. Na zvýšení jeho mechanické pevnosti a kontroly adheze buněk

je proto nutné kolagen zesítovat nebo kombinovat s jinými biomateriály, jako je např. kyselina hyaluronová, chitosan, elastin, albumin, fibrin, celulóza, škrob a syntetickými polymery PGA, PLA, PLGA, PCL, PEG, případně s anorganickým materiálem, jako je hydroxyapatit (HAP). Příkladem kompozitního materiálu je například hybridní houba z PLGA a kolagenu (Obr. 18), případně PLLA a kolagenu.

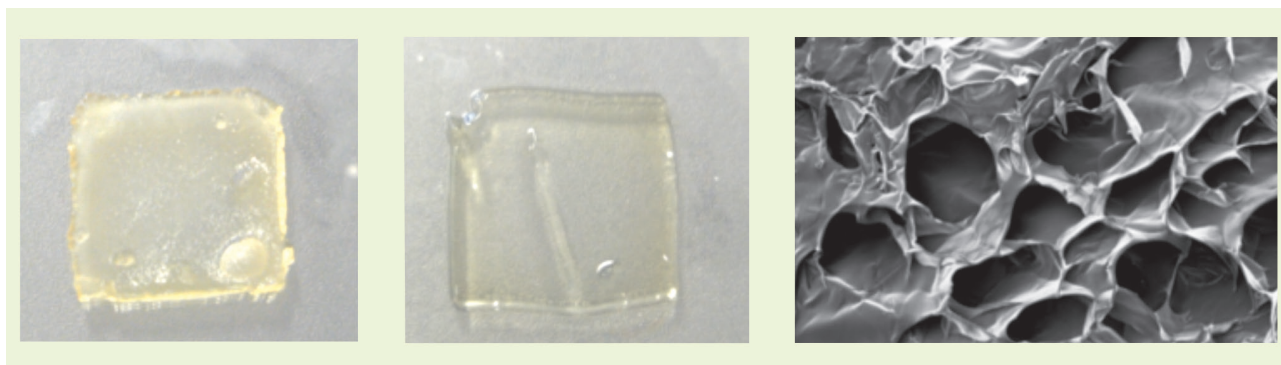


Obr. 18 Kolagenové porézní 3D scaffoldy obsahující A) kopolymer PLGA/PEG, B) kyselinu hyaluronovou, C) chitosanová mikrovlákná, D) hydroxyapatitové mikročástice.

Nebo kdy nanovlákná PLLA byla impregnována mikrokuličkami želatiny. Byl připravený také hydrogel složený z PLGA a želatiny, do kterého bylo posléze přidáno síťovadlo, které zkracuje dobu nutnou ke gelaci, který je možné použít jako náhražku fibrinového lepidla. Jiným příkladem jsou např. kopolymery na bázi kolagenu a polyuretanu (PUR), kdy bylo zjištěno, že tyto materiály podporují růst endoteliálních buněk. Tyto produkty mají velký potenciál v tkáňovém inženýrství cévních náhrad.

2.3.1.3 ELASTIN

Dalším hojně využívaným proteinem je elastin. Je to vláknitý, ve vodě nerozpustný skleroprotein obsahující aminokyseliny glycin, alanin, prolin, valin a leucin. Celkem je složen z 830 AK s molekulovou hmotností 64 kDa, jeho izoelektrický bod $pI = 10$. Elastin je přirozenou složkou ECM a vyskytuje se převážně v elastických tkáních, jako jsou cévy, vazy, kůže a šlachy. Používá se na přípravu nanovláken elektrospínáním nebo přípravu scaffoldů pro TE cév a vazů (Obr. 19).



Obr. 19 Elastinové hydrogely.

2.3.2 POLYSACHARIDY

Druhou velkou skupinou biopolymerů jsou polysacharidy, které jsou složené z monosacharidů (více než 10) vázaných glykosidickými vazbami. Polysacharidy jsou silně hydrofilní látky schopné vytvářet velké množství vodíkových můstků. Jsou snadno dostupné v průmyslovém měřítku, avšak obtížně zpracovatelné, a proto pro mechanicky namáhané výrobky méně vhodné v porovnání se syntetickými polymery.

2.3.2.1 CHITOSAN

Chitosan se získává deacetylací chitinu z živočišných zdrojů (krunýře krabů, krevet, chrupavčitá struna hlavonožců), rostlinných (hlíva ústříčná, žampiony) nebo mikroorganismů. Chitosan je jediný kationický polysacharid a proto nese specificky interaguje s buňkami. Chitosan je plně biokompatibilní a biodegradovatelný (poměrně pomalu), mukoadhesivní a jako jediný polysacharid je štěpen proteolytickými enzymy. Navíc vykazuje antimikrobiální aktivitu proti G⁺, G⁻ bakteriím a plísním. Chitosan byl roubovaný metodou aminolýzy na nanovlákněný PLLA nosič připravený elektrospínáním. Jiným příkladem jsou nanovlákněná PLGA–chitosan/polyvinylalkohol elektrospínovaná pomocí dvou stříkaček do formy kompozitní membrány. Chitosan vykazuje adhezi fibroblastů a jejich proliferaci umožňující jeho využití pro rekonstrukci kůže. Směsi PCL a chitosanu byly připraveny jak metodou mísení v tavenině, tak použitím rozpouštědla.

2.3.2.2 CELULÓZA

Celulóza neboli poly(β 1-4 anhydroglukóza) je lineární polymer D-glukózy spojené β (1 \rightarrow 4)-glykosidickými vazbami. Díky silným vodíkovým vazbám je obtížně hydrolyzovatelná a špatně se rozpouští. Enzymatická degradace glykosidovou hydrolázou štěpí celulózu na menší cukry. Je biokompatibilní s buňkami kostí (osteocyty) a krve (hepatocyty). Bakteriální celulóza je prostá endotoxinů, nezánětlivá a vhodná jako materiál pro zabudování a kultivaci fibroblastů. Celulóza prakticky není biodegradovatelná. Deriváty celulózy zajišťují různou rozpustnost celulózy jak v organických rozpouštědlech, tak i ve vodě. Karboxymethylcelulóza se využívá v dermatologii k hojení ran. Oxycelulóza je hypoalergenní, atraumatická, imunostimulační a protirakovinová. V současnosti se používá nejvíce jako hemostatikum ve formě filmů, spreje (Traumacel[®] CZ) nebo (nano) vláken. Diacetát celulózy kopolymerovaný s kyselinou mléčnou má vyšší houževnatost, která při obsahu 79 % PLA dosáhla zvýšení houževnatosti až na 2000 %. Nejvíce se modifikovaná celulóza používá k přípravě nanovláken elektrospínáním. Nedávno byla např. vědci z Brna připravena nová anibakteriální nanovláknina z oxidované celulózy a želatiny vhodná k hojení ran po popálení.

2.3.2.3 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová (HA) je polysacharid objevený v r. 1934, který přirozeně existuje ve formě polyaniontu. HA je přirozenou složkou mezibuněčné hmoty a je plně biodegradabilní, biokompatibilní a bioresorbovatelná. Díky unikátním strukturálním vlastnostem hydratujícím ECM a díky specifické biologické aktivitě má HA regenerační schopnosti a je často využívána k hojení ran (např. Hyiodine[®]). Důležitou roli HA hraje také při diferenciaci a růstu buněk, protože je neimunogenní a zajišťuje specifické interakce s buňkami. Pro zlepšení mechanických vlastností a rychlosti degradace bývá HA často modifikována jinými polymery, chemicky funkcionalizována nebo zesítěna za tvorby hydrogelu, houbiček, (nano)vláken a netkaných plstí pro scaffoldy využitelné v tkáňovém inženýrství. Např. esterifikovaná HA pod komerčním názvem HYAFF[®] nebo ACPTM je používána jako scaffold na regeneraci chrupavek a kostních defektů.

HA může být modifikována jak přírodními polymery (kolagen, želatina, chitosan, agarosa, fibrin, fibronectin, chondroitin sulfát), tak i syntetickými polymery (PLA, PGA, PEG, hydroxyethylmethakrylát). Např. scaffold HA-kolagen pod názvem Hyalograft C byl FDA schválen na léčbu defektů hyalinních chrupavek a je využíván v klinické praxi.

Sítované scaffoldy HA/PGA mohou být použity na expresi genů pro buňky menisků a HA (nebo HA/PEG) roubovaná na PLGA kopolymer, se zabudovaným morfogenním proteinem kostí (BMP-2), je zkoumána jako materiál na regeneraci kostí. Scaffoldy z nanovláken připravených elektrospínáním HA/PCL/kolagenu (Hepracil TM) podporují adhezi buněk a vaskularizaci a jsou používány na cévní aplikace a nanovláčkové HA/PLLA zase na spinální aplikace.

2.4 POLYMERNÍ NANOKOMPOZITY

Kombinací syntetických polymerů a nanovláken nebo nanočástic byly připraveny nanokompozity pro biomedicínu. Tyto materiály mohou být použity jako substráty k imobilizaci biomolekul např. v řízeném uvolňování částic, tkáňovém inženýrství, diagnostice nebo bioseparaci. Díky velkému specifickému povrchu nanovláken i nanočástic a relativně malým rozměrům jsou tyto materiály vhodné pro imobilizaci více kompaktních biomolekul. Snižují např. velikost elektrospínované polymerní membrány a zvyšují její citlivost. Pro tkáňové inženýrství kostí jsou nejvíce studovány kompozitní materiály polymer/biokeramika jako je např. PLLA/HAP, PLLA/bioaktivní sklo, PLGA/PEG/HAP a PLGA-PEG-PLGA/HAP. Ostatní anorganické biodegradabilní kompozity s uhlíkovými nanotrubicami jsou také používány ve tkáňovém inženýrství, například v kombinaci s PPF při přípravě scaffoldů pro regeneraci kostí. Nedávno bylo např. prokázáno, že směs s grafenem může zvýšit hydrofilnost hydrofobního scaffoldu.

2.5 REFERENCE A SLOVNÍK POJMŮ

1. La Mantia FP, Loutcheva MK, Proietto M. Competition between degradation and chain extension during processing of reclaimed poly(ethylene terephthalate). *Polymer Degradation and Stability* 1998; 61: 417-420.
2. Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, and Leonard F. Biodegradable poly (lactic acid) polymers, *J Biomed Mater Res* 1971; 5:169-181.
3. Gupta AP, Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *European Polymer Journal* 2007; 43: 4053-4074.

4. Fikr, J. Názvosloví organické chemie. [s.l.]: Rubico; 2004. s. 244.
5. Reed AM, Gilding DK. Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(acetic acid) homo- and copolymers: 2. *Polymer* 1981; 22: 494-498.
6. Kohn J, Abramson S, Langer R. Bioresorbable and bioerodible materials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science*. New York: Elsevier; 2004. p. 115-27.
7. Lakshmi S Nair, Cato T Laurencin. *Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery*. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2006; 102: 47-90.
8. Singh VM. *Synthesis of Polylactide with Varying Molecular Weight and Aliphatic Content: Effect on Moisture Sorption*. A Thesis Submitted to the Faculty of Drexel University By Vishesh M. Singh in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Chemical Engineering; 2008.
9. Ito T, Kudo M, Yozu R. Usefulness of Osteosynthesis Device Made of Hydroxyapatite-Poly-L-Lactide Composites in Port-Access Cardiac Surgery. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2008; 86: 1905-1908.
10. Huh KM, Cho YW, Park K. PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations. *Drug Delivery Technology*. 2003; 3: 1-10.
11. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*. 2007; 3: 762-798.
12. Martin C, Winet H and Bao JY. Acidity near eroding polylactide-polyglycolide in vitro and in vivo in rabbit tibial bone chambers. *Biomaterials* 1996; 17: 2373-2380
13. Holland SJ, Tighe BJ. "Biodegradable polymers," in *Advances in Pharmaceutical Science*, Academic Press, London, UK; 1992. p. 101-164.
14. Kassab AC, Xu K, Denkbass EB, Dou Y, Zhao S, Piskin E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent. *J Biomater Sci Polym Ed* 1997; 8: 947-961.

15. Reddy CSK, Ghai R, Rashmi Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour technol* 2003; 87: 137-146.
16. Woodruff MA, Hutmacher W. The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sc* 2010; 35: 1217-1256.
17. Schantz JT, Hutmacher DW, Lam CFX, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng* 2003; 9(1): 127-139.
18. Lee SH, Seong SC, Lee JH, Han IK, Oh SH, Cho KJ, Han HS, Lee MC. Porous polymer prosthesis for meniscal regeneration. *Key Eng Mater* 2007; 342-343: 33-36.
19. Lee SH, Kim BS, Kim SH, Choi SW, Jeong SI, Kwon IK et al. Elastic poly(glycolide-co-caprolactone) scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 66: 29-37.
20. Ueda H, Tabata Y. Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 501-518.
21. Tian H, Tang Z, Zhuang X, Chen X, Jing X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science* 2012; 37: 237- 280.
22. Vernego J. Injectable Bioadhesive Hydrogels for Nucleus Pulposus Replacemnt and repair of the Damaged Intervertebral Disc. A Thesis Submitted to the Faculty of Drexel University By Jennifer Vernengo in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy; 2007.
23. Harris JM. Poly (ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Application. Springer. Plenum Press: New York and London; 1992. p. 385.
24. Loh XJ, Li J. Review. Biodegradable thermosensitive copolymer hydrogels for drug delivery. *Expert Opinion Ther. Patents* 2007; 17: 965-977.
25. Huang SJ, Edelman PG, Han YK. Synthesis and Characterization of Crosslinked Polymers for Biomedical Composites. *J Macromol Sci Chem* 1988; A 25: 847-869.

26. Turunen MPK, Korhonen H, Tuominen J, Seppälä JV. Synthesis, characterization and crosslinking of functional star-shaped poly(ϵ -caprolactone), *Polym Int* 2001; 51: 92-100.
27. Helminen A, Korhonen H, Seppälä JV. Synthesis of poly(ester-anhydride)s based on poly(ϵ -caprolactone) prepolymer. *J Appl Polym Sci* 2001; 81: 176-185.
28. Korhonen H, Helminen A, Seppälä JV. Biodegradable crosslinked polymers based on triethoxysilane terminated polylactide oligomers. *Polymer* 2001; 42: 3345-3353.
29. Ramos M, Huang SJ. *Functional Condensation Polymers*, Edt. Kluwer Academic, New York. 2002. p. 185.
30. Michlovská L, Vojtova L, Mravcová L, Hermanová S, Kučerík J, Jančář J. Functionalized Conditions of PLGA-PEG-PLGA Copolymer with Itaconic Anhydride. *Macromol Symp* 2010; 295: 119-124.
31. Bezemer JM, Grijpma DW, Dijkstra PJ, van Blitterswijk CA, Feijen J. Control of protein delivery from amphiphilic poly(ether ester) multiblock copolymers by varying their water content using emulsification techniques. *J Control Release*. 2000; 66: 307-320.
32. Schappacher M, Fabre T, Mingotaud AF, Soum A. Study of a (trimethylenecarbonate-co-epsilon-caprolactone) polymer part 1: preparation of a new nerve guide through controlled random copolymerization using rare earth catalysts. *Biomaterials*. 2001; 22: 2849-2855.
33. Saad B, Hirt TD, Welti M, Uhlscgmid GK, Neuenschwander P, Suter UW. Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: in vitro and in vivo evaluations. *J Biomed Mater Res* 1997; 36: 65-74.
34. Guelcher SA, Patel V, Gallagher KM, Connolly S, Didier JE, Doctor JS, Hollinger JO. Synthesis and in vitro biocompatibility of injectable polyurethane foam scaffolds. *Tissue Eng* 2006; 12(5): 1247-59.
35. Timmer MD, Ambrose CG, Mikos AG. In Vitro Degradation of Polymeric Networks of Poly (Propylene Fumarate) and the Crosslinking Macromer Poly (Propylene Fumarate)-Diacrylate. *Biomaterials* 2003; 24: 571-577.

36. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2405–2412.
37. Peter SJ, Nolley JA, Widmer MS, Merwin JE, Yazemski MJ, Yasko AW, Engel PS, Mikos AG. In vitro degradation of a poly(propylene fumarate)/βtricalcium phosphate composition orthopaedic scaffold. *Tissue Eng* 1997; 3: 207–215.
38. Heller J, Barr J, Ng SY, Abdellauoi KS, Gurny R. Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1015–1039.
39. Ng SY, Vandamme T, Tayler MS, Heller J. Synthesis and erosion studies of self-catalysed poly(orthoester)s. *Macromolecules* 1997; 30: 770–772.
40. Bucher JE, Slade WC. Anhydrides isophthalic and terephthalic acids. *J Am Chem Soc* 1909; 31: 1319–1321.
41. Gopferich A, Tessmar J. Polyanhydride degradation and erosion. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 911–931.
42. Jiang HL, ZHU KJ. Synthesis, characterization and in vitro degradation of a new family of alternate poly(ester-anhydrides) based on aliphatic and aromatic diacids *Biomaterials* 2001; 22: 211–218.
43. Lherm C, Moiler RH, Puizieux F, Couvreur P. Alkylcyanoacrylate drug carriers: II. Cytotoxicity of cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length. *Int J Pharm* 1992; 84: 13–22.
44. Harmia T, Kreuter J, Speiser P, Boye T, Gurny R, Kubi A. Enhancement of the myotic response of rabbits with pilocarpine-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm* 1986; 33: 187–193.
45. Spotnitz WD, Burks S, Mercer D. Clinical indications for surgical tissue adhesives. In: Lewandrowski KU et al. (editors). *Tissue engineering and biodegradable equivalents: scientific and clinical applications*. Marcel Dekker, New Yor. 2002; p. 651.

46. Choueka J, Charvet JL, Koval KJ, Alexander H, James KS, Hooper KA, Kohn J. Canine bone response to tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid). *J Biomed Mater Res* 1996; 31: 35-41.
47. Andrianov AK, Payne LG. Protein release from polyphosphazene matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 31: 185-196.
48. Langone F, Lora S, Veronese FM, Calcetti P, Parnigotto PP, Valenti F, Palma G. Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials* 1995; 16: 347-353.
49. Zhao Z, Wang J, Mao H, Leong KW. Polyphosphoesters in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(4): 483-499.
50. Wamsley A, Phiasivongsa P, Jasti B, Li XL. Microstructural characterization of terpolymers of leucine, β -benzyl aspartate, and valine. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2006; 44: 4328-4337.
51. Deng MX, et. al. Synthesis of a novel structural triblock copolymer of poly(γ -benzyl-(glutamic acid)-*b*-poly(ethylene oxide)-*b*-poly(ϵ -caprolactone). *Biomaterials* 2004; 25: 3553-3558.
52. Anderheiden D, Brenner O, Klee D, Kaufmann R, Richter HA, Mittermayer C, Hocker H. Development and characterization of a biocompatible OH-modified copolymer based on polyurethane. *Angew Mackromol Chem* 1991; 185: 109-127.
53. Barrera DA, Zylsrta E, Lansbury PT, Langer R. Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer: poly(lactic acid-co-lysine). *J Am Chem Soc* 1993; 115: 11010-11011.
54. Lee ES, Na K, Bae YH. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle. *Nano Lett* 2005; 5: 325-329.
55. Deng C, Chen XS, Sun J, Lu TC, Wang WS, Jing XB. RGD peptide grafted biodegradable amphiphilic triblock copolymer poly(glutamic acid)-*b*-poly(L-lactide)-*b*-poly(glutamic acid): synthesis and self-assembly. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2007; 45: 3218-30.

56. Prosecká E, Rampichová M, Vojtová L, Tvrđík D, Melčáková Š, Juhasová J, Plcner M, Jakubová R, Jančář J, Nečas A, Kochová P, Klepáček J, Tonar Z, Amler E. Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2011; 99A(2): 307-315.
57. Sloviková A, Vojtová L, Jančář J. Preparation and modification of collagen- based scaffold for tissue engineering. *Chemical Papers* 2008; 62(4): 417-422.
58. Nečas A, Vojtová L, Jančář J. Quality of Newly Formed Cartilaginous Tissue in Defects of Articular Surface after Transplantation of Mesenchymal Stem Cells in a Composite Scaffold Based on Collagen I with Chitosan Micro- and nanofibres. *Physiological Research* 2010; 59(4): 605-614.
59. Guoping CH., et al. Application of PLGA-collagen hybrid mesh for three-dimensional culture of canine anterior cruciate ligament cells. *Materials Science and Engineering* 2004; 24: 861-866.
60. Takashi S, et al. Evaluation of PLLA-collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering* 2004; 24: 365-372.
61. Xiaohua L, et al. Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27: 3980-3987.
62. Yanhui L, Yudong H. Preparation of Collagen-Polyurethane Composite Film and Its Subcutaneous Implantation in Rats: The Improvement of Tissue Compatibility. WileyPeriodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 2005; 99: 1832-1841.
63. Nivison-Smith L, Weiss A. Elastin Based Constructs. Chapter 15 in „Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials“, book edited by Daniel Eberli, 2011.
64. Cui W, Cheng L, Li H, Zhou Y, Zhang Y and Chang J. Preparation of hydrophilic poly(L-lactide) electrospun fibrous scaffolds modified with chitosan for enhanced cell Biokompatibility. *Polymer* 2012; 53: 2298-305.

65. Yang Zhang B, Kangde Yao A. Macromolecular Nanotechnology A nanofibrous composite membrane of PLGA–chitosan/PVA prepared by electrospinning European Polymer Journal 2006; 42: 2013–2022.
66. Duan B, Wu L, Li X, Yuan X, Li X, Zhang Y and Yao K. Degradation of electrospun PLGA–chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro J Biomater Sci Polym Edn 2007; 18: 95–115.
67. Teramoto Y, Nishio Y, Cellulose diacetate–graft–poly(lactic acid)s: synthesis of wide-ranging compositions and their thermal and mechanical properties. Polymer 2003; 44: 2701–2709.
68. Švachová V, Jančář J, Vojtová L, Alberti M, Pavliňák D, Hyršl P. Composition for modified gelatin nanofibers and nanofibers. Czech Intel. Property, Prague, PUV 2014–29043, 2014-08-01.
69. Maurice N, Collins A, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering: A review. Carbohydrate Polymers 2013; 92: 1262–1279
70. Nehrer S, Domayer S, Dorotka R, Schatz K, Bindreiter U, Kotz R. Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. Eur J Radiol 2006; 57: 3–8.
71. Freymann U, Endres M, Neumann K, Scholman HJ, Morawietz L, Kaps C. Expanded human meniscus-derived cells in 3-D polymer hyaluronan scaffolds for meniscus repair. Acta Biomaterialia 2011; 8(2): 677–685.
72. Park JK, Shim JH, Kang KS, Yeom J, Jung HS, Kim JY, et al. Solid freeform fabrication of tissue-engineering scaffolds with a poly(lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid conjugate encapsulating an intact bone morphogenetic protein–2/poly(ethylene glycol) complex. Advanced Functional Materials 2011; 21(15): 2906–2912.

73. Ekaputra AK, Prestwich GD, Cool SM, Hutmacher DW. The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly (caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel. *Biomaterials* 2011; 32: 8108–8117.

74. Nesti LJ, Li WJ, Shanti RM, Jiang YJ, Jackson W, Freedman BA, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam. *Tissue Engineering. Part A* 2008; 14(9): 1527–1537.

75. Zhang PB, Hong ZK, Yu T, Chen XS, Jing XB. In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-coglycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(l-lactide). *Biomaterials* 2009; 30: 58–70.

76. Chamradová I, Vojtová L, Michlovská L, Jančář J. Rheological studies of PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer modified using hydroxyapatite. In *Studentská konference Chemie je život 2012*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 304–309.

77. Katanec D, Pavelic B, Ivasovic Z. Efficiency of Polylactide/Polyglycolide Copolymers Bone Replacements in Bone Defects Healing Measured by Densitometry. *Coll. Antropol.* 28 (2004) 1: 331–336

78. Bush A, Thomas AV, Yu ZZ and Koratkar NA. Wetting behavior of graphene-chitosan nanocomposites for 3D scaffold structures. *Adv Sci Eng Med* 2012; 4: 15–18.

Použité zkratky

BDI	1,4-diizokyanátobutan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
FDA	americký Úřad pro potraviny a léky (U. S. Food and Drug Administration)
GA	kyselina glykolová
HA	kyselina hyaluronová
LA	kyselina mléčná
PACA	polyalkylkyanoakryláty
PAH	polyanhydridy
PBS	fosfátový pufr
PBT	polybutylentereftalát

PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PE	polyetylen
PEG	polyetylglykol
PGA	polyglykolová kyselina (polyglykolid)
PDLA	poly(D-kyselina mléčná)
PDLLA	poly(D,L-kyselina mléčná)
PDO	polydioxanon
PLA	polymléčná kyselina (polylaktid)
PLGA	poly(mléčná-co-glykolová kyselina)
PLLA	poly(L-kyselina mléčná)
PHBV	statistický kopolymer 3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
POE	polyortoester
PP	polypropylen
PPF	polypropylenfumarát
PUR	polyuretan
P3HA	poly-3-hydroxyalkanoáty
P3HB	poly-3-hydroxybutyrát
RGD	tripeptidová sekvence arginin-glycin-asparagová kyselina (Arg-Gly-Asp)
ROP	polymerace za otevření kruhu (Ring Opening Polymerization)
TCM	trimetylkarbonát
TCP	fosforečnan vápenatý

Seznam doporučené literatury a odkazy na internetové zdroje

Rieger B, Künkel, Coates GW, Reichardt R, Dinjus E, Zevaco TA, volume editors. Synthetic biodegradable polymers. In: *Advances in Polymer Science*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012; vol. 245, pp. 364. ISSN: 0065-3195

Guelcher SA, Hollinger JO, editors. *An Introduction to Biomaterials*. In: *The biomedical engineering series*, Neuman MR, series editor. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton, Florida, USA. 2006, pp. 553. ISBN: 0-8493-2282-0.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed., Elsevier Academic press, California USA, London UK. 2004, pp. 851. ISBN: 0-12-582463-7.

KAPITOLA 3

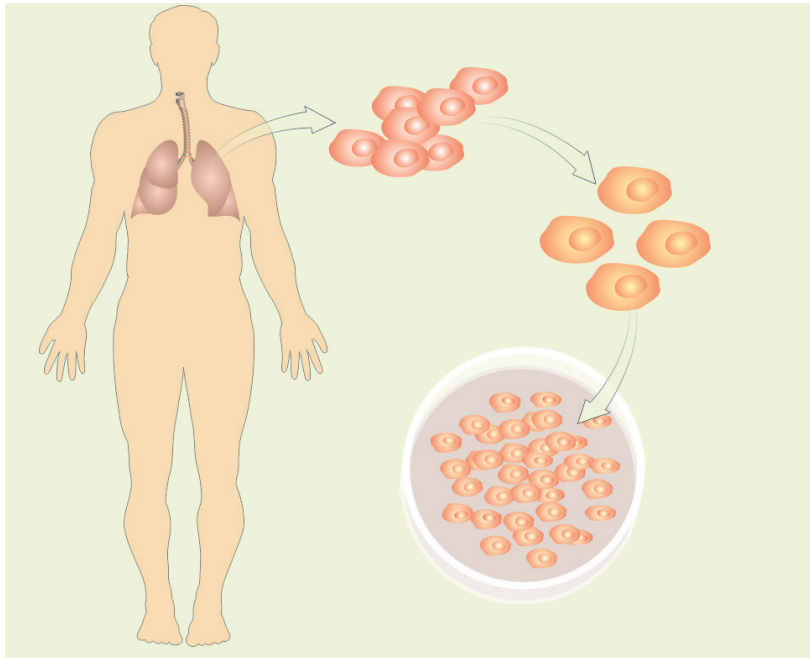
BUŇKY A TKÁŇOVÉ KULTURY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Lucie Jurečková

Tak jak bylo zmíněno v úvodu, pro tkáňové inženýrství jsou pro zabezpečení efektivní léčby poškozených tkání nezbytnou součástí dvě hlavní složky – materiál sloužící jako scaffold a živá složka tvořená vhodným typem buněk – tzv. buněčná kultura. Část věnující se buňkám má za úkol buněčnou izolaci a zabezpečení jejich dostatečného počtu pro efektivní léčbu a také zabezpečení jejich správné funkce.

3.1 ÚVOD

Počátek historie buněčných kultur zasahuje do roku 1885, kdy Wilhelm Roux dokázal udržet *in vitro* několik dní explantát kuřecích embryonálních buněk v temperovaném médiu. Na konci 19. století byly poprvé dokumentovány pokusy se zamražením a úspěšným rozmražením buněk. Roku 1907 zoolog Ross Granville Harrison prokázal možnost růstu žabích embryonálních buněk v médiu suplementovaném lymfou, kdy se izolované buňky následně vyvinuly v nervové buňky. Na počátku 20. století se podařilo udržet virus vakcínie (virus blízký viru kravských neštovic) na explantátech morčecí rohovky. Ve čtyřicátých letech 20. století byly zaznamenány první úspěšné pokusy o založení buněčné kultury, v níž by se buňky množily, a která by přeživala po delší, byť omezenou, dobu. S dosaženými výsledky v kultivaci tkáňových kultur byla poprvé v roce 1996 použita část tkáně pro regeneraci močové trubice. Následně došlo k rozvoji používání tkáňových kultur nejen v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně, ve výzkumu, při výrobě protilátek, vývoji nových léků a jejich kontrolních testováních, výrobě a vývoji některých očkovacích vakcín atd. a v roce 1998 s vývojem liniových kmenových buněk byly položeny základy nového tkáňového inženýrství. Následně byl výzkum, v této oblasti zaměřen na problematiku expanze autologních a alogenních diferencovaných buněk a jejich množstvím nezbytným pro vznik nové tkáně.



Obr. 20 Ilustrativní zobrazení izolace buněk

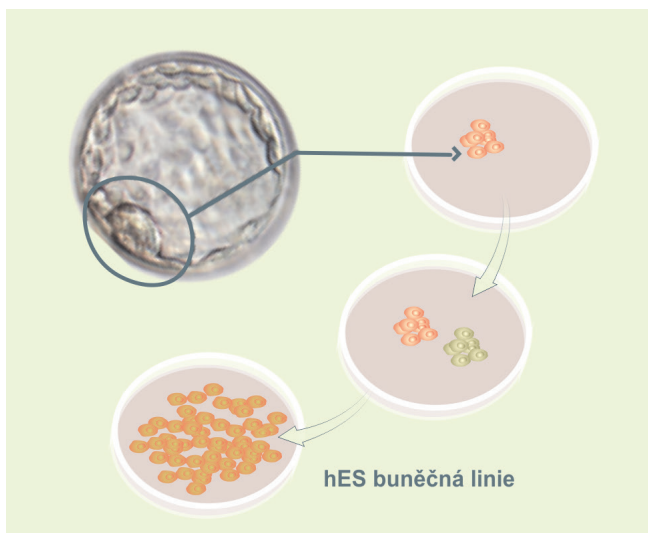
3.2 TYPY TKÁŇOVÝCH KULTUR

Kultura buněk, která je izolována ze zvířecí, rostlinné nebo lidské tkáně a je udržována ve vhodných podmínkách mimo živý organismus, je označována jako tkáňová kultura. Tkáňové kultury je možné rozlišit do několika skupin podle různých pohledů. Podle původu: buňka může pocházet přímo z tkáně (primokultura) nebo byla upravena tak, aby si zachovávala své vlastnosti (liniové buňky). Podle typu kultivace, zda je buňky možné kultivovat adhezaní nebo v suspenzi, nebo podle míry diferenciací na buňky částečně nebo terminálně diferencované a kmenové buňky.

3.2.1 LINIOVÉ BUŇKY

Buněčná kultura, která byla upravena tak, že se pokud jí bude dodáváno čerstvé médium a bude mít dostatek místa pro svůj růst, bude nekonečně dělit, se označuje jako buněčná linie. Liniové buňky vznikají změnou v genotypu, která jim umožní vyhnout se běžnému procesu stárnutí buněk, a proto se buňky mohou množit po nekonečně dlouhou dobu a přitom si zachovávají své vlastnosti. Ke vzniku buněčných linií může dojít několika způsoby – buňky rakovinné tkáně, kde přirozeně proběhla mutace, která způsobila neomezené dělení buněk. Dále buňky, u nichž byla mutace vyvolána a buňky,

u kterých mutace proběhla, a byly následně izolovány. Vložením virového genu do genomu buňky, který ovlivní regulaci průběhu buněčného cyklu. Ovlivněním exprese proteinů, které mají vliv na replikaci genomu buňky, nebo vznik hybridomů – kdy B-buňky, které tvoří specifickou protilátku, jsou fúzovány s myelomovou (rakovinnou) B – buňkou. Toto je např. využíváno také pro výrobu monoklonálních protilátek.



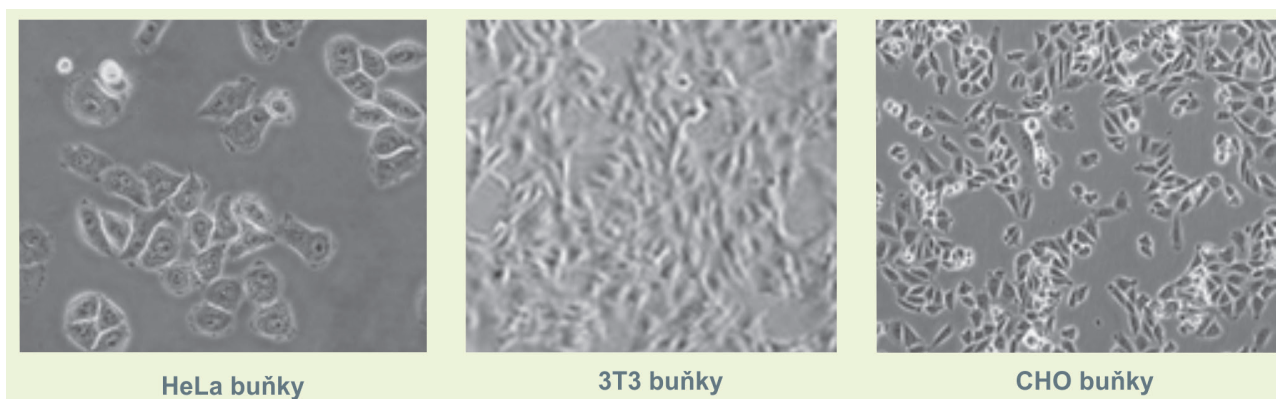
Obr. 21 Získávání liniových buněk

Mezi typické příklady liniových buněk, které jsou široce využívány, můžeme zařadit:

HeLa – izolována z lidských epiteliálních nádorových buněk (Obr. 22).

3T3 – buněčná linie pochází z myších embryonálních fibroblastů (Obr. 22). Dnes je tato buněčná linie běžně používána, často je využívána jako feedrové buňky (buňky tvořící základní vrstvu, která vytváří vhodné mikroprostředí pro uchycení a růst jiných buněčných kultur).

CHO–Chinese hamster ovary cells – Buněčná linie epiteliálních buněk, izolovaná z buněk vaječníku Čínského křečka (Obr. 22). Je hojně využívanou buněčnou linií pro její schopnost rychle se dělit a ve vysoké míře produkovat proteiny. V dnešní době je CHO buněčná linie nejčastěji používanou buněčnou linií savčích buněk pro průmyslovou výrobu rekombinantních proteinů používaných ve farmaceutickém průmyslu.



HeLa buňky

3T3 buňky

CHO buňky

Obr. 22 Ukázka příkladů liniových buněk

Buněčné linie jsou využívány v širokém spektru od výzkumu až po průmyslovou výrobu proteinů, vakcín a dalších produktů využívaných především ve farmacii.

Při práci s buněčnými liniemi je velkou předností jejich neomezené dělení, známý zdroj a ekonomická výhodnost, ale je nutné vzít v úvahu fakt, že k tomu, aby se mohly buňky nekonečně dělit, musely projít významnou mutací, která mohla pozměnit biologické vlastnosti buněk. Je proto vhodné si o vybrané buněčné linii předem zjistit dostatečné informace a hlavně je možné je využít pouze pro *in vitro* testy.

3.2.2 PRIMOKULTURY

Buňky, které byly izolovány přímo z živé tkáně nebo organismu a jsou udržovány v podmínkách *in vitro*, se označují jako primokultury. Primokultury představují systém, který nejbližší napodobuje stav buněk v organismu.

Izolaci buněk z organismu nebo tkáně je možné provést více způsoby. Buňky je možné získat z explantátu, kdy je část tkáně odstraněna z organismu a buňky z ní vycestují do kultivačního média, nebo jsou buňky izolovány z tkáně pomocí enzymu (více v kapitole Izolace).

Jakmile se izolované buňky adaptují v *in vitro* podmínkách, může u nich docházet k omezenému počtu buněčných dělení, než u nich dojde ke „stárnutí“ a následné degeneraci a odumírání. Buňky, které již byly subkultivovány, mohou být označovány jako buněčné kmeny.

Buňky mohou být izolovány z různých tkání: z kosti (osteocyty), chrupavky (chondrocyty), cév (cévní endoteliální buňky a fibroblasty), pokožky (keratinocyty, fibroblasty, melanocyty), tukové tkáně (adipocyty, fibroblasty, mesenchymální kmenové buňky) atd. a při zakládání primokultur je vždy dobré vhodně posoudit, pro jakou aplikaci v rámci tkáňového inženýrství budou použity. Pak také zdroj buněk, velikost vzorku, typ tkáně zvolený pro izolaci, věk organismu, z jehož tkáně bude izolace provedena, ale také stav tkáně, případnou možnost kontaminace tkáně at' už jinými tkáněmi nebo potenciální možnou bakteriální kontaminací při odběru.

3.2.3 SUSPENZNÍ A ADHERENTNÍ TKÁŇOVÉ KULTURY

Kromě rozlišení buněčných kultur na liniové buňky a primokultury, případně buněčné kmeny, je důležitým parametrem adherence buněk. Tato vlastnost buněk výrazně mění parametry kultivace a také požadavky na samotný scaffold a materiál. Otevírá ale možnost výběru pro širší spektrum aplikací.

Existují dva základní systémy, ve kterých je možné kultivovat tkáňové kultury. Prvním typem je adherentní, kdy buňky rostou přisedlé k podkladu, ať už se jedná o samotný plast kultivační lahve, nebo o povrch upravený vrstvou kolagenu nebo feedrových buněk (buňky, které tvoří vrstvu pro lepší přisednutí a následně vytváří vhodné mikroprostředí pro růst kultury). Druhým typem buněk jsou suspenzní kultury. Buňky v tomto případě plovou v kultivačním médiu. Většina buněk izolovaných z obratlovců, s výjimkou hematopoietických (krvetvorných) buněk a některých dalších, jsou adherentní buněčné kultury. Mnoho buněčných linií ovšem může být adaptováno ke kultivaci ve formě suspenzní kultury. Suspenzní kultury vyžadují zajištění dostatečné výměny plynů a je žádoucí udržet kulturu v pohybu – pomocí magnetického míchadla nebo třepačky.

Suspenzní kultury buněk jsou používány především v případech, kdy jsou nezbytné vysoké výtěžky buněk, nebo je cílem získat produkt vylučovaný buňkami do kultivačního média. Ve valné většině případů jsou buňky kultivovány v adherentní formě, která umožňuje především kontinuální sledování jejich morfologie.

3.2.4 TYPY TKÁŇOVÝCH KULTUR Z HLEDISKA DIFERENCIACE

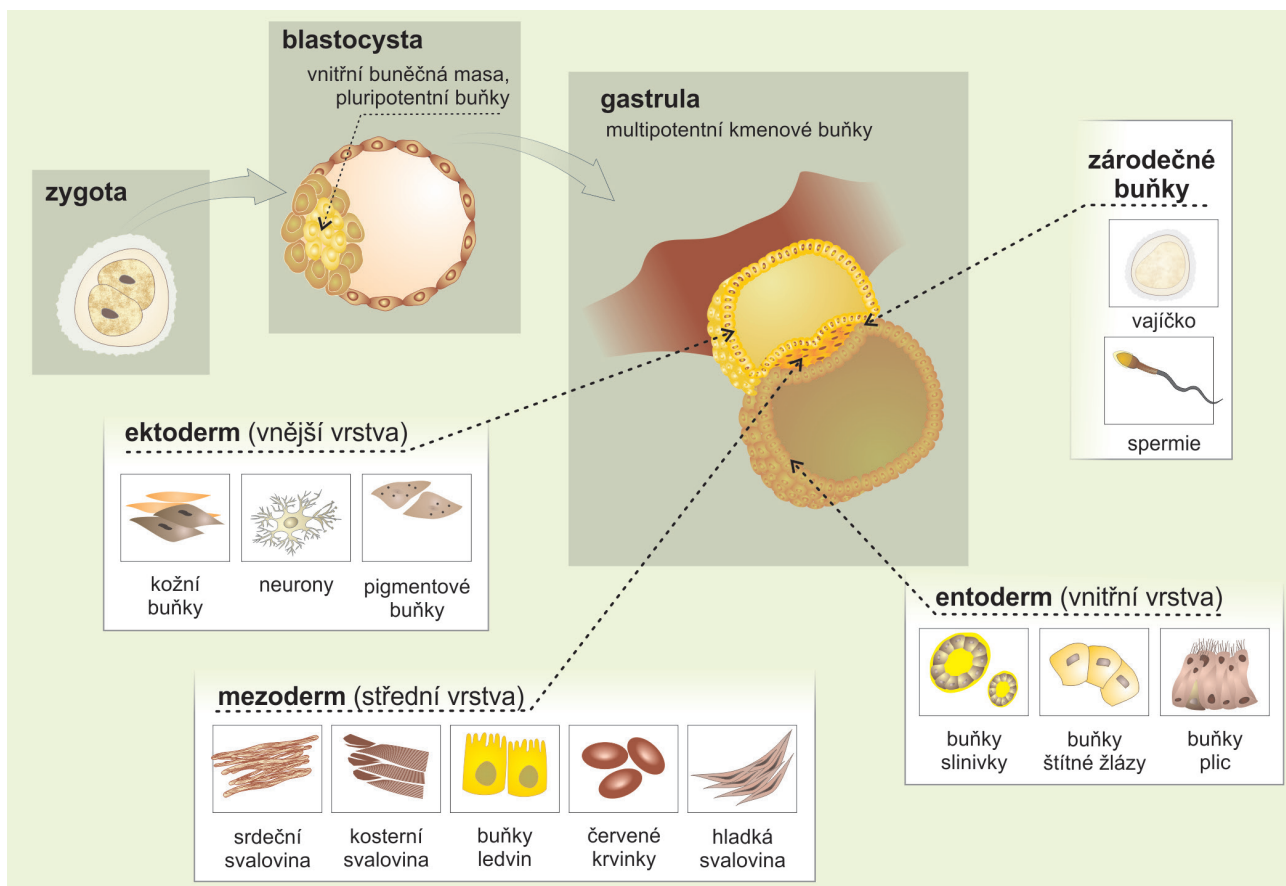
Buňky v organismu mají různé vlastnosti. Tyto vlastnosti se liší nejen v závislosti na typu tkáně, kde se vyskytují a funkcí, kterou plní, ale také mírou diferenciací, ke které u buněk došlo.

V organismu se vyskytují buňky, které jsou terminálně diferencované, u kterých byl ukončen vývoj, jejich funkce je dána a mají charakteristické znaky (např. chondrocyt – terminálně diferencovaná chrupavková buňka, která exprimuje povrchové markery pro kolagen typu II a agrekan).

Kromě terminálně diferencovaných buněk v organismu existují buňky, které mají schopnost sebeobnovy a dávají vznik buňkám, které se následně terminálně diferencují. Jedná se o specifickou skupinu buněk označovaných jako kmenové buňky. Tyto buňky nevykazují žádné znaky typické pro diferencované buňky.

V různých etapách vývoje vznikají různé kmenové buňky (lišící se svým hierarchickým postavením, diferenciačním potenciálem a povrchovými znaky). Ve stádiu blastocysty je možné rozlišit vnější vrstvu buněk a vnitřní buněčnou masu. Buňky vnitřní buněčné masy jsou tvořeny kmenovými buňkami, které mohou dát vznik jakémukoli typu tkáně, jsou označovány jako pluripotentní buňky. Pluripotence značí schopnost produkovat buňky různých zárodečných listů – ektodermu (např. neurony), entodermu (např. hepatocyty) i mesodermu (např. svalové buňky).

Pluripotentní kmenové buňky se následně specializují, na multipotentní, které dále dávají vznik funkčním buňkám. Multipotentní kmenové buňky jsou zadané, tj. omezené k produkci jen omezeného spektra buněk vznikajících v rámci jednoho zárodečného listu (ektodermu, entodermu nebo mezodermu) – např. mesenchymální kmenové buňky (obr. 23).



Obr. 23 Diferenciace buněk

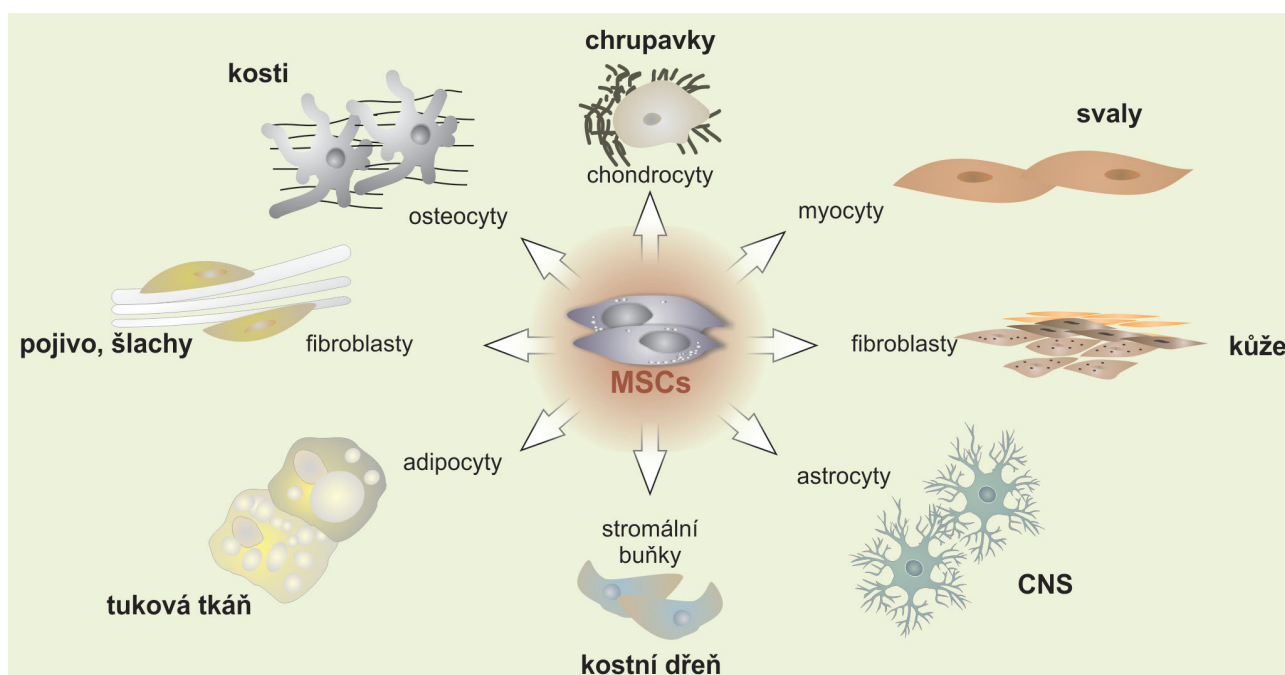
Ve fetálním období s vyžíváním tkání přibývá ve tkáních specializovaných (diferencovaných) buněčných typů, kmenové buňky již nově nevznikají. Jejich absolutní počet zůstává díky sebeobnově zachován, ale relativně se množství kmenových buněk ve tkáních snižuje. Kmenové buňky ve tkáních setrvávají po celou dobu života, tj. od samého začátku až do pozdního stáří.

Kmenové buňky v lidském těle vykonávají několik zásadních funkcí. Mezi nejdůležitější patří zodpovědnost v průběhu vývoje za vytváření základů jednotlivých orgánů a jejich růst.

V dalším období jsou pak zodpovědné za tkáňovou homeostázu (udržení stejného množství buněk ve tkáni) a jsou také aktivovány při poranění tkání, kdy kmenové buňky zahajují hojení a regeneraci tkání.

U kmenových buněk jsou rozlišovány dva typy: embryonální (zárodečné) a dospělé (adultní). Pojem „embryonální kmenové buňky“ v širším slova smyslu zahrnuje různé typy kmenových buněk objevující se v embryonálním, příp. fetálním vývoji. Častěji se však tímto pojmem označuje speciální populace pluripotentních buněk, která byla izolována z blastocyst, tzv. ES buňky (*embryonic stem cells*). Je však zapotřebí mít na paměti, že v dřívějších i pozdějších fázích vývoje vznikají v embryu také další kmenové buňky, které jsou odlišné od ES buněk.

Kmenové buňky se nacházejí ve všech základních typech tkání (existují epitelové kmenové buňky, mezenchymální kmenové buňky, kmenové buňky srdeční svaloviny, neurální kmenové buňky aj.). Nejčastěji zmiňované jsou mezenchymální kmenové buňky (MSC – mesenchymal stem cells). Produkují buňky tzv. mezodermového (mezenchymového) původu. Do spektra produkce spadají buňky podpurných tkání, svalovina, cévy, krevní buňky, ledviny, pohlavní orgány aj. (obr. 24). Často se termínem mezenchymové kmenové buňky označují stromální kmenové buňky kostní dřeně, neboť jsou schopny produkovat široké spektrum buněčných typů, jako jsou chondrocyty, osteocyty, adipocyty, vazivové elementy atd.



Obr. 24 Potenciál mesenchymálních kmenových buněk

Díky svým vlastnostem a dostupnosti v organismu mají mesenchymální kmenové buňky velký potenciál pro uplatnění ve tkáňovém inženýrství v rámci regenerativní medicíny.

3.2.5 SBÍRKY TKÁŇOVÝCH KULTUR

Za účelem shromažďovat, ověřit, uchovat a následně distribuovat vědcům po celém světě různé typy mikroorganismů, začaly být zakládány tzv. sbírky tkáňových kultur. Následně s rozmachem tkáňového inženýrství, biotechnologií, genetiky a dalších oborů byly sbírky rozšířeny, aby byly schopny deponovat velké množství různých biologických vzorků (včetně množství buněčných linií a primokultur pro potřeby různých aplikací v rámci tkáňového inženýrství).

Jednou z těchto sbírek je American Type Cell collection, která vznikla v roce 1925. Její sbírky zahrnují široké spektrum biologických materiálů, mezi nimi buněčné linie, genomové prvky, různé mikroorganismy a bioprodukty. Celkově asi 3400 lidských, zvířecích a rostlinných buněčných linií, 8 mil. klonovaných genů (zahrnující různé druhy – lidský, myší, krysí, opičí, atd.) a několik vektorů různých chorob. Z mikroorganismů je to více než 18 tis. kmenů různých bakterií, 2 tis. různých typů zvířecích a okolo 1 tis. rostlinných virů. Dále je ve sbírkách možné nalézt přes 49 tis. kvasinek a vzorků hub. Následně pak byla v roce 1984 založena sbírka ověřených a mezinárodně uznávaných vzorků v Evropě – Evropská sbírka buněčných kultur, vznikla za účelem shromažďování buněčných kultur pro výzkumníky. Během následujících třiceti let se sbírka rozrostla takovým způsobem, že se stala jednou z nejuznávanějších sbírek ověřených buněčných kultur ve světě. V současné době je ve sbírkách k dispozici přes 40 tis buněčných linií 45 různých druhů, 50 typů vzorků tkání, 300 HLA typů, 450 monoklonálních protilátek a 800 vzorků genetických poruch.

3.3 KULTIVACE TKÁŇOVÝCH KULTUR

Buněčná kultivace představuje náročný proces, vyžadující specifické manipulace a charakteristické růstové podmínky.

3.3.1 KULTIVAČNÍ NÁROKY TKÁŇOVÝCH KULTUR

Aby nedošlo ke kontaminaci zpracovávané kultury mikroorganismy, které by znamenaly znehodnocení kultury, ale také aby nedošlo k přenosu nežádoucích mikroorganismů do prostředí nebo používaných médií a roztoků, by měly být manipulace s buněčnými kulturami prováděny ve vhodném prostředí a vhodnými

technikami. Dodržování tzv. aseptických podmínek – tedy prostředí bez přítomnosti kontaminujících mikroorganismů a vhodných aseptických technik by mělo zaručit to, aby nedošlo k přenosu kontaminujícího mikroorganismu do kultury. Za tímto účelem je vhodné provádět veškeré práce s tkáňovými kulturami v laminárních boxech nebo biohazardech, kde je vytvořeno chráněné prostředí proti potenciální vnější kontaminaci, ale současně je také chráněn operátor, který manipulace s kulturami provádí.

Pro úspěšnou izolaci a následnou kultivaci buněčných kultur by mělo být také vhodně zvoleno růstové prostředí a podmínky – kultivační teplota, suplementace prostředí CO_2 , pH a výživové látky. Každá buněčná kultura může mít odlišné nároky na kultivační prostředí, je proto vhodné si nároky kultury zjistit před zahájením práce s daným typem buněk.

3.3.1.1 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Standardně jsou savčí tkáňové kultury udržovány při teplotě 36–37°C, platí pravidlo, že kultura buněk by měla být udržována ve stejné teplotě prostředí, v které je běžný její výskyt.

Významným faktorem definujícím vhodné kultivační prostředí je pH média a koncentrace CO_2 v prostředí. Uvedené hodnoty spolu úzce souvisejí. Běžné kultivační médium má schopnost do určité míry kontrolovat pH a regulovat případné výkyvy při změnách pH prostředí. Vzhledem k tomu, že pH média je závislé na množství oxidu uhličitého a hydrogenuhličitanových iontů rozpuštěných v médiu, mohou změny v koncentraci CO_2 v prostředí tuto rovnováhu výrazně narušit, a tím ovlivnit pH média. S ohledem na uvedené je snaha udržovat v kultivačním prostředí vyšší koncentraci CO_2 . Standardně je používána koncentrace 5–6%, v některých případech může být koncentrace CO_2 regulována v mezích 4–10% CO_2 . Většina médií by měla mít výrobcem doporučenou vhodnou koncentraci CO_2 v prostředí pro dosažení optimálního pH.

Většina savčích buněk proliferuje dobře v prostředí s pH 7,4–7,6. Existují buněčné kultury (především transformované kultury), které lépe rostou v kyselějším pH, naopak většina fibroblastů se lépe množí v mírně zásaditém pH. Detektorem pH média je standardně u mnoha médií používána fenolová červeň (viz následující kapitola o suplementech).

Většina savčích buněk prosperuje dobře při uvedených standardních podmínkách (37°C, 5 % CO_2 , pH 7,5). Existují ale výjimky, především u primokultivovaných buněk, které mohou mít odlišné kultivační nároky. U liniových buněk by měly být podmínky pro kultivaci doporučeny výrobcem/dodavatelem kultury.

3.3.1.2 MÉDIA A SUPLEMENTY

To, zda kultura bude dobře prosperovat, je závislé na mnoha faktorech. Jedním z nejdůležitějších faktorů je správná „výživa“ buněk. Vhodné prostředí zajišťuje kultivační médium, které buňkám poskytuje nezbytné živiny, růstové faktory, reguluje pH a osmotický tlak.

Kultivační médium představuje izotonický roztok, který obsahuje glukózu jako zdroj energie, aminokyseliny, bílkoviny, ionty anorganických solí (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , HCO_3^-), některé stopové prvky a vitamíny (inositol, riboflavin, pyridoxin, kys. pantotenová, atd.).

Dnes existuje řada komerčně vyráběných médií, od nejjednodušších médií se základním složením, až po média se specificky upraveným složením, určených konkrétně pro určitou růstovou fázi definovaného typu buněk, případně média vyráběná dle přání zákazníka. Média jsou k dostání také v různé kvalitě od „for research use only“ až po „GMP grade“ (media vhodná ke kultivaci buněk určených ke klinické aplikaci).

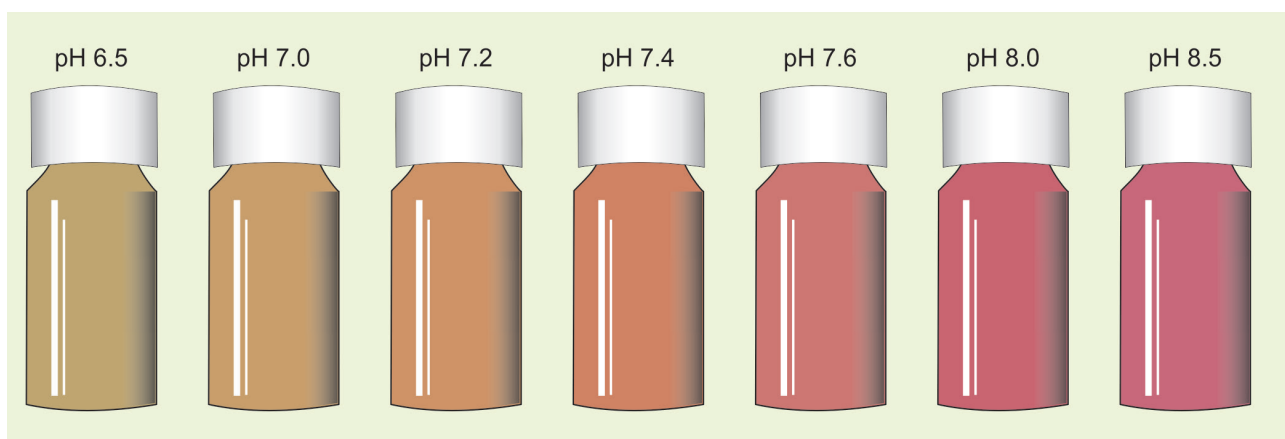
Důležitou složkou základních médií je sérum, které je nutné ve většině případů do média přidávat a to standardně v koncentraci 5–12 %. Je to zdroj růstových a adhezivních faktorů a širokého spektra bílkovin, lipidů a minerálních látek. Tradičně nejvyužívanější jsou fetální séra, protože oproti sérům, která nepocházejí z fetu, mají nižší hladinu protilátek a vyšší podíl růstových faktorů. Mezi séry je široký výběr, před zahájením používání určitého typu séra je s výhodou sérum na kultuře testovat, pokud je to možné, vzhledem k tomu, že séra se mohou lišit poměrem bílkovin nebo obsahem endotoxinů v závislosti na zdroji, ze kterého pochází.

V dnešní době je stále častější požadavek také na aplikaci bezsérového média jejichž výhodou je možnost vyloučení potenciálních sérových kontaminant (mykoplasmy, endotoxiny, atd.), dále selektivnost, které je docíleno přidavkem vhodných vybraných růstových faktorů. Nevýhodou však je, že ne všechny buňky snášejí růst v bezsérovém médiu bez problémů. Bezsérová média jsou dostupná pro řadu primokultivovaných buněk, ale i liniových kultur. Dále jsou obvykle do médií přidávány různé suplementy, jako např. insulin nebo hydrokortison. oba za účelem podpory růstu buněk, nebo např. L glutamin v rámci výživy.

Jedním ze suplementů, jehož používání je stále častější v poslední době, je také destičkový lyzát. Jde o přípravek z krevních destiček, z nichž byly uvolněny růstové faktory. Tento suplement bývá používán jako náhrada séra, především pro kultivace mezenchymálních kmenových buněk nebo v případech, kde není možné použití FBS nebo jiného séra.

V závislosti na typu kultivace je možné do média také přidat antibiotika a/nebo antimykotika a nejčastěji používanými jsou penicilin a streptomycin.

Ve většině médií je obsažena také jako indikátor pH fenolová červeň. Pokud je pH kyselější, médium mění barvu do odstínů oranžové až žluté – značí, že do média jsou ve vyšší míře produkovány metabolické látky, v některých případech může naznačovat na případnou kontaminaci kultury. Pokud je v médiu přítomna fenolová červeň a médium je zbarveno do tmavě červené až nafialovělé barvy, přechází pH do zásadité oblasti a je možné usuzovat na stagnaci nebo odumírání kultury (Obr. 25). K přechodnému zvýšení pH může také dojít krátce po umístění kultivační lahve do inkubátoru, kde je prostředí s vyšší tenzí CO_2 .



Obr. 25 Barevná stupnice média obsahujícího fenolovou červeň s odlišným pH

3.3.2 BUNĚČNÁ IZOLACE

Izolaci buněčných kultur je možné provádět dvěma zásadně odlišnými postupy – explantátovou technikou nebo enzymatickým rozvolněním tkáně a izolací buněk.

Při izolaci buněk z explantátů je tkáň rozdělena na velmi malé kousky, je umístěna na vhodnou podložku (kultivační plast ošetřený pro tkáňové kultury), převrstvena vhodným médiem a umístěna do vhodných kultivačních podmínek.

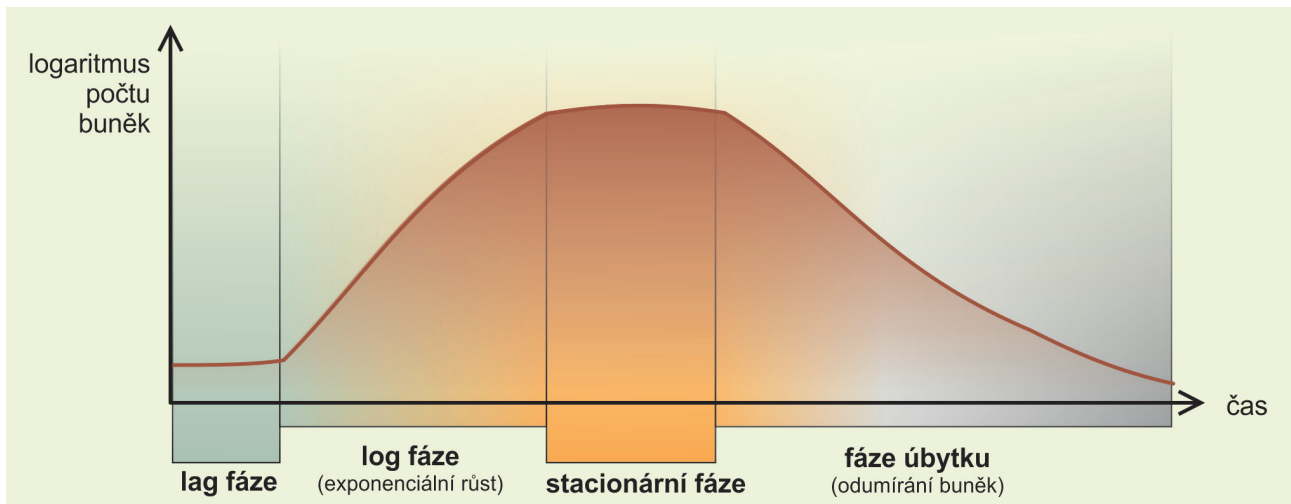
Buňky by měly začít vycestovávat z tkáně a postupně osidlovat kultivační plast. Ne každou izolaci je možné takto provést. V případech, kdy tkáň není možné dokonale rozdělit tak, aby byla tvořena pouze jedním typem buněk, je vhodnější použít techniku izolace buněk z tkáně, kde je možné kombinovat více izolačních kroků, aby bylo dosaženo izolace čisté populace buněk. Pokud je tkáň izolována ve směsi buněk, může se stát, že rychleji rostoucí populace buněk (obvykle se jedná o fibroblasty) může vytěsnit žádanou populaci buněk.

Izolace buněk z tkáně je prováděna kombinací kroků, které mohou zahrnovat různé postupy: separaci tkáně, její promývání, homogenizaci, aplikaci vhodného enzymu jednorázově nebo opakovaně, centrifugaci, gradientovou separaci, filtraci a další kroky.

Kombinace a aplikace jednotlivých kroků velmi záleží na typu a stavu použité tkáně a charakteru izolovaných buněk. Vždy je žádoucí zvážit nutné kroky k separaci buněk a potenciální riziko, které tyto kroky představují pro samotné buňky a v ideálním případě použít kompromisní řešení.

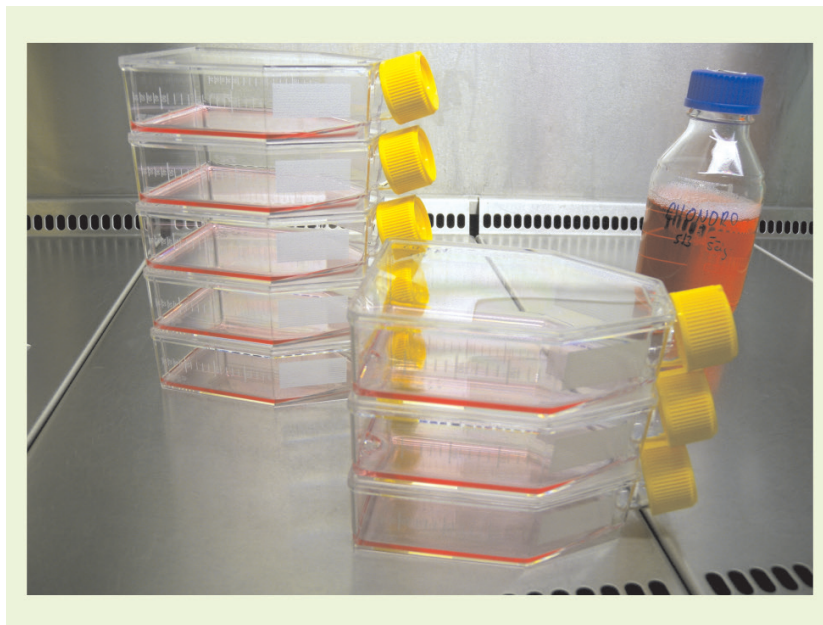
3.3.3 BUNĚČNÝ RŮST

Po vnesení buněk do kultivační lahve jsou buňky z prvopočátku volně v médiu a jsou kulaté. Následně začínají adherovat na dno kultivační lahve (pokud se jedná o adherentní kulturu). U kultivovaných buněk je někdy možné adherenci pozorovat již po 10ti minutách, u primokultivovaných buněk k adherenci dochází do 24 hodin. Adherované buňky zaujímají charakteristický tvar – morfologii. První období růstu kultury je označováno jako *Lag-fáze*. V *Lag-fázi* může docházet k poklesu růstu (obr. 26), protože buňky, u kterých došlo během manipulace s kulturou k poškození, již nepřisednou a postupně odumírají. Jakmile se buňky adaptují na prostředí, začnou se množit – proliferovat, přechází do *Log-fáze* – fáze logaritmického růstu. Buňky se množí logaritmickou řadou. Interval této fáze je výrazně závislý na typu buněk (u některých liniových buněk může nástup této fáze proběhnout již po 6ti hodinách). Nástup následující *Stacionární fáze* je závislý na množství dostupných živin v médiu a dosažené konfluenci (pokrytí dna kultivační lahve buňkami). Jakmile buňky pokryjí dno kultivační lahve – vytvoří tzv. monolayer, dochází díky kontaktní inhibici ke snížení nebo úplnému zastavení proliferace. Může dojít k poklesu růstové křivky – *Fáze úbytku* v důsledku odumírání buněk, který je způsobený nedostatkem živin, snížením pH (díky zvýšení koncentrace CO_2), zvýšení odpadních – toxických látek metabolismu buněk. Pokud u kultury dojde k nástupu stacionární fáze z důvodu nízkého obsahu živin v médiu, ale dosažená konfluencia není limitující, je možné prodloužit log-fázi výměnou nebo přidáním čerstvého média. Jakmile kultura dosáhne 100% konfluency, je možné dospět k další log fázi pouze subkultivací buněk – tedy opakováním růstového cyklu. U suspenzních kultur platí stejné podmínky, ale limitním parametrem je vyčerpání živin z média.



Obr. 26 Růstová křivka

Pokud adherentní kultura prosperuje, množí se, zaplňuje tak dno kultivační lahve. Jakmile dosáhne 100% konfluence (zaplnění kultivační lahve), u kultur, u kterých funguje kontaktní inhibice, se růst zpomalí, až úplně zastaví. Aby se kultura mohla dále množit, je třeba provést její subkultivaci. Subkultivace adherentní kultury představuje postup, kdy jsou buňky z kultivační lahve převedeny do roztoku a následně přeneseny v nižší koncentraci na novou kultivační lahev. S každou subkultivací narůstá pak tzv. pasážové číslo kultury.



Obr. 27 Kultivační lahve

V případě subkultivace suspenzní kultury, je vhodné se řídit hraniční koncentrací buněk nebo indikací vyčerpání živin v médiu. Hraniční koncentrace jsou většinou zjištěny dle růstových křivek daných kultur.

Při subkultivaci je klíčovým krokem určení koncentrace buněk. Na základě určené koncentrace jsou buňky přeneseny do nové kultivační lahve s čerstvým kompletním kultivačním médiem v určitém počtu, nebo je přenesen pouze podíl kultury

V rámci uchování buněk, je z důvodu, aby byly maximálně zachovány vlastnosti kultury a předešlo se jejímu stárnutí, případné genetické změně nebo její kontaminaci, vhodné kulturu zamrazit. Mražení probíhá postupným zchlazováním přibližně 1°C /min a probíhá až do dosažení -80 °C. Vzhledem k tomu, že každá buňka obsahuje vysoký podíl vody, je kultura aby nedošlo k poškození buněk při tvorbě krystalů zmrazené vody, zmrazována do speciálního roztoku, který tomuto poškození předejde. Při použití sérového média je možné jako kryoprezervačního média použít 10% glycerol nebo 10% DMSO (dimetylsulfoxid).

Běžně jsou kryoprezervační média složena z média, kryoprezervantu a roztoku, který je zdrojem proteinů. Proteiny by buňkám měly poskytnout potřebnou ochranu při zamrazování a následně při vymrazování.

3.4 CHARAKTERISTIKA TKÁŇOVÝCH KULTUR

Při osazování scaffoldů buňkami, je velmi důležitá buněčná charakterizace. Nutnost dobře buňky charakterizovat vyvstává nejen při jejich kultivaci, ale především po jejich zabudování do scaffoldu. To, zda buňky dosahují vhodného fenotypu a produkce vhodné extracelulární matrix, je klíčovým faktorem pro efektivní léčbu poškozené tkáně a pro charakterizaci jsou používány různé parametry sledované pomocí spektra metod.

K těm nejjednodušším patří mikroskopické metody hodnocení kultury, pomocí nichž je možné popsat morfologii buněk, určit jejich celkový stav, celkovou vitalitu buněk poměrem živých a mrtvých buněk.

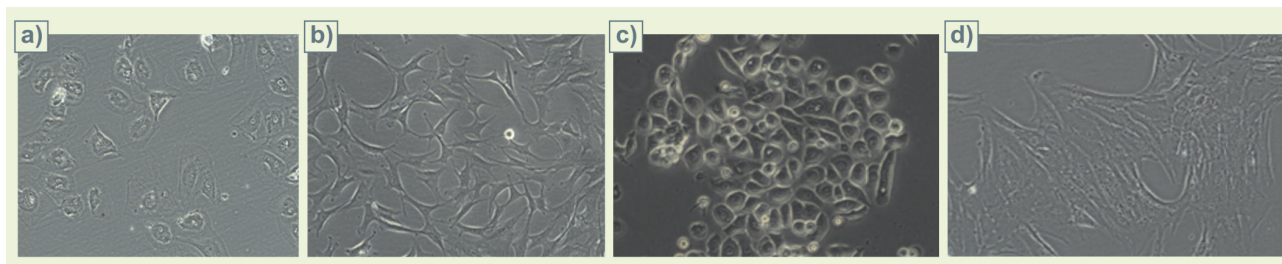
Dobrý stav kultury je možné potvrdit přítomností vhodných povrchových markerů, které jsou u každého typu buněk charakteristické a jejich přítomnost na buněčném povrchu potvrzuje nejen jejich vhodný fenotyp, ale také správnou funkčnost.

Kromě povrchových markerů mohou být vlastnosti buněk sledovány také na molekulární úrovni – intracelulárně na základě transkripční aktivity buněk.

3.4.1 MIKROSKOPICKÉ POSOUZENÍ KULTURY

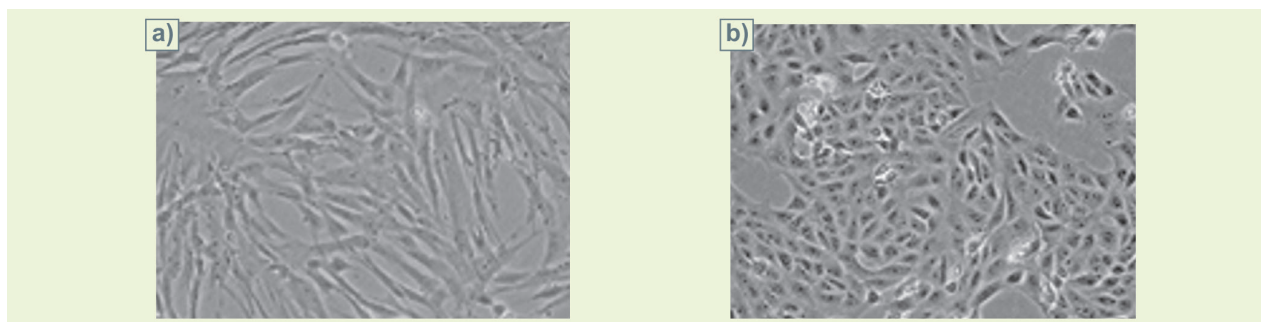
V rámci mikroskopického posouzení buněčné kultury, je důležitou charakteristikou, která by měla být patrná na první pohled, morfologie buněk. Většina buněk má svůj

charakteristický tvar a morfologie udává celkový vzhled buňky (Obr. 28).



Obr. 28 a) buňky cévního endotelu b) buňky chondrocytů c) buňky kožních keratinocytů
d) kostní buňky

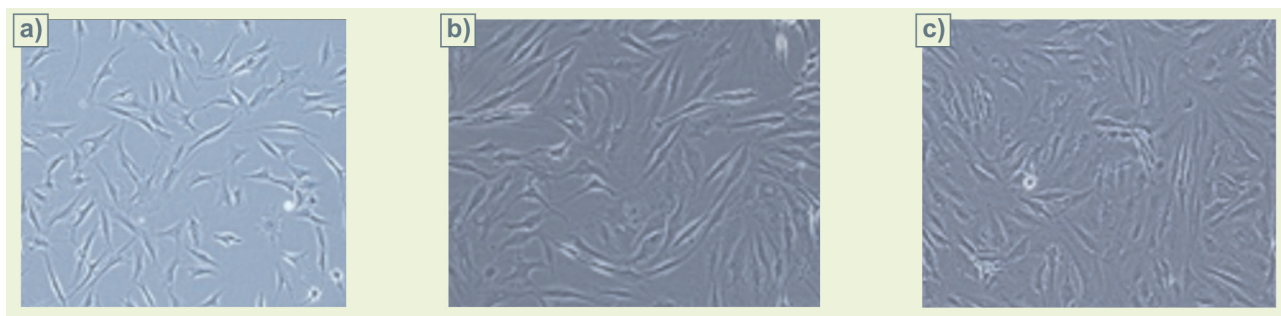
U savčích buněk je možné rozlišit dvě typické tvarové skupiny – buňky fibroblastového tvaru (označované často jako fibroblast-like), jsou šídlového tvaru, více či méně natažené (Obr. 29). Buňky epiteliálního tvaru (epithelial-like)¹², jsou lichoběžníkového tvaru, rostou většinou v ostrůvcích a jsou více pravidelné než fibroblastové buňky.



Obr. 29 a) buňky fibroblastového typu b) buňky epiteliálního typu

Při hodnocení buněk je také vhodné se zaměřit na celkový vzhled buněk. Pokud je možné pozorovat tvorbu granul kolem jádra nebo vakuol v cytoplazmě, nebo se dokonce jednotlivé buňky začínají oddělovat ode dna, naznačuje to zhoršený stav kultury. Příčinou může být nutnost výměny média, stárnutí kultury, kontaminace nebo přítomnost látek, které působí na kulturu toxicky.

Při hodnocení kultury buněk je také významným parametrem konfluence buněk (obr. 30). Popisuje plošný nárůst buněčné kultury v kultivační lahvi – vyjadřuje se v odhadovaném procentuálním pokrytí dna kultivační lahve.



Obr. 30 Nárůst konfluency kultury na kultivační lahvi

Sledování konfluency nám dává dobrou představu o progresivním růstu kultury a konfluency bývá u adherentních buněk většinou hlavním parametrem pro rozhodnutí o subkultivaci buněk.

Pokud je kultura mikroskopicky hodnocena, je často možné zjistit přítomnost nežádoucích mikroorganismů (bakterie – je možné je vidět jako velmi drobné tečky nebo plísně – vlákna nebo chomáčky vláken). Kontaminace mikroorganismy se dá také zachytit díky barevné změně média způsobené reakcí fenolové červeně na kyselé prostředí v médiu.

3.4.2 POVRCHOVÉ ZNAKY

Povrchové znaky (markery) buněk jsou bílkovinné struktury na povrchu buněk a jejich přítomnost je specifická pro jednotlivé typy buněk. Většinou se jedná o struktury, které plní určitou funkci – např. jako ligand (místo pro navázání jiné molekuly např. protein-protein) nebo receptor (místo pro navázání specifickou vazbou). Proces detekce povrchových markerů buňky bývá také označován jako imunofenotypizace a výsledný obraz detekovaných povrchových markerů buňky pak jako její fenotyp (také imunofenotyp).

Pro detekci povrchových markerů buněk jsou využívány různé techniky, v současné době nejrozšířenější je flowcytometrie. Jde o techniku, která umožňuje detekci fyzických a chemických vlastností buněk. Jinak řečeno, na základě velikosti, granularity a povrchových znaků každé testované buňky, je možné sestavit celkový obraz uvedených vlastností celé testované buněčné populace.

V praxi je při buněčných kultivacích flowcytometrie využíváno především k potvrzení fenotypu buněk při primokultivacích pro potvrzení identity buněk (např. kmenové buňky: CD31- a CD34+, fibroblasty: col1+, FSP+), ke zjištění čistoty buněčné populace

(při izolaci mohou být izolovány směsné kultury např. fibroblastů a keratinocytů apod.). Dále k detekci diferenciaci a dediferenciaci buněk (především při použití kmenových buněk a jejich diferenciaci) a k určení fenotypu buněk pro potvrzení jejich správné funkce (např. u chondrocytů v rámci produkce kolagenu II, agrekanu, atd.).

Kromě detekce povrchových markerů, je také možné použít fluorescenční barvení k měření obsahu DNA, viability nebo virové transdukci. Flowcytometrie je také možné využít ke stanovení viability buněčné populace – poměru mrtvých a živých buněk.

3.4.3 STANOVENÍ CHARAKTERISTICKÉ FUNKCE BUNĚK

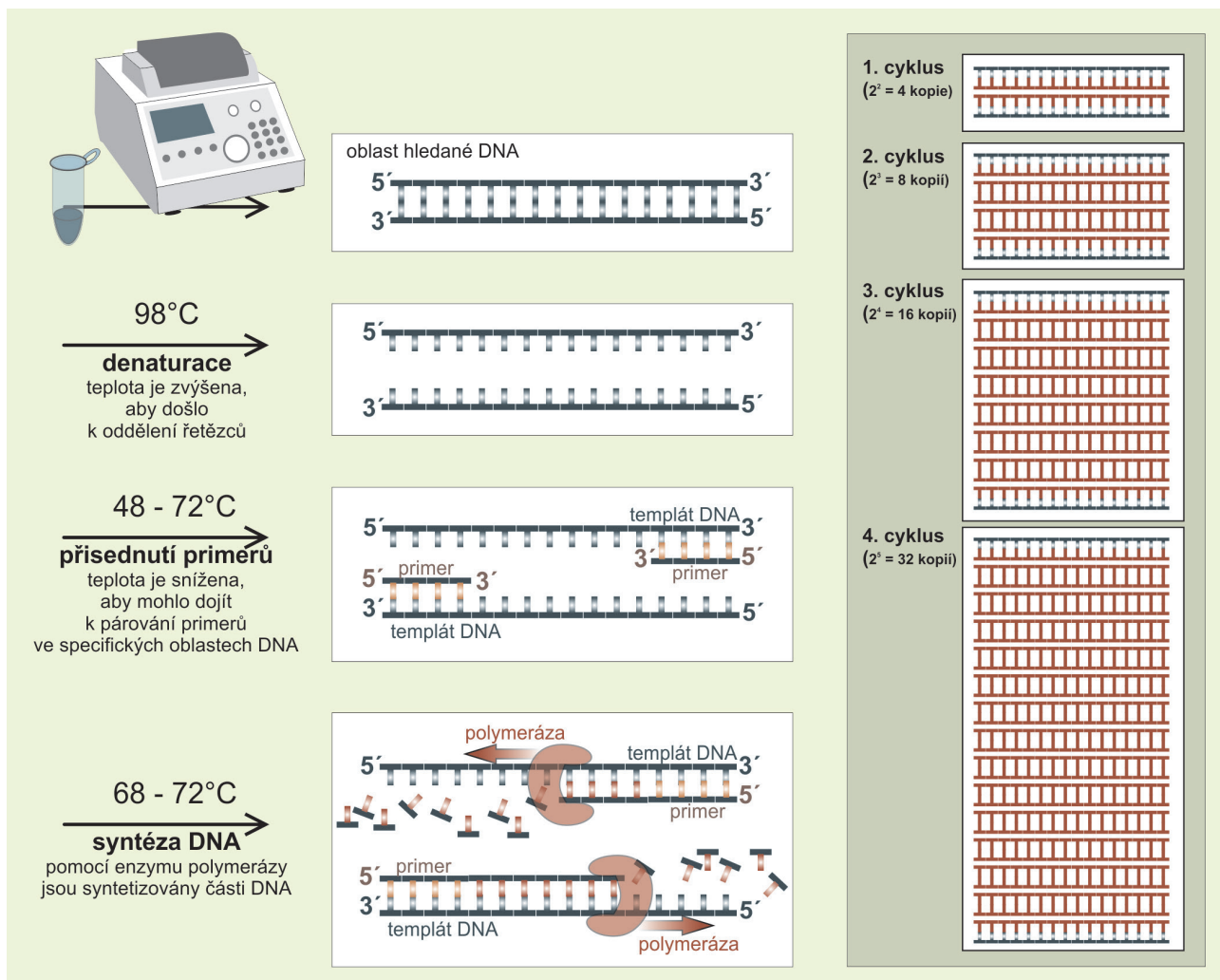
Pro stanovení správné funkce buněk jsou detekovány charakteristické látky, které buňka vylučuje při tvorbě mezibuněčné hmoty. Každá buňka, stejně jako u povrchových znaků, pokud se nachází v prostředí s optimálními podmínkami, produkuje charakteristické látky (jde většinou o proteiny nebo malé peptidové molekuly) a je charakterizována expresí určitých genů (nebo naopak absencí exprese jiných genů). Například chondrocyty exprimují geny pro složky chrupavčité mezibuněčné hmoty jako je např. kolagen typu II a agrekan, osteoblasty geny pro složky kostní hmoty jako je osteokalcin, osteopontin, kolagen typu X, nebo enzym alkalická fosfatáza. Pro mezenchymální kmenové buňky je např. charakteristická exprese povrchových markerů CD73, CD90, CD105 a pro hepatocyty zase exprese genu pro albumin, cytochrom P450, nebo enzymy glukóza-6-fosfatáza, tyrosin aminotransferáza aj. Buňky kosterního svalstva produkují např. bílkoviny myosin a troponin a pro neurony je specifická exprese genů pro jaderný protein NeuN, proteiny beta-III tubulin, nebo proteiny synaptických receptorů či napětově řízených kanálů na povrchu buňky, atd.

Záchyt produkce těchto látek je možné provádět na molekulární úrovni pomocí PCR, qPCR nebo pomocí detekce vylučovaných látek do kultivačního prostředí. V tomto případě je nejčastěji využívána ELISA, případně je možné použít také HPLC.

Pro detekci transkripce charakteristických genů, které kódují produkci proteinů specifických pro určitý typ buňky, je využívána tzv. PCR (Polymerázová řetězová reakce). Jde o metodu, pomocí níž je možné detekovat i jedinou kopii části DNA. To umožňuje určit přítomnost specifické sekvence v genomu buňky nebo případně detekci aktivního přepisu charakteristické sekvence buňky (kódující např. specifický protein).

Pro realizaci PCR je nutné znát hledanou sekvenci. Pro vazbu jsou pak použity specifické sekvence označované jako Primery (krátké sekvence, které jsou komplementární – schopny se vázat na hledanou sekvenci). Dále je nutná přítomnost enzymu DNA

polymeráza, která umožní amplifikaci. Reakce probíhá v termocyleru, který pracuje v cyklech opakovaného nahřívání a chlazení, aby bylo umožněno opakovaného přisednutí specifické sekvence Primeru, syntéza specifické části DNA, a opětovné rozpojení amplifikované části. Tímto opakováním vzniká řetězová reakce a počet hledané DNA, pokud je přítomná, exponenciálně narůstá. Výsledkem je detekce hledané části genomu (obr. 31).

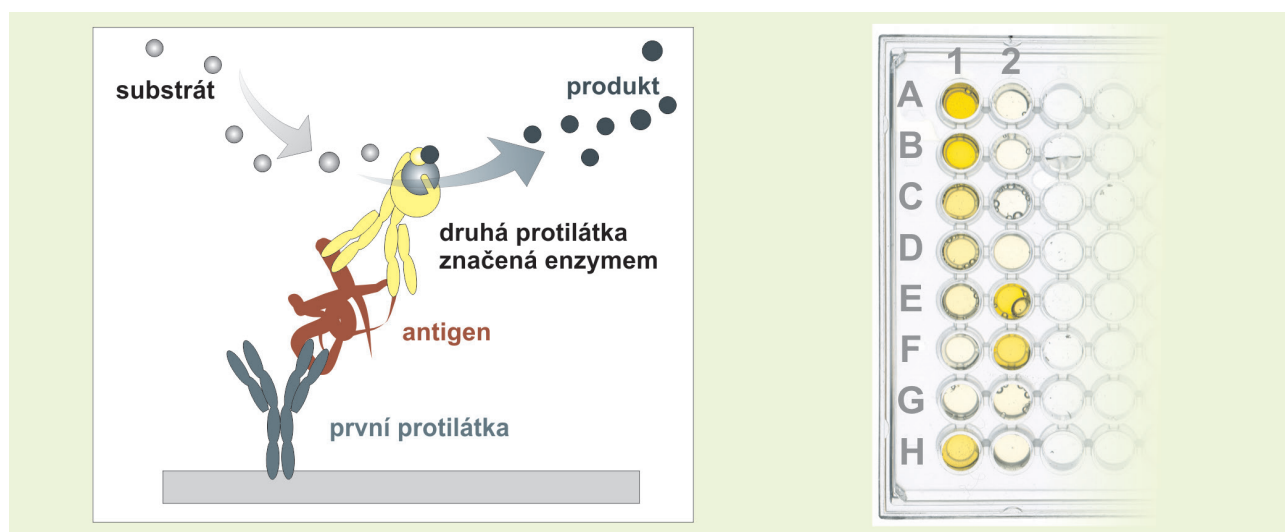


Obr. 31 Princip PCR

qPCR quantitative real-time PCR také označovaná jako RT-qPCR nebo RT-PCR je založena na podobných principech jako PCR, ale zároveň dochází ke kvantifikaci cílové DNA. Kvantifikace probíhá v reálném čase (na rozdíl od běžné PCR, kde detekce probíhá až na konci). Kvantifikace produktu je zajištěna pomocí „reporterové“ molekuly, kterou je molekula fluorescentní barvičky. Ta je připojena na krátkou sekvenci cílové DNA. Fluorescenční značka je zaktivována pouze odštěpením „zhášeče“ (quencher) pouze pokud dojde k přepisu hledaného úseku DNA. Kvantifikace je provedena extrapolací naměřeného množství fluorescence.

Velice využívanou metodou v tkáňovém inženýrství, je také pro přímou detekci látek produkovaných buňkami do prostředí, využívána tzv. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Jednotlivé typy buněk jsou charakteristické produkcí specifických látek v rámci tvorby mezibuněčné hmoty a podle jejich složení je možné určit, např. zda jde o diferencované buňky, zda je buňka ve vhodném prostředí nebo zda je zvolený scaffold pro osazení buňkami vhodný a podporuje buňky v produkci správné ECM.

Vzhledem k tomu, že se jedná většinou o proteiny, detekce probíhá na principu reakce antigenu a protilátky (Obr. 32). Většinou je na plastový povrch navázána protilátka proti hledanému proteinu, na tu se váže hledaný protein. Pro detekci je pak do reakce přidána druhá protilátka, která se specificky váže na vytvořený komplex antigenu a protilátky. Druhá protilátka je značena enzymem, který po přidání substrátu umožní reakci, při které dojde k barevné změně (Obr. 32). Pokud je pro reakci připravena standardní křivka, je možné i kvantifikovat množství hledaného proteinu.



Obr. 32 Princip ELISA (vlevo), Výsledek barevné reakce ELISA (vpravo)

Pro detekci proteinů v médiu může být využita také HPLC (high-performance liquid chromatography). Příkladem je detekce produkce katecholaminů chromafinními buňkami kultivovanými *in vitro*.

3.5 REFERENCE A SLOVNÍK POJMŮ

1. Buettner, Kimberly A. „Ross Granville Harrison.“ Embryo Project Encyclopedia (2012).

2. Irfan Maqsood, M.; Matin, M. M.; Bahrami, A. R.; Ghasroldasht, M. M. (2013). „Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment“. Cell Biology International 37 (10): 1038–45.

3. Jennie P. Mather, Penelope E. Roberts Introduction to Cell and Tissue Culture: theory and technique, New York 1998

4. R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, (2010)

5. Starobová O., Landa L., Nováková J., Šulcová A, VÝZKUM NOVÝCH LÉČIV od zrodu k registraci, Farmakologický ústav LF MU, Brno

6. Steinhardt, E; Israeli, C; Lambert, R.A. (1913) "Studies on the cultivation of the virus of vaccinia" J. Inf Dis 13, 294–300

7. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience, Surgery 1999 Nov; 126(5):847-55

8. Valis P, Chaloupka R, Krbec M, Repko M, Adler J, Nýdrle M, Léčba osteochondrálních defektů kolenního kloubu metodou implantace solidního chondrograftu - dlouhodobé výsledky Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2004;71(6):339-44.

http://www.encyclopedia.com/topic/Wilhelm_Roux.aspx

http://www.ted.com/talks/anthony_atala_growing_organs_engineering_tissue.html

http://www.biology-online.org/dictionary/Cell_line

http://www.lgcstandards-atcc.org/en/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx

<https://www.phe-culturecollections.org.uk/aboutus/ecacc.aspx>

<http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-morphology.html>

https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf

<http://www.d.umn.edu/~biomed/flowcytometry/introflowcytometry.pdf>

http://web.lfhk.cuni.cz/histologie/web/kmenove_bunky/kmenove_bunky.asp

Slovník pojmů

Adherentní tkáňová kultura – kultura buněk, která přisedá, je pěstována na pevné podložce – sklo, umělá hmota (speciálně upravený polystyren pro tkáňové účely) a je u ní možné sledovat charakteristickou morfologii.

Alogenní buňky – buňky, které jsou stejného druhu, ale nepocházejí ze stejného organismu

Aplikovaný výzkum – je původní zkoumání provedené k získání nových znalostí, které je však již směřováno k specifickému a praktickému cíli.

Aseptická technika – soubor postupů a technik, jejíž aplikací by mělo být zabráněno přenosu kontaminujících mikroorganismů do kultury.

Autologní buňky – buňky, které pocházejí z téhož organismu, buňky tělu vlastní

Bezsérové médium – kultivační médium, které neobsahuje sérum, to je nahrazeno jiným zdrojem bílkovin a růstových faktorů.

Buněčná banka – kryoprezervovaná (nebo jinak uchovaná) kultura buněk, která slouží jako zásoba buněk pro práci s kulturou.

Buněčný kmen – primokultivované buňky, u kterých byla provedena alespoň jedna pasáž (subkultivace)

CD-Cluster of differentiation – označení typu molekul na povrchu buňky. Jsou označovány čísla a je možné je detekovat pomocí protilátek. Jsou charakteristické

Čas zdvojení (doubling time) – čas potřebný ke zdvojnásobení počtu buněk v populaci (jedná se o délku jednoho buněčného cyklu.)

Destičkový lyzát – substrát používaný jako náhrada séra, vzniklý z krevních destiček, ze kterých byly opakovaným mrazením uvolněny růstové faktory.

Dot-plot – forma elektronické prezentace dat flowcytometrické analýzy, kdy každá částice, která projde laserem flowcytometru je znázorněna tečkou. Dle její pozice v dot-plotu je dána její charakteristika nebo vlastnost.

Doubling time (Čas zdvojení) – čas potřebný ke zdvojnásobení počtu buněk v populaci (jedná se o délku jednoho buněčného cyklu.)

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) – Metodu detekce proteinu na základě reakce antigen-protilátka, výsledkem je barevná reakce

Embryonální kmenové buňky – populace pluripotentních buněk, která byla izolována z blastocyst, tzv. ES buňky (embryonic stem cells)

Experimentální vývoj – je systematickou prací, která využívá existujících znalostí získaných výzkumem a praktickými zkušenostmi, a která směřuje k výrobě nových materiálů, výrobků nebo zařízení, k zavedení nových postupů, systémů a služeb nebo k podstatnému zlepšení toho, co se již vyrábí nebo je zavedeno

Extracelulární Matrix (ECM) – látky vylučované buňkou, jsou charakteristické pro daný typ buňky. Je zásadní pro detekci funkce buňky.

Fáze úbytku – Fáze růstu kultury, dochází k odumírání buněk v kultuře.

Fenotyp buňky – (ve smyslu imunofenotypizace)– soubor povrchových markerů buňky, které jsou pro danou buňku charakteristické

Flowcytometr (FACS) fluorescence-activated cell sorter – přístroj pro multiparametrickou analýzu fyzikálních a chemických vlastností, schopen analyzovat až tisíce částic za vteřinu.

Flowcytometrie – metoda pro multiparametrickou analýzu fyzikálních a chemických vlastností až tisíce částic za vteřinu.

Forward scatter (FSC) – paramter flowcytometrické analýzy, měří světlo laseru, které bylo vychýleno velikostí měřené částice – určuje velikost měřené částice.

HPLC (high-performance liquid chromatography) – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – chromatografická technika, která slouží k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti i koncentrace ve vzorku

Chondrocyty – terminálně diferencované buňky chrupavkové tkáně

Chromafinní buňky – buňky dřene nadledvinek

Imunofenotypizace – proces stanovení fenotypu buňky na základě imunologické detekce jejich povrchových znaků (markerů).

Keratinocyty – buňky kožní epidermis

Klinické hodnocení – soubor několikafázového testování nového léku v klinickém prostředí s cílem ověřit jeho bezpečnost, účinnost a vhodnost.

Kmenová buňka – nediferencovaná buňka, která má schopnost se dělit (sebeobnovovat), ale zároveň také dát vznik dalším buňkám, které diferencují.

Konfluence – paramter adherentní kultury, který určuje míru pokrytí kultivační lahve buněčnou kulturou. Je vyjadřována v procentech.

Konjugovaná protilátka – protilátka, která je spojena se signální molekulou

Kryoprezervace – způsob uchování buněk, kdy jsou buňky zmrazeny v protektivním roztoku, který brání jejich poničení při zmrazování.

Lag fáze růstové křivky – První období růstu kultury, kdy se kultura přizpůsobuje podmínkám, může docházet k poklesu růstové křivky

Liniové buňky – buněčná kultura, která byla upravena tak, že pokud jí bude dodáváno čerstvé médium a bude mít dostatek místa pro svůj růst, bude se dělit nekonečně.

Log fáze růstové křivky – Fáze logaritmického růstu buněčné kultury, kdy se buňky množí logaritmickou řadou (logaritmus počtu buněk je lineární funkcí kultivační doby).

Mesenchymální kmenové buňky – Kmenové buňky, které produkují buňky tzv. mezodermového (mezenchymového) původu. Do spektra produkce spadají buňky podpůrných tkání, svalovina, cévy, krevní buňky, ledviny, pohlavní orgány aj.

Monoklonální protilátka – je protilátka (imunoglobulin), která pochází z produkce jednoho klonu aktivovaných B-lymfocytů. Specificky se váže na daný antigen.

Morfologie – charakteristický tvar buněk adherentní kultury

Multipotentní kmenová buňka – je kmenová buňka, která je zadaná, tj. omezená k produkci jen omezeného spektra buněk vznikajících v rámci jednoho zárodečného listu (ektodermu, entodermu nebo mesodermu)

Osteocyty – buňky kostní tkáně

PCR (polymerázová řetězová reakce) – je metoda rychlého zmnožení úseku konkrétní DNA, je založena na principu replikace nukleových kyselin.

Pluripotentní kmenová buňka – je buňka, která má schopnost produkovat buňky různých zárodečných listů – ektodermu (např. neurony), entodermu (např. hepatocyty) i mesodermu (např. svalové buňky)

Polyklonální protilátka – Je produktem mnoha aktivovaných klonů B lymfocytů a proto je namířena proti více epitopům určitého antigenu nebo směsi antigenů.

Povrchové markery – struktury na povrchu buněk, které jsou jedinečné pro daný typ buněk a slouží k jejich identifikaci

Preklinické testování – testování na zvířatech s cílem určit míru rizika po podání látky při specifikovaných podmínkách

Primokultura – buňky, které byly izolovány přímo ze živé tkáně a jsou udržovány v podmínkách in vitro.

qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) – je metoda rychlého zmnožení úseku konkrétní DNA, která využívá fluorescentní signál k detekci množství hledané DNA.

Růstová křivka buněk – znázorňuje jednotlivé růstové fáze buněčné kultury

Side scatter – parametr flowcytometrické analýzy, charakterizuje detekované částice z hlediska jejich granularity

Stacionární fáze růstu – fáze růstu buněčné kultury, kdy dochází ke zpomalení, až zastavení růstu buněk

Subkultivace – proces přenosu buněk z původní kultivační lahve do nové kultivační lahve s čerstvým kultivačním médiem

Suspenzní tkáňová kultura – kultura buněk, která nepřisedá.

Terminálně diferencované buňky – buňky, které se dále nevyvíjí, mají charakteristické vlastnosti a typické povrchové markery

Tkáňová kultura – je kultura buněk, která je izolována ze zvířecí, rostlinné nebo lidské tkáně, a tato kultura je udržována ve vhodných podmínkách mimo živý organismus.

Základní výzkum – je experimentální nebo teoretická práce provedená k získání znalostí o základech jevu a pozorovaných skutečnostech bez úvah o jejich konkrétní aplikaci.

Seznam doporučené literatury a odkazy na internetové zdroje

Atala A., Lanza R., Methods of Tissue Engineering, 2001

Freshney I. R., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, John Wiley & Sons, 2011

Freshney I. R. Vunjak-Novakovic G., Culture of Cells for Tissue Engineering, 2006

Lanza R., Langer R, Vacanti J.P., 4th Edition, Academic Press 2013

Shapiro HM, Practical Flow Cytometry, 4th Edition, 2005

Sklar L. A., Flow Cytometry for Biotechnology, 2005

<http://www.d.umn.edu/~biomed/flowcytometry/introflowcytometry.pdf>

<https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/brands/gibco/gibco-webinars.html>

<https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols.html>

<http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/aseptic-technique.html>

http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=cz

<https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>

<portal.med.muni.cz/download.php?fid=290>

KAPITOLA 4

APLIKACE TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

Lenka Kohutová

Jak již bylo popsáno v úvodu, tkáňové inženýrství je zaměřeno na vývoj materiálů pro aplikace spojené s regenerací či náhradou částí nebo celých tkání. Nachází uplatnění při léčbě pojivových tkání jako je chrupavka, kostní tkáň, nebo v zubním lékařství, dále při léčbě pohybového systému a svalů, kůže, kardiovaskulárního systému, při léčbě poškozených cév, srdeční chlopně či srdce, močového systému, plic, průdušek nebo průdušnice v rámci dýchacího systému. V poslední době začíná nacházet také uplatnění např. při léčbě nervového systému a míchy a v mnoha dalších aplikacích, jako je léčba cukrovky a některá degenerativní onemocnění.

Jak již bylo uvedeno, vhodný buněčný scaffold může být připraven pouze za předpokladu dokonalé znalosti struktury, vlastností a funkce původní tkáně, která má být danou strukturou napodobena. Z tohoto důvodu jsou tyto aspekty také dále stručně popsány spolu s přehledem nejvíce využívaných aplikací v rámci tkáňového inženýrství.

4.1 POJIVOVÉ TKÁNĚ

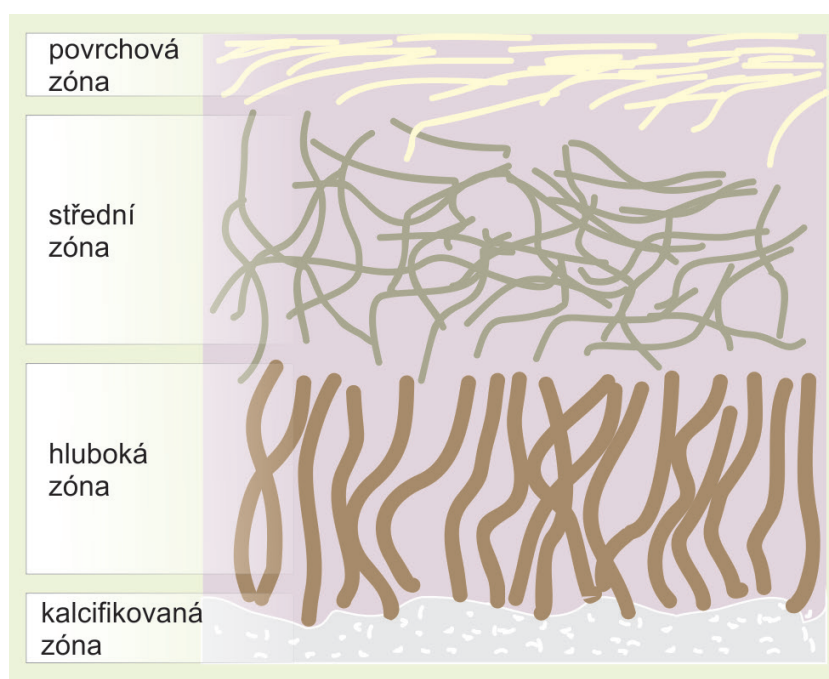
Velmi rozšířenou aplikací tkáňového inženýrství je regenerace či reparace pojivových tkání – chrupavky, kostní a zubní tkáně. Mezibuněčná hmota pojivových tkání se dle typu tkáně skládá z různě velkého podílu fibrilární a amorfni složky. Vlákniťa složka je tvořena především kolagenními, elastickými a retikulárními vlákny, kdežto amorfni složka je tvořena převážně glykosaminoglykany a glykoproteiny.

4.1.1 KLOUBNÍ (HYALINNÍ) CHRUPAVKA

Nejrozšířenějším typem chrupavky v těle je hyalinní chrupavka, jež pokrývá kloubní hlavice, tvoří konce žeber, skelet hrtanu, průdušnice, průdušek a část podkladu nosu. Jedná se o pojivovou tkáň, která je tvrdá, hladká a sklovitá a její povrch pokrývá

synoviální membrána. Chrupavka je porézní materiál tvořený buňkami a mezibuněčnou hmotou – extracelulární matrix (ECM). Hlavním typem buněk vyskytující se v hyalinní chrupavce jsou chondrocyty. Tvoří jen 2 % objemu chrupavky, ale jsou odpovědné za produkci ECM. Kromě amorfni základní hmoty produkují velmi jemná kolagenní vlákna především typu II vytvářející prostorové sítě. ECM chrupavky je specializovaná pojivová tkáň sestávající z hydratovaného proteoglykanového gelu, jenž odolává kompresi především díky obsahu kolagenních vláken. Na stavbě mezibuněčné hmoty se podílí kyselina hyaluronová (HA), proteoglykany, ale i glykoproteiny a v elastické chrupavce také elastin. Velmi důležitou roli zde hrají kolagen II, propůjčující chrupavce její pevnost v tahu a elektronegativní proteoglykan agrekan, jenž umožňuje pohyb vody napříč matrix – zachování elektroneutality.

Skládá se ze tří oddělených zón (povrchové, střední, hluboké) a kalcifikované zóny navazující dále na kost (Obr. 33). V povrchové zóně jsou kolagenní vlákna uspořádána paralelně navzájem k sobě ale i k povrchu. Toto uspořádání kolagenních vláken dává této vrstvě největší sílu ze všech vrstev. Také je zde nejvyšší koncentrace chondrocytů. Střední vrstva je bohatá na proteoglykany a obsahuje méně uspořádané kolagenní vlákna. V nehlubší vrstvě je koncentrace chondrocytů nízká, ale množství proteoglykanů a kolagenních vláken je nejvyšší, což činí tuto spodní vrstvu nejvíce odolnou vůči síle v tlaku. Blíže k subchondrální kosti je chrupavka mineralizovaná a tvoří přechod mezi chrupavkovými zónami a kostí.



Obr. 33 Struktura chrupavky

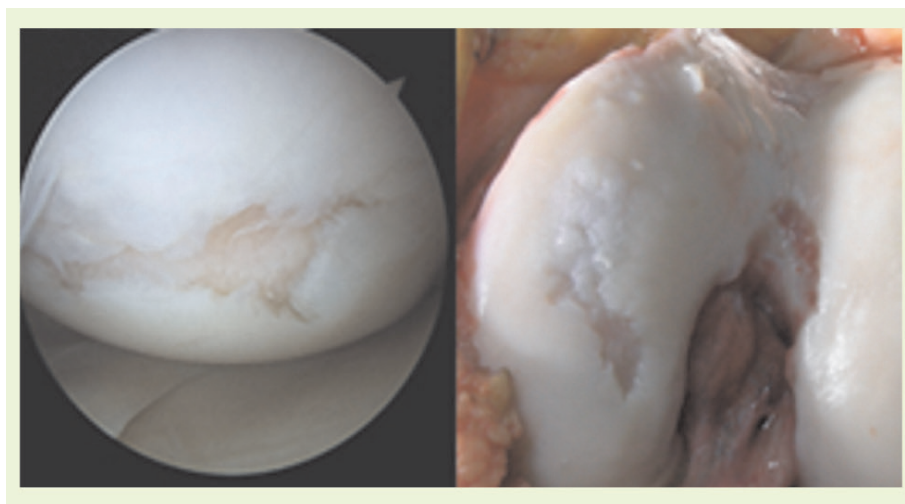
(na základě zdroje: <http://www.mdpi.com/2079-4983/3/4/799/htm>)

4.1.1.1 DEGENERACE A REGENERACE CHRUPAVKY

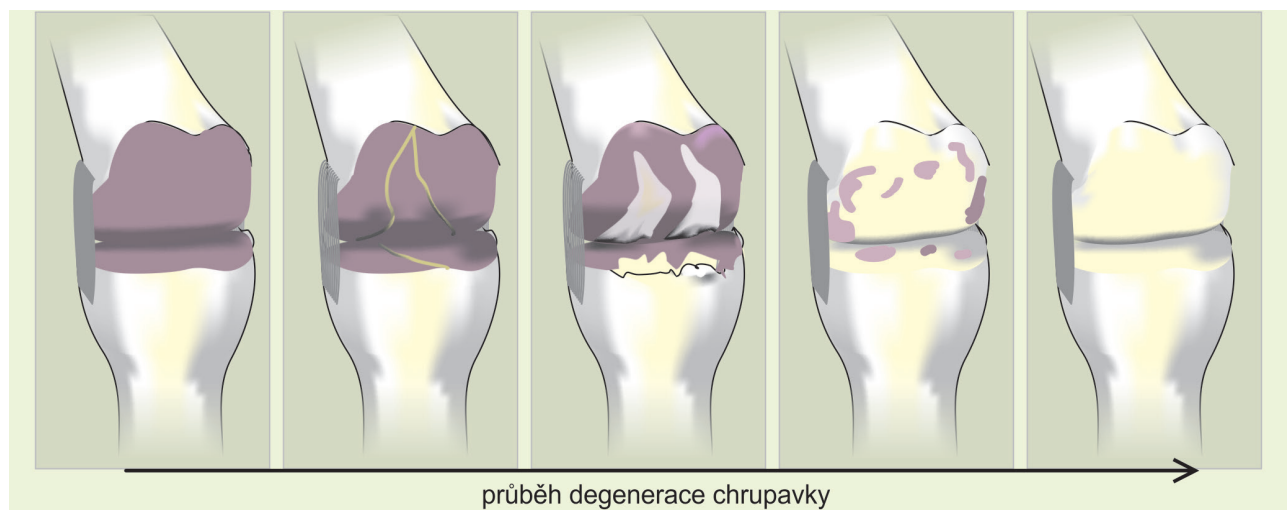
Kvalita a pružnost kloubních chrupavek s věkem klesá a snižuje se i jejich výška. Je třeba si uvědomit, že i tzv. „nezatížená“ kloubní chrupavka je vystavena trvalému tlaku 6–8 kg/cm², který vyvolává svalový tonus.

V dospělosti již chrupavka neroste a chondrocytů ubývá. Opotřebením povrchů je pak částečné, a je po určitou dobu kompenzováno zmnožením amorfni mezibuněčné hmoty, jejíž složení se ovšem také mění. Úbytek chondroitin sulfátu a kyseliny hyaluronové vede u starších osob ke ztrátě viskozity mezibuněčné hmoty chrupavky a ke snížení schopnosti chrupavky vázat vodu. Chrupavka se nesnižuje jen celkově, ale obnažují se i vazivová vlákna povrchových vrstev, která jsou tak vystavena přímému mechanickému zatížení pohybujících se kloubních ploch. Odkrytím vazivových vláken jsou ohroženy především okrajové zóny chrupavek, které jsou tenčí a vlákna i u nepoškozených chrupavek zde nejsou dostatečně „kryté“ mezibuněčnou hmotou.

Tato anatomická změna ve stavbě chrupavek je pokládána za iniciační proces, kterým nejčastěji začíná degenerativní onemocnění kloubů – osteoartróza (OA). Na obrázku (Obr. 34) je znázorněna poškozená chrupavka. Toto onemocnění je charakterizované rozpadem chrupavky a trpí jím přes 80 % lidí nad 60 let. Na obrázku je vidět průběh tohoto onemocnění (Obr. 35).



Obr. 34 Poškozená chrupavka



Obr. 35 Průběh degenerace chrupavky při osteoartróze. Zleva doprava: celistvá nenarušená chrupavka a její postupná degradace (na základě zdroje: <http://www.davidnelson.md/Osteoarthritis.htm>)

V nedávné době byla v mnoha případech výměna kloubu jedinou možností pro zlepšení funkce kloubu u pacientů s pokročilým stádiem OA.

4.1.1.2 LÉČBA DEFECTŮ CHRUPAVKY

Při regeneraci chrupavky ve srovnání s kostmi narážíme na hlavní problém, a to je její cévní zásobení – je avaskulární nebo cévy jen procházejí skrze chrupavku. Látková výměna je proto zprostředkována hlavně difúzí skrze synoviální tekutinu. Podmínkou obnovy a náhrady pojivových tkání je přítomnost cév, tedy přítomnost krevního oběhu. Tato podmínka je u chrupavky částečně splněna jen v dětství, a proto je regenerace chrupavky u dospělého člověka velice omezená nebo v pokročilém věku k ní nedochází vůbec. Vzhledem k velmi omezené schopnosti samoobnovení této tkáně představuje narušení povrchu chrupavky kloubu náročný klinický problém – tkáňové inženýrství tak přináší nové možnosti při její léčbě.

Z hlediska hojení chrupavek je určitým paradoxem, že se lépe hojí defekty zasahující až do kostěného podkladu chrupavek např. do kloubních konců. Kost je totiž u těchto typů zranění zdrojem cév, které zahajují reparativní pochody poškozené chrupavky. Spontánní regenerace větších defektů kloubních chrupavek, které na kontaktních plochách nemají perichondria, je u dospělých osob prakticky nulová.

Nepřítomnost cév má však pro chrupavku i jeden pozitivní důsledek. Chrupavky vykazují velmi nízkou antigenicitu, což dovoluje využívat chrupavek nejen jako homo-, ale i jako heterotransplantátu.

S rozvojem tkáňového inženýrství se zvyšuje možnost regenerace a náhrady poškozené kloubní chrupavky. Cílem tkáňového inženýrství kloubní chrupavky je nalézt optimální zdroj buněk a materiál s využitím růstových faktorů a dalších stimulačních faktorů pro její úspěšnou regeneraci.

Jak již bylo popsáno v úvodu, pro proliferaci a diferenciaci buněk je vhodná 3D struktura scaffoldu. Ideální scaffold by měl vykazovat kontrolovatelnou degradaci, přizpůsobit se tvaru a hloubce defektu a v závislosti na lokaci defektu mít vhodné mechanické vlastnosti. Velmi důležitá je adheze a integrace s okolní nativní chrupavkou a také difúze nutričních a odpadních produktů. U buněčných scaffoldů je také nezbytná podpora viability buněk a jejich diferenciaci a produkce chrupavčité ECM. Při regeneraci chrupavky lze použít rozličné množství scaffoldů a pro léčbu chrupavky se využívají scaffoldy jak ve formě hydrogelů, hub tak i scaffoldy na bázi vláken. Každá z uvedených struktur má své výhody i nevýhody pro danou aplikaci a nejčastěji se pro jejich přípravu využívají materiály na bázi kolagenu I a II, želatiny, poly(α -hydroxy esterů), alginátů, chitosanu, HA, kyseliny polymléčné (PLA), polyglykolové (PGA) a jejich kopolymerů (PLGA) nebo kombinace těchto materiálů.

4.1.1.3 TYP A ZDROJ BUNĚK

Pro TE chrupavky se nejvíce využívají kmenové buňky nebo chondrocyty. Chondrocyty jsou zřejmou volbou, jelikož se nacházejí v nativní chrupavce a byla podrobně studována jejich role v produkci, zachování a remodelaci ECM chrupavky. Chondrocyty jsou charakterizovány kruhovou morfologií a produkcí především kolagenu typu II a sulfatovaných glukosaminoglykanů (GAGs). Mnoho studií se zabývá využitím autologních chondrocytů přímo z kloubní chrupavky, nicméně metoda je invazivní a může přinášet řadu komplikací. Další možností je využití autologních chondrocytů z jiné chrupavky v lidském těle např. ušní, nosní či žeberní. Při odběru chondrocytů musí být vzat v potaz také věk dárce, jelikož neonatální a mladé chondrocyty rostou rychleji a mají větší chondrogenní potenciál.

Využívané jsou také fibroblasty, které lze ve srovnání s chondrocyty jednodušeji kultivovat a tedy získat i ve větším množství, ale mohou být převedeny na chondrogenní typ pouze za vhodných podmínek, v ostatních případech po jejich transplantaci do defektu chrupavky dojde k vytvoření fibrózní tkáně.

V nedávné době vzrostl zájem o výzkum a využití kmenových buněk v tkáňovém inženýrství při léčbě chrupavky jako alternativní možnost k autologním chondrocytům. Kmenové buňky jsou pluripotentní buňky a mohou podléhat chondrogenezi při kultivaci v buněčných agregátech v přítomnosti růstových faktorů TGF- β .

4.1.1.4 STIMULAČNÍ FAKTORY

Jak již bylo uvedeno, nejúčinnější použití buněčných scaffoldů je v kombinaci s vhodnými biologicky aktivními látkami, jako jsou růstové faktory apod. Pro léčbu chrupavky je využíváno několik typů těchto faktorů, jako jsou TGF- β , FGF (fibroblast growth factor), BMP (bone morphogenic protein) a IGF (insulin-like growth factor). Tyto faktory mohou stimulovat diferenciaci chondrocytů a zvyšovat expresi kolagenu II a agrekanu. Bylo zjištěno, že nejdůležitější roli při vývoji chrupavky hraje pak skupina TGF- β . Obvykle je využívána pro indukci chondrogenese u embryonálních a mesenchymálních kmenových buněk (MSCs) a k zvýšení proliferace chondrocytů. BMPs jsou izolovány z kostí či chrupavky a hrají důležitou roli při celkové morfogenezi kloubu. Mezi další faktory ovlivňující regeneraci chrupavky patří přítomnost např. HA, chondroitin sulfátu, insulinu a dalších. K urychlení a vylepšení růstu chrupavky *in vitro* jsou využívány bioreaktory. Mezi biofyzikální stimuly patří získávání kyslíku a živin chondrocyty pasivní difúze ze synoviální tekutiny.

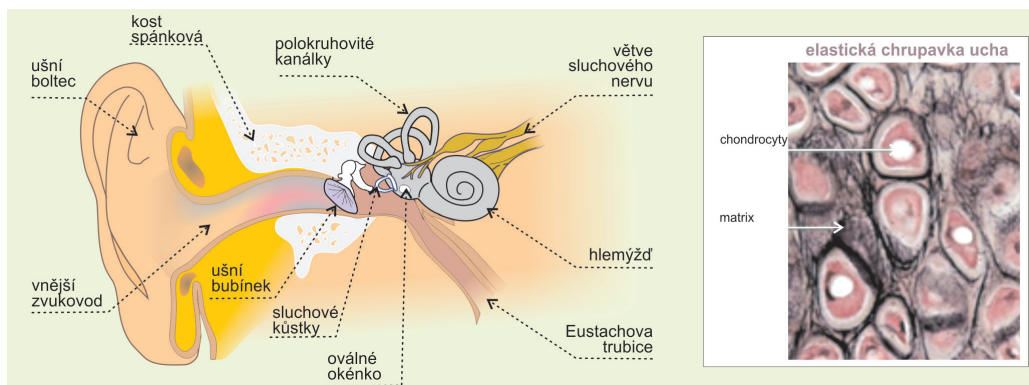
4.1.1.5 TRANSPLANTACE CHONDROGRAFTU

Pro léčbu poškozené kloubní chrupavky využívá národní tkáňové centrum v ČR tzv. chondrografty. Ve fázi I se provede artroskopie kolenního kloubu s odběrem zdravé chrupavky. Po kultivaci chondrocytů *in vitro* jsou buňky fixovány pomocí fibrinového lepidla a vzniklý chondrograft (štěp) je implantován do defektu chrupavky (II. fáze). Chondrograft tak urychluje zhojení chrupavky. Důležitým faktem je, že dochází k tvorbě chrupavky hyalinního typu.

4.1.2 ELASTICKÁ CHRUPAVKA – REGENERACE LIDSKÉHO UCHA

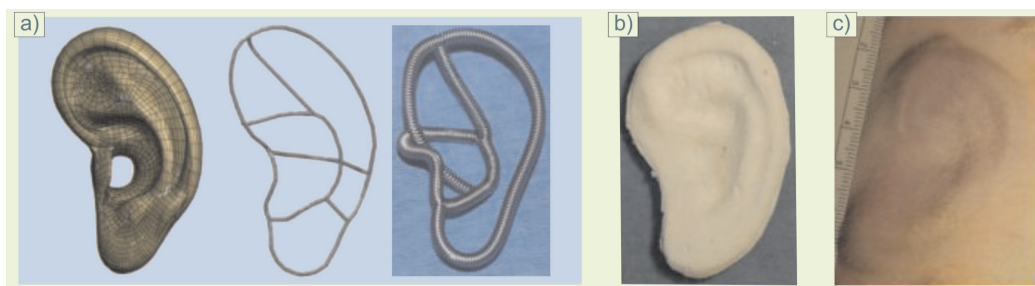
Kromě kloubní (hyalinní) chrupavky se nachází v lidském těle elastická a vazivová chrupavka. Elastická chrupavka je mimo jiné podkladem ušního boltce a částí zevního

zvukovodu (Obr. 36). Chondrocyty v ní obsažené jsou velmi podobné chondrocytům hyalinní chrupavky. Je velmi pružná a ohebná, což je dáno především přítomností a strukturou elastinu.



Obr. 36 Struktura lidského ucha (vlevo), fotomikrograf – elastická chrupavka lidského ucha (vpravo) (na základě zdroje: http://www.easynotecards.com/print_list/29639)

Pro přípravu náhrady lidského ucha lze využít tkáňové inženýrství implantací struktury s tvarem ucha pod kůží. Náhradou může být porézní struktura – scaffold vytvořený z biopolymerů (např. kyseliny polymléčné) nebo je prvně využito pro konstrukci tvaru lidského ucha ohebného materiálu např. titanu (Obr. 37). Při implantaci cizího materiálu do lidského těla by mohly nastat komplikace spojené např. s infekcí, proto se za pomoci tkáňového inženýrství připravuje pro danou strukturu „obal“ napodobující lidskou tkáň. Prvně je dle počítačové předlohy či odlitku pacientova ucha připraven model ucha z daného materiálu ve formě drátu a pokryt kolagenem. Scaffold je poté osazen buňkami odebranými z nosní či mezižební chrupavky pacienta. Jako inkubátor může poté sloužit samotná lidská tkáň pacienta (scaffold je umístěn pod kůží pacienta v jiné části těla) anebo lze pro přípravu náhrady lidského ucha použít zvířecí model např. laboratorní myši s potlačenou imunitní odpovědí (Obr. 38).



Obr. 37 a) Vytvoření modelu ucha z drátu dle počítačové předlohy b) připravený scaffold c) Implantovaná TE náhrada ucha (Laboratory for Tissue Engineering and Organ Fabrication at Massachusetts General Hospital, 2. Července 2012)



Obr. 38 Ukázka využití zvířecího modelu jako bioreaktoru pro přípravu náhrady lidského ucha (zdroj: <http://www.popsci.com/science/article/2013-07/artificial-human-ear-good-shape>)

Další možností přípravy lidského ucha pro transplantaci je využití metody 3D bioprintingu. Tato metoda je prozatím v počátcích a ještě si budeme muset chvíli počkat na první tištěné ucho transplantované pacientovi.

4.1.3 KOSTNÍ TKÁŇ

V porovnání s hyalinní chrupavkou je kostní tkáň lépe prokrvena a dochází tak k přirozené regeneraci. Na druhou stranu ani hojení kostí není neomezené a je závislé na rozsahu defektu a dalších faktorech.

Více než 10 % zlomenin je komplikovaných a je nutné pro jejich úspěšnou léčbu použití kostních štěpů nebo tzv. kostních lepidel. Kostní štěpy se podle postupu jejich získání dělí na tři typy. Nejvíce využívané jsou autologní štěpy. Štěp je odebrán od pacienta – nejčastěji z jeho stehenní kosti, avšak jejich hlavní nevýhodou je jejich omezená dostupnost a také až u 1/3 pacientů dochází v místě odběru k výskytu chronických bolestí, přecitlivělosti, náchylnosti k infekcím apod. Alternativou je použití alogenních štěpů, které jsou získávány od dárce, nejčastěji z kadaverů. Tato metoda je avšak spojená se zvýšeným rizikem odmítnutí imunitním systémem nebo přenosu patogenů. Navíc jejich zpracováním pro implantaci do pacienta dochází k odstranění některých látek nezbytných pro stimulaci regenerace kostní tkáně, což může léčbu ztěžovat. Třetím typem pak jsou uměle vytvořené kostní štěpy vyráběné z kovových materiálů nebo např. keramiky. Syntetické materiály mají ale problém s biokompatibilitou a léčebný efekt je v častých případech nedostatečný, popř. dochází k odmítnutí daného materiálu organismem.

Slibným řešením těchto problémů je právě využití tkáňového inženýrství, kdy se uměle vytvoří kostní scaffold o libovolném tvaru (což může být problémem u alogenních i autologních štěpů), který má srovnatelný nebo vyšší potenciál pro regeneraci defektu jako při použití autologního štěpu bez zmíněných negativních vedlejších efektů. Vzhledem k tomu, že kostní tkáň má velikou schopnost regenerace, lze tyto materiály využít i jako bezbuněčné a pokud materiál vykazuje vhodné biologické vlastnosti, dochází po jeho implementaci do organismu k migraci buněk do scaffoldu z okolí defektu, což umožňuje vznik nové kostní tkáně.

Obecně je pro přípravu těchto scaffoldů nutné si uvědomit stavbu a složení kosti. Příkladem může být zakomponování hydroxyapatitu (HAP) do umělých náhrad, které je výhodné, jelikož je kost z velké části tvořena minerální složkou, tedy i HAP. Také typ kosti má vliv na výběr vhodného materiálu. V lidském těle tvoří kostní tkáň dva typy: lamelární kost (vrstevnatá) a fibrilární (vláknitá) kost. Prvně zmíněný typ je základem velké části skeletu, především dlouhých a plochých kostí končetin.

Kostní tkáň se skládá z buněk osteoblastů (osteocytů), osteoklastů a z amorfni a vláknité ECM.

Buňky kubického tvaru s četnými výběžky představují osteoblasty. Tyto četné výběžky jim umožňují být v kontaktu s ostatními osteoblasty, a také realizovat látkovou výměnu kostí. Postupně se mění tyto buňky v protáhlé vřetenovité osteocyty, a proto jsou v kosti přítomny oba dva typy současně. Osteoblasty jsou schopny tvořit bílkoviny, produkují kolagení vlákna a amorfni proteoglykanovou mezibuněčnou hmotu. Také se podílí na mineralizaci kostní tkáně produkcí enzymů. Osteocyty jsou součástí regulačních mechanismů udržujících hladinu vápníku v tělních tekutinách, jelikož se účastní uvolňování minerálů z kostní tkáně. Obrovské buňky s množstvím jader zastupují osteoklasty. Přítomnost osteoklastů je spojena s přestavbou kostí provázenou resorpcí kostní hmoty. Jednoduše řečeno, osteoklasty vytváří prostor pro nově vytvářenou kost.

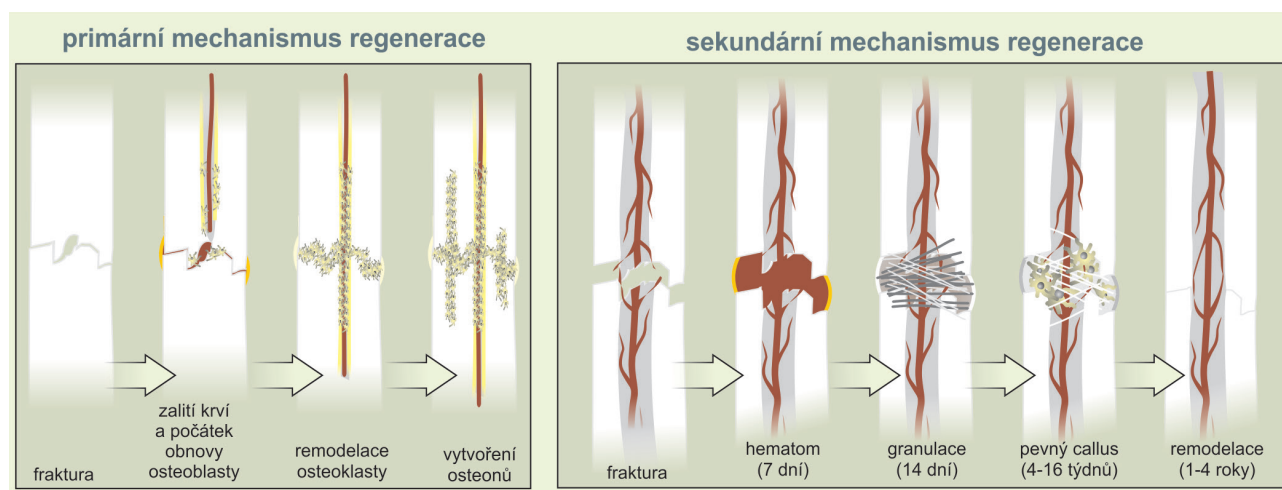
Kromě buněk je složkou kostní tkáně také mineralizovaná proteoglykanová hmota, přičemž minerální složka může dosáhnout až 65 % váhy kosti. Přítomné krystalicity fosforečnanu vápenatého jsou prostorově uspořádány jako hydroxyapatit (HAP). Z biochemického hlediska je tedy kost tvořena z 60 % minerály, 24 % zaujímají organické látky, 12 % voda a 4 % tuky. Amorfni mezibuněčná hmota tvoří malý podíl v kostní tkáni, z 90 % je tvořena kolagenem a zbytek připadá na proteoglykany.

Kosti také obsahují nervová vlákna, která vstupují do kosti spolu s cévami, jejichž stěny jsou tak inervovány. Také je bohatě inervován periost, kdežto kompaktní kost pod ním je necitlivá. Cévní zásobení kostí hraje důležitou roli při látkové výměně, osifikaci, růstu a hojení kosti.

Jak již bylo uvedeno, kost se v porovnání s chrupavkou velmi dobře hojí, jelikož je proces hojení spojen s cévním zásobením. Kostní zlomenina je schopna úplného zhojení. Regenerace probíhá pomocí dvou mechanismů: primárního nebo sekundárního (Obr. 39). Při jednoduché fraktuře se uplatňuje primární hojení, kdežto při složitějších zlomeninách je nutná časově delší remodelace – složitější sekundární mechanismus. Tento proces může trvat i roky.

Primární proces nastává, když části vzniklé zlomením kosti jsou blízko sebe a nedochází k vytvoření hematomu. Pomocí osteoklastů dochází k vytvoření „tunelu“, jenž umožňuje cévám a nervům vrůst a tím může být kost regenerována.

Při sekundárním procesu vzniká nejprve krevní výron – hematoma, který se v místě zlomené kosti organizuje a vytváří se granulační tkáň. Dochází k produkci amorfní mezibuněčné hmoty a vazivových vláken. Následně se vytváří chrupavčitý svalek, který dále osifikuje a kalcifikuje ukládáním vápenatých solí. Poté je svalek nahrazen kostním svalkem (callus osseus), který je pomalu přestavován na pevnou lamelózní kost.

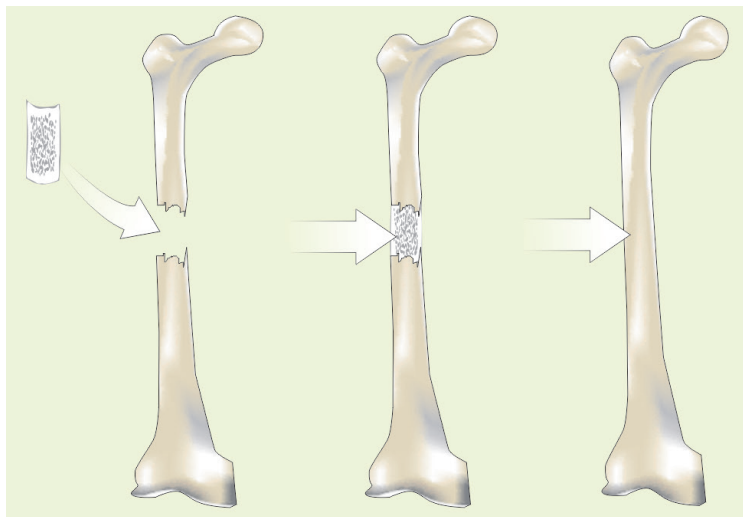


Obr. 39 Primární mechanismus hojení fraktury kosti zahrnuje zalití krví a počátek obnovy pomocí osteoblastů. Dále dochází k tvorbě nové tkáně a k její následné remodelaci osteoklasty, dochází k vytvoření osteonů. Při sekundárním mechanismu dochází prvně k vytvoření hematomu, poté ke granulaci, tvorbě kostního callusu a až po několika letech dochází k remodelaci kosti

4.1.3.1 KOSTNÍ DEFEKTY A MOŽNOSTI JEJICH LÉČBY

I přes poměrně dobré hojení kostí, je výhodné při léčbě kostních defektů využít přírodní materiály (autogenní a alogenní) či umělé náhrady (Obr. 40). Obecně je pro úspěšnou

transplantaci náhrady důležité zajistit dobré cévní zásobení lokality, kde je náhrada transplantována. Jednou z podstatných vlastností kostních graftů je osteointegrace, která je spojena s porozitou graftu. Snahou je proto připravit materiál, který by se nejvíce blížil svými vlastnostmi přírodní kostní tkáni.



Obr. 40 Ukázka náhrady části kosti (na základě zdroje: <https://www.mech.kuleuven.be/en/bme/research/mechbio>)

4.1.3.2 UMĚLÉ NÁHRADY A KOMPOZITNÍ MATERIÁLY

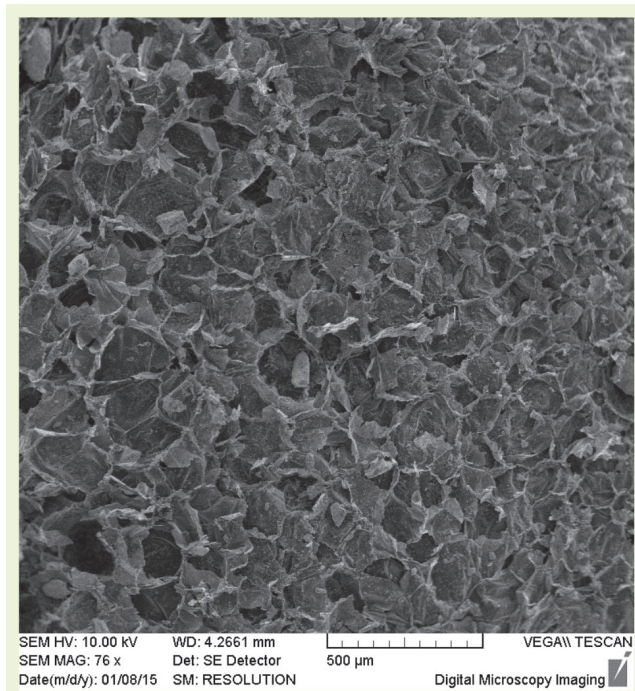
Umělé náhrady lze rozdělit do 4 skupin. První generace materiálů má velmi dobré mechanické vlastnosti. Do této skupiny patří železo, kobalt, chrom, titan nebo jejich slitiny. Druhá generace materiálů je zastoupena např. HAP, trikalcium fosfátem či bioaktivním sklem. Tyto materiály jsou bioresorbovatelné nebo bioaktivní a není u nich nutná výměna transplantátu. Třetí skupina se vyznačuje bioaktivními a bioresorbovatelnými vlastnostmi. Při přípravě těchto druhů materiálu je snaha napodobit přirozené složení a stavbu kosti. Poslední skupina kostních graftů je velmi podobná třetí generaci, ale navíc jsou zde přítomny kostní buňky, růstové faktory či proteiny podporující morfogenzi kostí. Touto skupinou se dostáváme k využití tkáňového inženýrství při léčbě kostních defektů.

Další možností je využití tzv. kompozitních materiálů, které se skládají ze dvou částí: spojitě fáze – matrice a plniva.

⁴Barolí B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, vol. 98, issue 4, s. 1317-1375 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1002/jps.21528.

Pro přiblížení se přirozenému složení kostí je vhodné jako plnivo použít částice na bázi kalcium fosfátu, které se svým chemickým složením blíží minerálnímu složení zubů a kostí savců. Výhodou je také biokompatibilita a bioaktivní vlastnosti tohoto materiálu, které usnadňují adhezi materiálu ke kostní tkáni a interagují s ní. Mezi nejvíce využívané kalcium fosfáty při in vitro a in vivo testech patří hydroxyapatit (HAP), trikalcium fosfát (TCP) či oktakalcium fosfát. Mnoho studií se zabývá kombinací zmíněných látek. Výhodou může být využití kombinace jejich vlastností např. stability HAP a v těle degradujícího β TCP. Vzniklý materiál by usnadňoval hojení kostní tkáně a také by se v místě potřeby vytvářely ionty a prekursorů pro krystaly.

Matrice jsou vytvářeny z materiálů, které napodobují přirozené složení kosti. Vhodným materiálem jsou biokompatibilní a biodegradabilní polymery, které jsou schopny interagovat s buňkami. Do úvahy připadají materiály jako je kolagen, želatina, hyaluronan, chondroitin sulfát a další. Kromě biopolymerních materiálů jsou používány pro náhradu či regeneraci kostí a menisků syntetické materiály. Z polyesterů je to např. polymléčná kyselina (PLA) vhodná jako kostní fixační materiál. Dále poly(β -estery) mohou být využity jako výztuže v ortopedii stimulující růst kosti. Scaffoldy na bázi polykaprolaktonu (PCL) jsou zkoumány při regeneraci menisků a kostí. Dále lze pro přípravu náhrad kostí využít polyethylenglykol (PEG), polyiminokarbonáty, polyfosfazany a pro



výplň nepravidelných defektů kostí např. polypropylenfumaráty. K regeneraci či náhradě kostí je používáno či zkoumáno mnoho materiálů, jejichž vlastnosti jsou blíže popsány v kapitole 2 Syntetické polymery a biopolymery využitelné v tkáňovém inženýrství. Optimalizace rychlosti degradace je dalším limitujícím parametrem při výběru materiálu, musí totiž odpovídat rychlosti regenerace a tvorby nové kostní tkáně. Mezi další parametry ovlivňující použití matrice patří porozita, která je důležitá pro migraci buněk, transport kyslíku a látkovou výměnu.

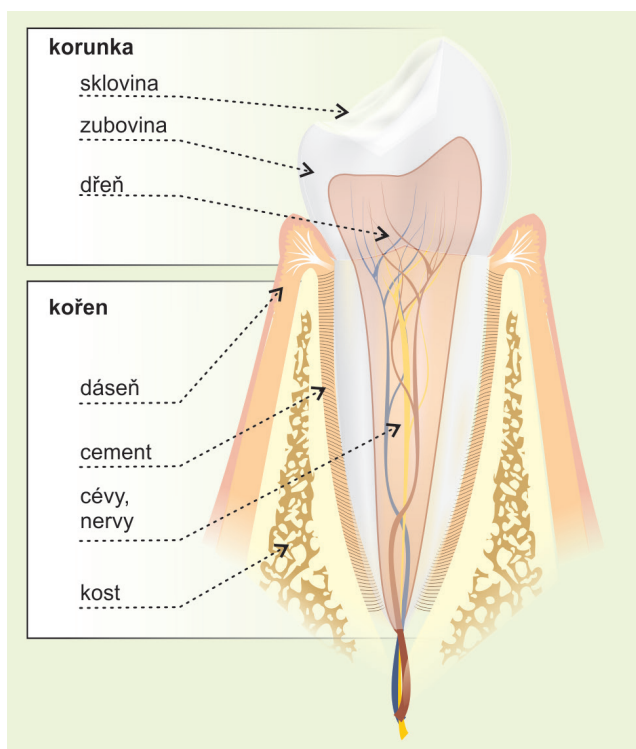
Obr. 41 Scaffold obsahující kalcium fosfátové částice – obrázek pořízený rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM)

Jelikož kost obsahuje především kolagen a hydroxyapatit, hodně výzkumných skupin se zabývá vývojem materiálu na této bázi (Obr. 41). Minerální fáze kosti, především HAP, propůjčuje kosti její rigiditu a houževnatost, kdežto organická složka poskytuje kosti její flexibilitu.

Kompozitní materiály mohou kombinovat vlastnosti scaffoldů s biologickými prvky, které stimulují buněčnou proliferaci a diferenciaci a nakonec i osteogenezi. Osifikace tkáně může být urychlena při použití scaffoldu osetého buňkami. Zřejmou možností je využití kostních buněk. Kvůli problému s izolací osteoblastů se využívají v in vitro a in vivo testech pro regeneraci kostních defektů spíše mesenchymální kmenové buňky.

4.1.4 ZUBNÍ TKÁŇ

Dalším typem pojivové tkáně je zubní tkáň, která je řazena do této skupiny díky zubovině, protože je svým složením podobná kostní tkáni. Ze 70 % je tvořena anorganickými

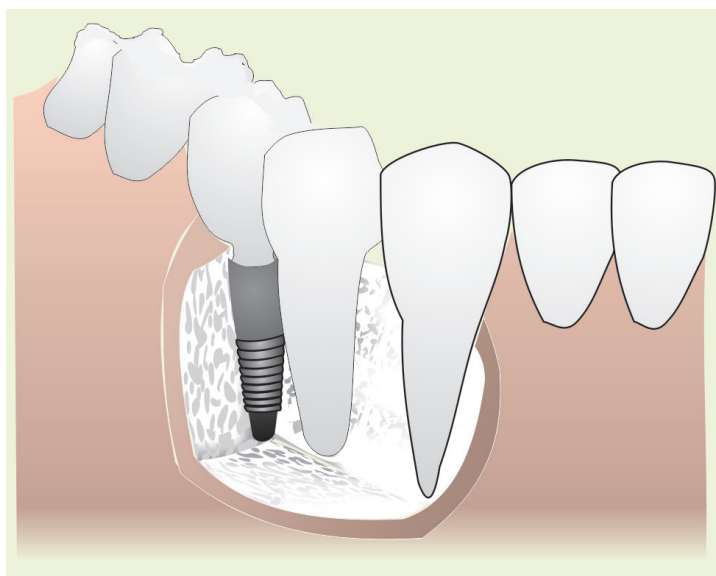


Obr. 42 Struktura zubu (na základě zdroje: <http://www.inspirawtion.com/lecba-zubniho-kazu.html>)

látkami, 20 % zaujímají látky organické a také je zde přítomna voda. Zubovina tvoří většinu hmoty zubu. Kromě zuboviny je další složkou zubu cement, jehož stavba je vláknitá a pokrývá především zubní krček a kořen. Další komponentou zubu je zubní dřeň, jež je tvořena převážně řídkým vazivem. Zubní dřeň je prostoupená krevními a mízními kapilárami a také je inervovaná. Zub se skládá ze tří hlavních částí: kořene, krčku a korunky (Obr. 42). Na povrchu zubní korunky se nachází sklovina, která je nejtvrďší částí lidského těla. Bohužel při poškození nemá schopnost regenerace.

4.1.4.1 SOUČASNÉ ZUBNÍ NÁHRADY VS. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

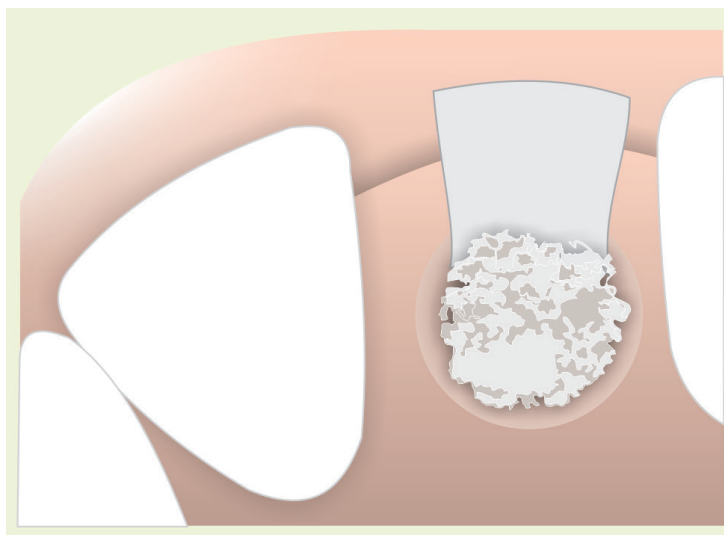
Již více než 30 let jsou chybějící zuby nahrazovány pomocí zubních implantátů (Obr. 43) vyrobených především z titanu či ze slitiny titanu a zirkonia. Implantát je umístěn do čelisti a po zhojení se na něj upevní korunka, můstek či celková protéza. Nevýhodou je, že čas na zhojení může být poměrně dlouhý (2–6 měsíců) v závislosti na okolnostech. Celý proces vpravení implantátu, zhojení, upevnění korunky či jiné komponenty může trvat i 18 měsíců. Ke zhotovení zubních náhrad se používá celá řada materiálů. Mohou být jak organického, tak anorganického původu. Ke zhotovení korunek a můstků a také jako výplňovou hmotu lze využít kompozitní hmoty. Polymerní materiály mohou být využity jako bazální pryskyřice, umělé zuby do protéz či otiskovací a podkládací materiál.



Obr. 43 Zubní implantát (na základě zdroje

[http://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&ved=0CAMQjxw&url=http%3A%2F%2Fwww.dfwimplantteam.com%2Fdental-implants-will-i-need-a-bone-graft%2F&ei=tkX0VLiaFsL6UOGxgsAF&bvm=bv.87269000,d.d24&psig=AFQjCNHeg0HzYfc62lsNNkfCIBEIHTwjjQ&ust=1425381009125437\)](http://www.google.cz/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&ved=0CAMQjxw&url=http%3A%2F%2Fwww.dfwimplantteam.com%2Fdental-implants-will-i-need-a-bone-graft%2F&ei=tkX0VLiaFsL6UOGxgsAF&bvm=bv.87269000,d.d24&psig=AFQjCNHeg0HzYfc62lsNNkfCIBEIHTwjjQ&ust=1425381009125437))

Prozatím se ve stomatologii, zabývající se náhradou chybějících zubů, využívají kovové implantáty, ale s rozvojem kmenových buněk a tkáňového inženýrství by mohly být využívány jako náhrada tzv. biologické zuby či kostní grafty (Obr. 44). Cílem je připravit vhodný scaffold obsahující kmenové buňky s odontogenními indukčními signály, který by sloužil jako anatomicky vhodná náhrada zuby.

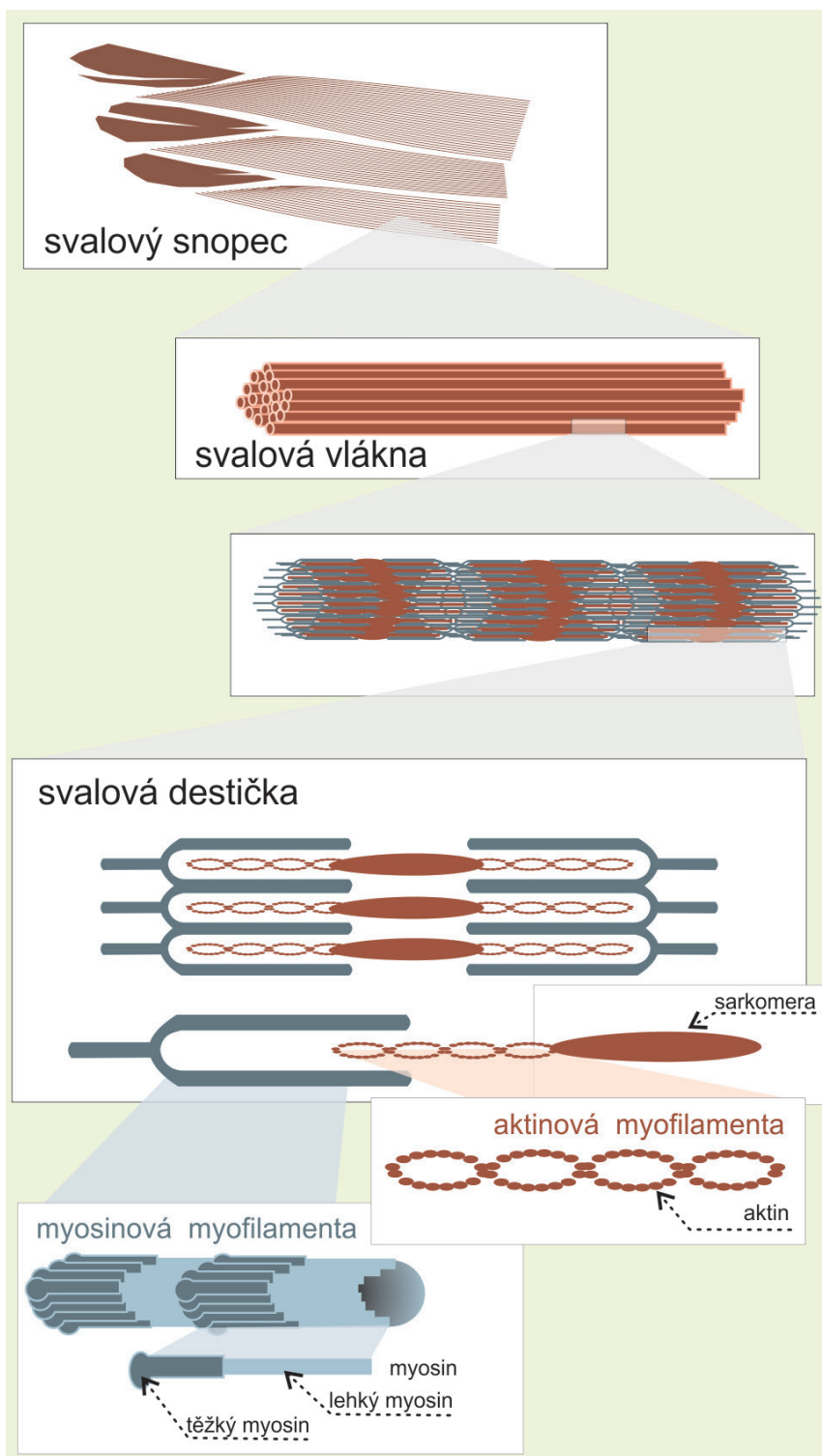


Obr. 44 Zubní výplň – kostní graft (na základě zdroje: <http://www.docvlee.com/oral-surgery-procedures/bone-grafting/>)

4.2 SVALOVÁ SOUSTAVA

Chrupavka, kostní a zubní tkáň spolu souvisí na základě složení. Jejich funkce a také všechny ostatní funkce probíhající v lidském těle vyžadují aktivitu svalů. Poškození lidského těla je většinou spojeno s poruchou funkce svalů, proto není obvykle regenerována samostatná tkáň ale celek zahrnující v menší či větší míře i svalovinu. V lidském těle se nacházejí 3 hlavní typy svalů: kosterní, srdeční a orgánové (hladká svalovina), dále pak nespécifický kontraktlní systém.

Příčně pruhovaná svalovina se velmi často upíná na kosti, a proto je také nazývána kosterní. Anatomickými jednotkami kosterních svalů jsou příčně pruhovaná svalová vlákna (Obr. 45). Jedná se o mnohoaderný útvar válcovitého tvaru, jenž je průměrně 1–40 mm dlouhý. Jak je vidět na obrázku, svalové vlákno je složeno z mnoha podjednotek. V cytoplazmě svalového vlákna jsou uloženy myofibrily (podélně orientované vlákénka), jejichž úsek rozdělený tenkou ploténkou, se nazývá sarkomera. Tato kontraktlní jednotka svalu je složena ze submikroskopických myofilament, jež jsou tvořena kontraktlními proteiny aktinem a myozinem, které hrají velmi důležitou roli při pohybu. Pružnost sarkomery zajišťují 2 bílkoviny: titin a nebulin. Ke kontrakci myofibril dochází na základě vzruchů přicházejících motorickými nervovými vlákny.



Obr. 45 Ukázka struktury kosterního svalu: svalový snopec, vlákno, destička, sarkomera, aktinová a myozinová myofilamenta, aktin, myozin – lehký a těžký⁵

⁵Na základě zdroje: Dylevský, I. *Funkční anatomie*; Grada Publishing a.s.: Praha, 2009

4.2.1 REGENERACE A NÁHRADA SVALŮ

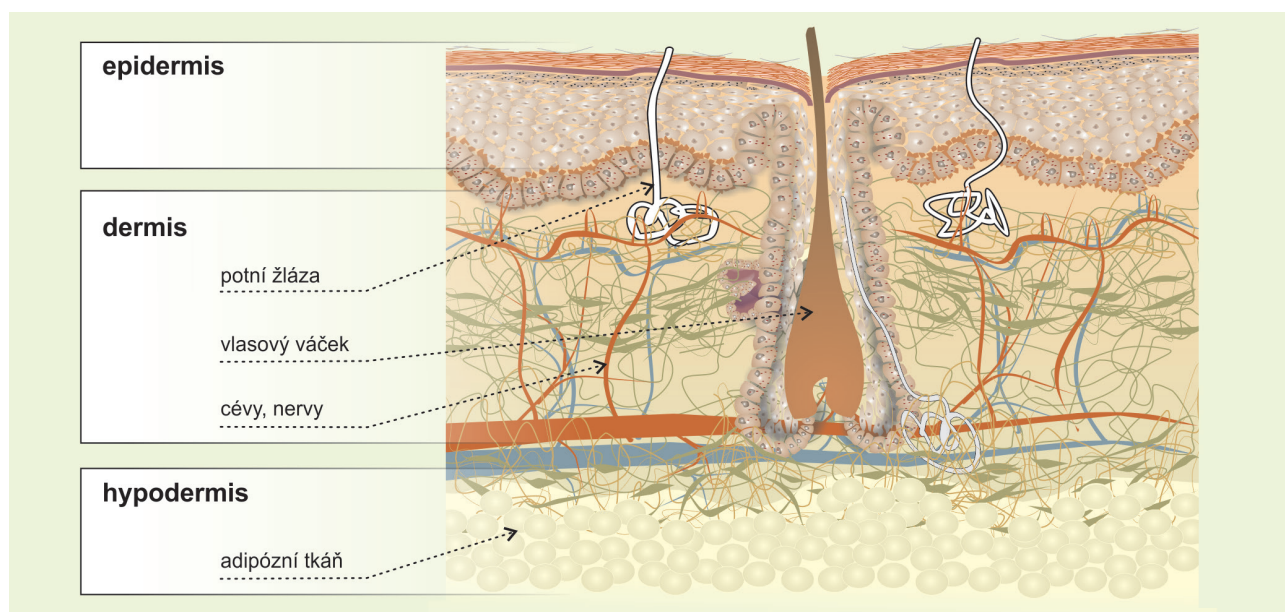
V závislosti na typu svaloviny se liší i její regenerace. Hladká svalovina je schopna regenerace díky myocytům, které si zachovávají schopnost mitotického dělení. Příčně pruhovaná svalovina má také určitou schopnost regenerace. Zdrojem pro regeneraci jsou vřetenovité satelitní buňky, které leží mezi svalovými vlákny. Srdeční svalovina není schopna žádné regenerace. Defekty (např. při infarktu) se hojí pouze proliferací vazivové tkáně za vzniku vazivové jizvy.

Skeletální svaly mohou být poškozeny při některých onemocněních, jako je např. svalová dystrofie či po rakovině, endokrinních a metabolických nemocech nebo při nervosvalové atrofii. Je třeba si uvědomit, že poškozený sval se hojí vazivovou jizvou, která se nemůže kontrahovat a sval je většinou defektní. Existuje více možností, jak nahradit nebo rekonstruovat skeletální svaly. Mohou být nahrazeny využitím svalových graftů získaných z lokálních nebo jiných míst. Příkladem je náhrada svalů čelisti po jejich chirurgickém odstranění v souvislosti s rakovinou – jako náhrada slouží prsní sval. Tato metoda nese s sebou také řadu komplikací, především může nastat problém s adaptací transplantovaného svalu v novém místě.

Lidský kosterní sval je za určitých okolností schopen regenerace. Rozsah regenerace se značně zvýší při použití svalového transplantátu k vyplnění defektu. Cílem je připravit 3D scaffold s vhodnými mechanickými vlastnostmi pro náhradu nativní tkáně. Výběr biomateriálu tvořící strukturu scaffoldu je důležitý pro podporu buněčné proliferace a diferenciaci a musí mít elastické vlastnosti imitující svalovou mezibuněčnou hmotu (vhodné vlastnosti v tahu). Za tímto účelem se např. využívají vlákenné scaffoldy na bázi kyseliny polyglykolové (PGA) či kopolymer kyseliny mléčné a polyglykolové PLGA. Také syntetické materiály jako je například Dacron a polytetrafluoroetylen byly využívány k regeneraci vrozených vad svalů. Velmi důležité je také správné zvolení typu a původu buněk. Jednou z možností je využití kombinace fibroblastů, myoblastů nebo kmenových buněk spolu s vybranými růstovými faktory. Pozitivní efekt na buňky má přítomnost proteinu IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Po zabudování buněk do scaffoldu probíhá kultivace *in vitro* v bioreaktorech, kde jsou scaffoldy mechanicky stlačovány a napínány, aby docházelo ke stimulaci buněk a produkovaly správnou mezibuněčnou hmotu. V optimálním případě po implantaci dochází k vytvoření sítě krevních cév a regeneraci svalu.

4.3 KOŽNÍ SYSTÉM

Kůže je největším orgánem těla s plošným rozsahem přibližně 1,7–2 m² a je zásadní pro přežití organismu – slouží jako bariéra proti vlivům okolního prostředí či k udržení hydratace a také si zachovává funkce recepční, termoregulační, imunitní a metabolické. V zájmu dosažení těchto důležitých funkcí se kůže neustále obnovuje a má kapacitu pro opravu ran, které jsou závislé na různém typu buněk obsažených v kůži. Pro pacienty s rozsáhlými popáleninami mají kožní náhrady kritický význam. Bohužel u mnoha kožních náhrad nedochází k obnově původní anatomie kůže, zahrnující vlasové folikuly, mazové a potní žlázy a také mechanické vlastnosti kůže nedosahují stejných kvalit. Pokrok v biologii kmenových buněk a dalších oborech by mohl výrazně zlepšit kožní náhrady, které by v ideálním případě byly nerozpoznatelné od normální původní kůže. Dosáhnout tohoto cíle není jednoduché – kůže není ve všech místech stejná, např. tloušťka kolísá od 0,5–4 mm. Hmotnost samotné kůže je asi 3 kg, s tukovou tkání až 20 kg. Kůže také není stejná na povrchu a v hlubších vrstvách. Obecně se skládá ze dvou vrstev: pokožky (epidermis) a škáry (dermis) (Obr. 46). Pod těmito vrstvami se nachází subcutis – tedy vrstva podkožního tuku. Epidermis je složena převážně z keratinocytů (přibližně 95 %) a zbytek tvoří Langerhansovy buňky, melanocyty produkující melanin a Merkelovy buňky. Epidermis je složena ze 4–5 vrstev plochých buněk uložených těsně na sobě. Schopnost dělení si zachovávají pouze hlubší vrstvy a doplňují olupující se odumřelé buňky povrchové vrstvy. Hranice mezi pokožkou (epidermis) a škárou (dermis) není

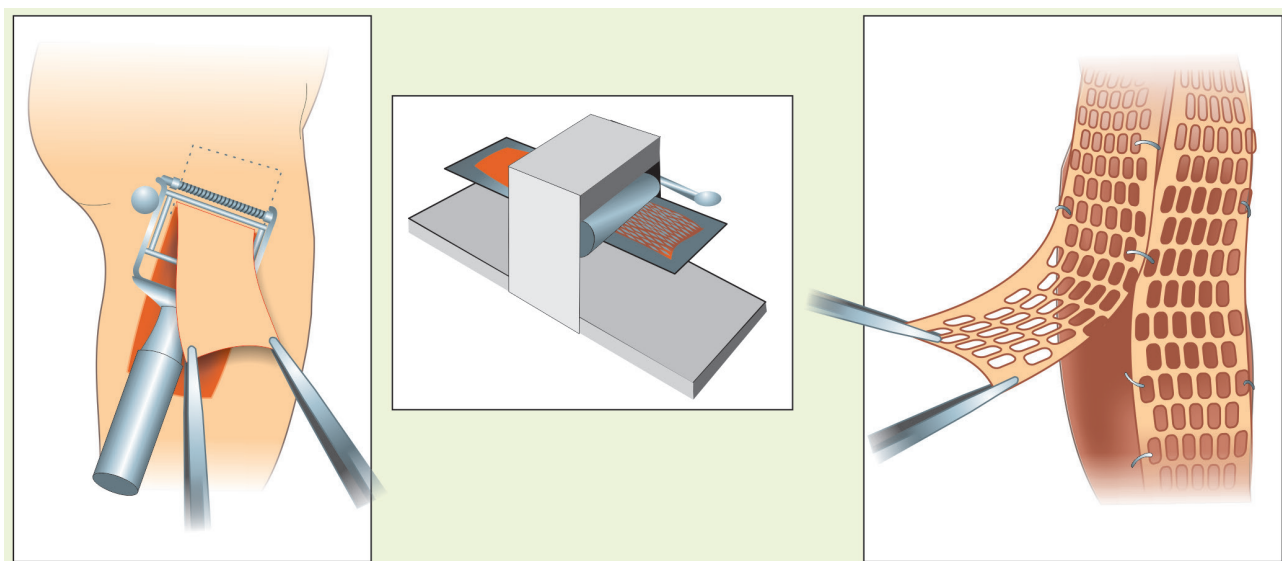


Obr. 46 Struktura kůže (na základě zdroje: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/4/14/413>)

ostrá, tyto dvě vrstvy jsou spojeny pomocí bazální membrány. Škára tvoří vazivovou tkáň, ve které se nachází nervová zakončení, termoreceptory, hmatová tělíska a další. Pod dermis se nachází podkožní vazivo, které se skládá ze sítě kolagenních a elastických vláken, mezi kterými se nachází vazivové buňky.

4.3.1 KOŽNÍ NÁHRADY

Jednou z možností regenerace kůže je využití kožních autologních transplantátů. Ty jsou využívány v traumatologii při kožní ztrátě a při náhradách jizevnaté tkáně po poraněních, dále pak při chronických kožních defektech, jako jsou bércové vředy, nehojící se rány či po rozsáhlejší odstranění kožních nádorů. Při popáleninách vyššího stupně je zasažena velká část lidské kůže a nemůže být tedy odebrána z nepoškozeného místa kůže pacienta. Z tohoto důvodu, se využívají dočasně alotransplantáty či xenotransplantáty a v pozdějším stádiu pacient podstoupí autotransplantaci.



Obr. 47 Kožní autologní transplantát (na základě zdroje: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19083.htm>)

Mezi náhrady kůže v rámci tkáňového inženýrství můžeme zařadit transplantáty obsahující kultivované autologní či alogenní keratinocyty, dále pak autologní/alogenní kompozity, bezbuněčné biologické matrice a buněčné matrice obsahující biologické substance jako je fibrin, různé typy kolagenu, elastin, HA, polykaprolakton + fibroblasty (vazivové buňky) a mnoho dalších. Dále jsou pro rekonstrukci kůže vhodné scaffoldy na bázi chitosanu, které vykazují adhezi fibroblastů a jejich proliferaci. K hojení kůže a ran

po popálení by mohla být vhodná antibakteriální nanovlákná připravená z oxidované celulózy a želatiny. Dle požadované aplikace a délce setrvání materiálu v daném místě dělíme materiály na dočasné, semi-permanentní a permanentní.

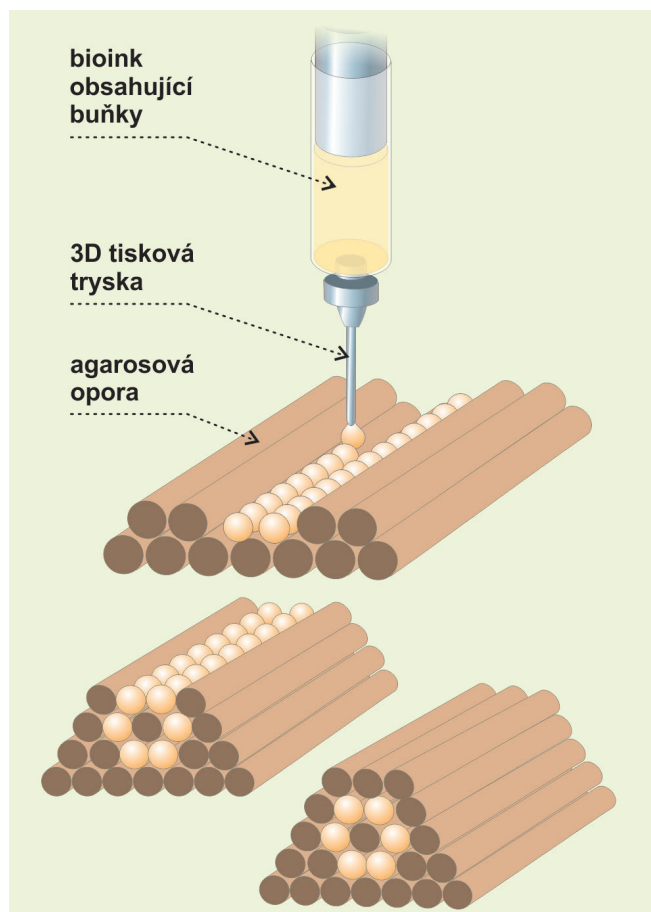
Doposud bylo provedeno mnoho studií zabývajících se regenerací kůže a vytvářením kožních transplantátů v oblasti tkáňového inženýrství, ale pouze několik z nich vedlo k vývoji vhodných komerčních produktů, viz následující tabulka (Obr. 48).

Material	Brand Name	Manufacturer
Collagen gel + cult. Allog. HuK + allog. HuFi	Apligraf™ (earlier name: Graftskin™)	Organogenesis, Canton, MA
cult. Autol HuK	Epicell™	Genzyme Biosurgery, Cambridge, MA
PGA/PLA + ECMP DAHF	Transcyte™	Advanced Tissue LaJolla, CA
Collagen GAG-silicone foil	Integra™	Integra LifeScience, Plainsborough, NJ
Acellular dermis	AlloDerm™	Lifecell Corporation, Branchberg, NJ
HAM + cult. HuK	Laserskin™	Fidia Advanced Biopolymers, Padua, Italy
PGA/PLA + allog. HuFi	Dermagraft™	Advanced Tissue Sciences, LaJolla, CA
Collagen + allog HuFi + allog HuK	Orcel™	Ortec International, Inc., New York, NY
Fibrin sealant + cult. autol HuK	Bioseed™	BioTissue Technologies, Freiburg, Germany
PEO/PBT + autol. HuFi + cult autol HuK	Polyactive™	HC Implants
HAM + HuFi	Hyalograft 3D™	Fidia Advanced Biopolymers, Padua, Italy
Silicone + nylon mesh + collagen	Biobrane™	Dow Hickham/Bertek Pharmac., Sugar Land, Tx

ECMP = extracellular matrix proteins, DAHF = derived from allog. HuFi, GAG = glycosaminoglycan, PGA = polyglycolic acid (Dexon™), PLA = polylactic acid (Vicryl™), PEO = polyethylen oxide, PBT = polybutylterephthalate, cult. = cultured, autol. = autologous, allog. = allogeneic, HuFi = human fibroblasts, HuK = human keratinocytes, HAM = microperforated Hyaluronic Acid Membrane (benzolic esters of hyaluronic acid = HYAFF-11®)

Obr. 48 Komerčně využívané či prodávané matrice a produkty v oblasti tkáňového inženýrství kožních náhrad a doplňků⁶

⁶Horch, R. E., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., Bach, A. D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2005, vol. 9, issue 3, s. 592-608 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x>



Obr. 49 Ukázka 3D bioprintingu
(na základě zdroje: <http://www.bbc.com/news/technology-20972018>)

Relativně novou metodou zabývající se mimo jiné náhradou kůže je tzv. 3D bioprinting (Obr. 49). Jak již napovídá název, tato technika je založena na 3D technologii tisku. Objekty jsou vytvářeny pomocí aditivního procesu, při kterém jsou po sobě jdoucí vrstvy materiálu kladeny na vhodnou podložku, dokud není dokončený celý předmět. Proces probíhá podle předem připravené šablony a objekty mohou být téměř jakéhokoliv tvaru nebo geometrie. Při „bio“printingu jsou vytvářeny struktury s obsahem buněk, přičemž jejich životaschopnost a funkce by měla být zachována. Při vytváření kožní tkáně lze použít keratinocyty a fibroblasty představující epidermis a dermis a kolagen jako složku dermální matrix pokožky. Rozšíření těchto produktů do běžné praxe v rámci medicíny je

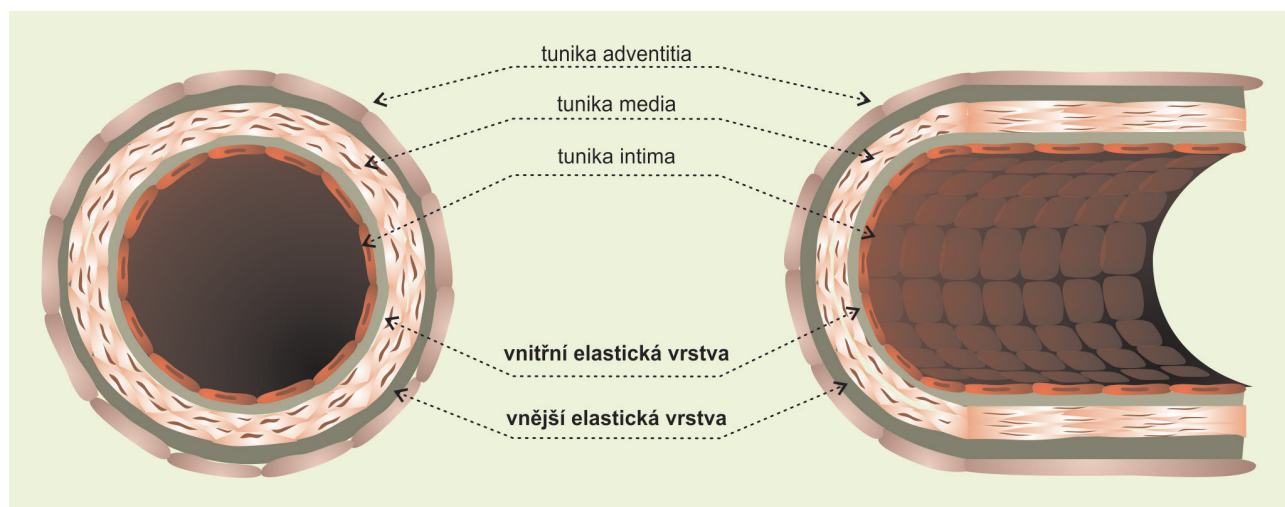
prozatím hudbou budoucnosti, přesto se skrývá v této technologii velký potenciál nejen v oblasti náhrad kůže, ale také při přípravě orgánů.

4.4 KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM

Oběhová soustava (kardiovaskulární systém, cévní soustava) je orgánová soustava sloužící především k transportu živin, plynů a odpadních látek z tkání nebo do tkání. Jedním z důvodů velkého zájmu o regeneraci této soustavy či jejích částí je vysoká mortalita pacientů, kteří trpí kardiovaskulárním onemocněním, především ve vyspělých zemích. Onemocnění jsou velmi často spojována s rozvojem civilizačních chorob např. obezity. V následujících kapitolách si přiblížíme strukturu, vlastnosti a funkci **cév, srdce a srdečních chlopní** a možnosti jejich regenerace.

4.4.1 CÉVY

Mezi krevní cévy jsou řazeny tepny, vlasečnice a žíly. Obecně mají krevní cévy trubicovitý tvar a slouží k transportu tělních tekutin. Lze je rozdělit do 3 hlavních skupin: tepny (artérie), vlasečnice (kapiláry) a žíly (vény). Stěna nativních krevních cév má trilamelární strukturu (Obr. 50), kde každá vrstva má určitou důležitou roli pro správnou funkci cév. Vrstvy v pořadí od středu cévy se nazývají: tunika intima, tunica media a tunica adventitia. Ve zdravé krevní cévě je vrstva intima tvořena monovrstvou endoteliálních buněk (ECs). Hlavní funkcí této vrstvy je kontrolovatelný transport přes cévní stěnu. ECs také regulují strukturu cév – produkují látky ovlivňující tloušťku cév. Endoteliální buněčná vrstva také zabraňuje tvorbě trombu. Vícevrstvá tunica media zajišťuje mechanickou pevnost a odolnost cév. Je tvořena buňkami hladkého svalstva (SMCs – smooth muscle cells), elastinem, kolagenem typu I, III a V a proteoglykany. Elastin propůjčuje cévám jejich elasticitu při expanzi, kdežto kolagen zabraňuje nadměrné dilataci. Poslední vrstva adventitia obsahuje fibroblasty, nervy, kolagen I a vlákna elastinu. Přispívá také k mechanické odolnosti a to především ukotvením cév k okolní tkáni.



Obr. 50 Struktura nativní krevní cévy⁷

4.4.1.1 CÉVNÍ NÁHRADY

Výše popsaná charakteristika nativních cév musí být vzata v potaz při přípravě cévních náhrad. Ideální cévní náhrada by měla strukturně i funkčně odpovídat nativní

⁷Na základě zdroje: Edited by Pallua, N., Christoph, V. *Tissue engineering from lab to clinic [online]*. Berlin: Springer, 2010, [cit. 2014-11-18]. ISBN 3642028241.

cévě. Měla by být netoxická, neantigenní, nekarcinogenní, inertní a také si zachovávat stejné vlastnosti. Pro umožnění a usnadnění chirurgického zákroku je důležitá snadná manipulace a možnost vhodné úpravy. Pružnost podélná by měla být od 7–10 %. Příčná pružnost by neměla přesahovat pružnost vlastní tepny. Materiály by měly vykazovat, vláčnost a přilnavost okrajů, hemokoagulační inertnost a sterilizovatelnost. Také je důležitá nulová implantační porozita, která je spojena např. s velmi hustým úpletem cévní náhrady, čímž se stává náhrada neprodyšnou a tím nedochází ke krvácení přes stěnu cévy. Na druhou stranu je nutná optimální biologická porozita, která je nezbytná při vhojování implantátu – je nutná pro fixaci a výživu neointimy (nová vrstva, která se vytváří na povrchu implantátu). Optimální biologická porozita je kolem 6000–7000 ml/cm². Mezi technické parametry, které by měly cévní náhrady splňovat, patří možnost průmyslové výroby se standardní jakostí, dostupnost různých tvarů a velikostí a přiměřeně dlouhá doba expirace sterility.

Obecně lze cévní náhrady rozdělit do dvou hlavních skupin: biologické a umělé. Mezi biologické náhrady patří autotransplantáty, alotransplantáty a xenotransplantáty. Biologické náhrady mohou být tepenné či žilní. Umělé náhrady lze vytvářet z neporézních (sklo, kov, guma, umělá hmota a jiné) či porézních materiálů, které mohou být textilního (pletené, tkané) či netextilního typu (lité).

Autotransplantáty jsou cévní náhradou, která je odebírána a implantována stejnému organismu (pacientu). Nahrazovány mohou být tepny i žíly. U tepen se při jejich šetrném odběru autotransplantát chová jako původní tepna. Nevýhodou je však omezená možnost získání tepny v potřebných rozměrech. Také pokud jsou tepny pacienta zasaženy aterosklerózou, jsou postiženy všechny tepny a není vhodné odebírat v tomto případě tepnu z jiné části těla. V minulosti dostávaly přednost tepenné autotransplantáty před žilními, ale se vzrůstajícím počtem pacientů s komplikacemi tepenných alotransplantátů se začaly častěji používat autotransplantáty žilní. Především je používána dobře přístupná žíla – vena saphena magna nacházející se v podkoží.

Získání alogenních transplantátů není jednoduché – jedná se o transplantáty získané odebráním cévního materiálu od jiného organismu stejného biologického druhu. Jsou využívány tepenné alotransplantáty a to především jako náhrada infikovaných cévních protéz. Při transplantaci se obecně odebírá celý hlavní tepenný kmen, poté se odebraná tepna konzervuje a uchovává v transplantačních bankách. V minulosti byly používány také žilní alotransplantáty. Nicméně díky rozšiřujícím se možnostem využití umělých náhrad se od toho ustupuje a používají se pouze jako dočasné řešení za urgentní situace např. při infekci cévní protézy, ale ne při plánovaných standardních výkonech.

Dříve se také využívalo xenotransplantátů tedy tkáně odebrané z jiného živočišného druhu. Tento způsob je vzhledem k rozdílným velikostem cév a anatomickému uspořádání poměrně omezený. Základním problémem je imunologická změna, které xenotransplantáty podléhají, a tak po určité době zanikají.

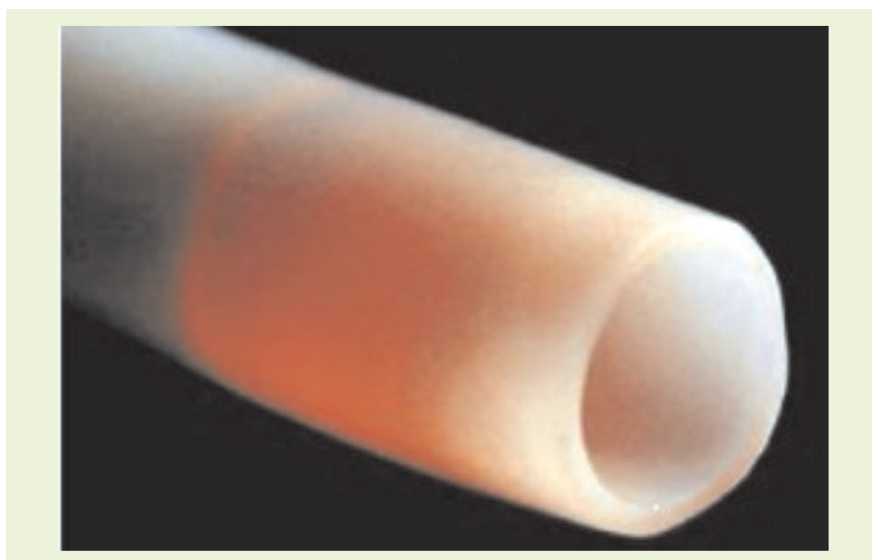
Další možností je využití umělých náhrad. Neporézní umělé náhrady jsou biologicky neporézní. Bohužel tato vlastnost je velmi důležitá při vhojování a s rozvojem porézních náhrad se přestaly používat. Porézní materiály někdy nazývané cévní protézy jsou tedy vhodnými náhradami. Dle způsobu výroby je lze rozdělit do tří skupin: tkané, pletené nebo lité. Výhodou tkaných cévních protéz je možnost vytvoření hustého úpletu (nulová implantační porozita), což má za následek vytvoření protézy téměř neprodyšné, tudíž u ní nedochází ke krvácení stěnou. Jejich nesporná výhoda nulové implantační porozity je v dnešní době nahrazena pletenými impregnovanými protézami a již se v dnešní době nevyužívají, především protože se po přestřížení vlákna třepí. Dalším typem jsou pletené protézy, jejichž výhodou je, že nedochází k jejich třepení. Před použitím musí být předsráženy krví pacienta, aby se dočasně zrušila porozita stěny. Samotné pletené protézy se využívají dnes velmi omezeně. Často jsou tyto protézy impregnovány kolagenem, želatinou či albuminem. Další možností je připravit materiál litím, kdy působením kombinace více faktorů především vysoké teploty a tlaku dochází k lisování do formy. Obecně je při přípravě porézních náhrad cílem nalézt vhodnou syntetickou látku, ze které by bylo možné vytvořit scaffold odolný tělesným tekutinám. Za tímto účelem bylo vyvinuto velké množství materiálů, pouze však několik je vhodných pro klinické použití, např. Dacron (komerční název pro polyetylentereftalát PET) a Teflon (polytetrafluoretylen PTFE). PET je velmi pevný, hydrofobní a odolný vůči slabým kyselinám a zásadám. Organismem je dobře snášen a nemá karcinogenní vlastnosti. Pro cévní náhrady jsou využívány pletené nebo tkané scaffoldy a to zejména pro náhradu velkých cév jako je aorta. Další zmíněný název přísluší polytetrafluoretylenu (PTFE). Ve srovnání s Dacronem je PTFE méně trombogenní a velmi málo porézní, jelikož se vyrábí litím.

Přestože je transplantace cév za využití cévních protéz či autologních náhrad v mnoha ohledech vhodnou alternativou, využití například autologních žil není možné až u 40 % pacientů ať už z důvodu nedostatku dárců či stavu pacienta. V některých případech by mohlo být řešením vytvoření náhrady krevních cév tzv. TEVG (tissue engineering vascular grafts). Ideální TEVG by měla být vytvořená z biodegradabilního a biokompatibilního materiálu. Připravený konstrukt musí být netrombogenní a neimunogenní a zároveň dostatečně silný a elastický (podobný nativní cévě) schopný odolávat vysokému tlaku krevního řečiště in vivo. Viskoelastické chování cévních tkáňových náhrad by mohla

znatelně zlepšit přítomnost elastinu. Důležitým aspektem při tvorbě umělých cév je dlouhodobá průchodnost konstruktů. TE cévní náhrady často vykazují patologické zvýšení extracelulární matrix, což má často za důsledek zhoršení průchodnosti cév. Tento jev je pravděpodobně způsoben nadměrnou proliferací a sekrecí cévních buněk.

Při tvorbě TEVG lze využít polymerních scaffoldů. Ideálně by vytvořený scaffold podléhal pomalé biodegradaci. Ve studiích bylo již použito mnoho materiálů pro tvorbu 3D scaffoldů zahrnující přírodní proteiny, syntetické biodegradabilní polymery či decelularizované cévy. Mezi používané materiály patří scaffoldy na bázi elastinu, poly(ether)uretanu, polyglykolové kyseliny (PGA), kopolymeru PGA, polyhydroxyalkanoátu (PHA), kopolymeru na bázi kolagenu a polyuretanu a další. 3D struktura scaffoldu může sloužit k podpoře buněčného růstu, migraci, diferenciaci a sekreci proteinů extracelulární matrix (ECM).

První volbou vhodných buněk pro implementaci do scaffoldu jsou neimunogenní autologní buňky cévního endotelu (ECs) a buňky hladkého svalstva (SMCs – smooth muscle cells) izolované od samotného pacienta. Mezi další možnosti patří dospělé kmenové buňky. Endoteliální progenitorové buňky (EPCs) jsou jedním z typů dospělých kmenových buněk, které mají kapacitu proliferovat, migrovat a diferenciovat se do „dospělých“ ECs. Na obrázku (Obr. 51) je znázorněna uměle připravená krevní céva, u které byly kultivovány endotelové buňky pacienta.



Obr. 51 Uměle připravená céva⁸

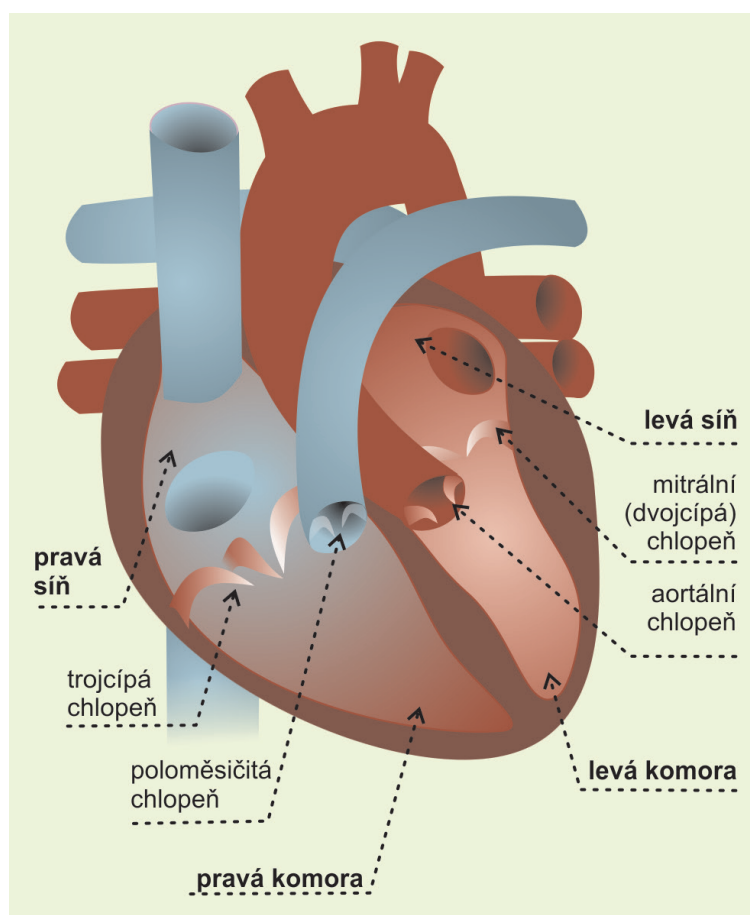
⁸Edited by Pallua, N., Christoph, V. *Tissue engineering from lab to clinic [online]*. Berlin: Springer, 2010, [cit. 2014-11-18]. ISBN 3642028241.

Díky dynamickému prostředí kardiovaskulárního systému, musí být vytvořené cévy funkční a vhodné již před transplantací – netromboidní povrch, dobré mechanické vlastnosti a mnoho dalších. Z těchto důvodů jsou pro vytváření vhodných náhrad používány bioreaktory simulující prostředí cév.

Zajímavou alternativou regenerace cév je využití „self-assembly“ technologie s buňkami. Vrstvy lidských cévních buněk rostou a vytváří jakoby destičky buněk tvořené především SMCs nebo fibroblasty. Po kultivaci jsou tzv. listy srolovány, čímž se vytváří tubulární konfigurace.

4.4.2 SRDCE

Jak již bylo zmíněno, kardiovaskulární onemocnění postihuje na světě čím dál více pacientů. Regenerace srdečního svalu není jednoduchou záležitostí, jelikož



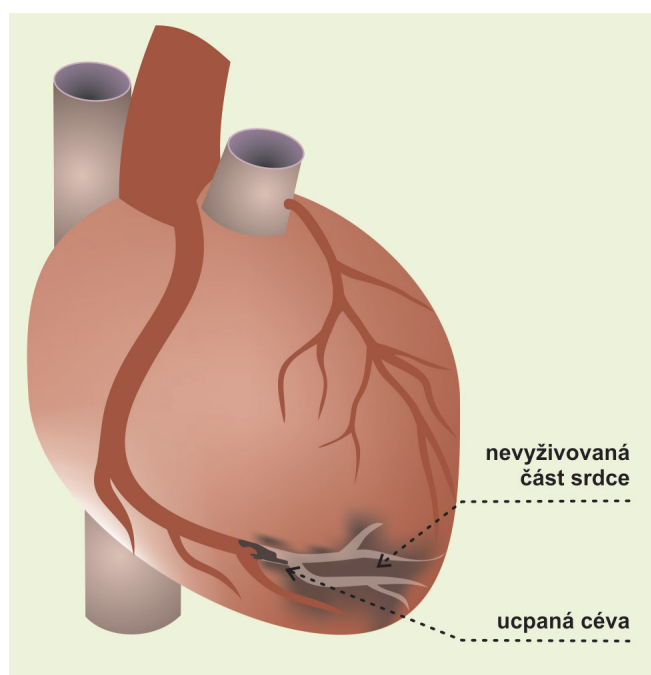
Obr. 52 Stavba lidského srdce (červené části – okysličená krev, modré části – odkysličená krev) (na základě zdroje: <http://www.tlukotsrdce.cz/clanek/599/plicni-hypertenze-kdyz-onemocni-plicni-cevy/>)

si nezachovává kapacitu k regeneraci a jedná se o složitý orgán. Tento dutý orgán svým tvarem připomíná kužel (Obr. 52). Hmotnost a velikost srdce je individuální, váží přibližně 270–320 g a velikost odpovídá přibližně pěsti člověka, jemuž náleží. Srdce je obaleno vazivovým vakem – osrdečníkem, jehož dolní část nasedá na bránici a horní část vrůstá do stěn velkých tepen. Na povrchu srdce se nachází dvě mělké rýhy – podélná a cirkulární, jenž tvoří hranice mezi srdečními dutinami – dvěma síněmi a dvěma komorami. Síňová a komorová přepážka odděluje pravostranné a levostranné dutiny.

Z levé komory vystupuje srdečnice neboli aorta a z pravé komory vychází kmen plicnice. Horní a dolní dutá žíla vstupují do pravé síně a plicní žíly vedou do levé síně. Srdeční svalovina je specializovaným typem svalové tkáně, která se skládá z buněk vřetenovitého tvaru – kardiomyocytů.

4.4.2.1 ONEMOCNĚNÍ, LÉČBA, REGENERACE A TRANSPLANTACE SRDCE

Mezi nejčastější onemocnění srdce patří infarkt myokardu a selhání srdce (Obr. 53). Infarkt myokardu je způsoben blokací či uzavřením koronární artérie. Následně dochází



Obr. 53 Infarkt myokardu

(na základě zdroje: <https://eforms.zpmvcr.cz/jforum/posts/list/75.page>)

k nevratnému poškození srdeční tkáně – nekróze kardiomyocytů a poté k fibróze myokardu. Proces nepříznivých změn se nazývá remodelace levé komory, během níž se ztenčuje srdeční stěna a dochází k snížení funkce srdce, což může vést k jeho selhání a úmrtí pacienta.

Poškozené kardiomyocyty nelze zcela regenerovat klasickými metodami a pomocí farmakologické terapie je možno ovlivnit pouze funkční srdeční tkáň. Prozatím je jedinou možnou léčbou srdečního selhání v pokročilém stádiu transplantace srdce, bohužel vhodných dárců je velmi málo.

Jednou z možností léčby poškozeného myokardu je využití celulární terapie –

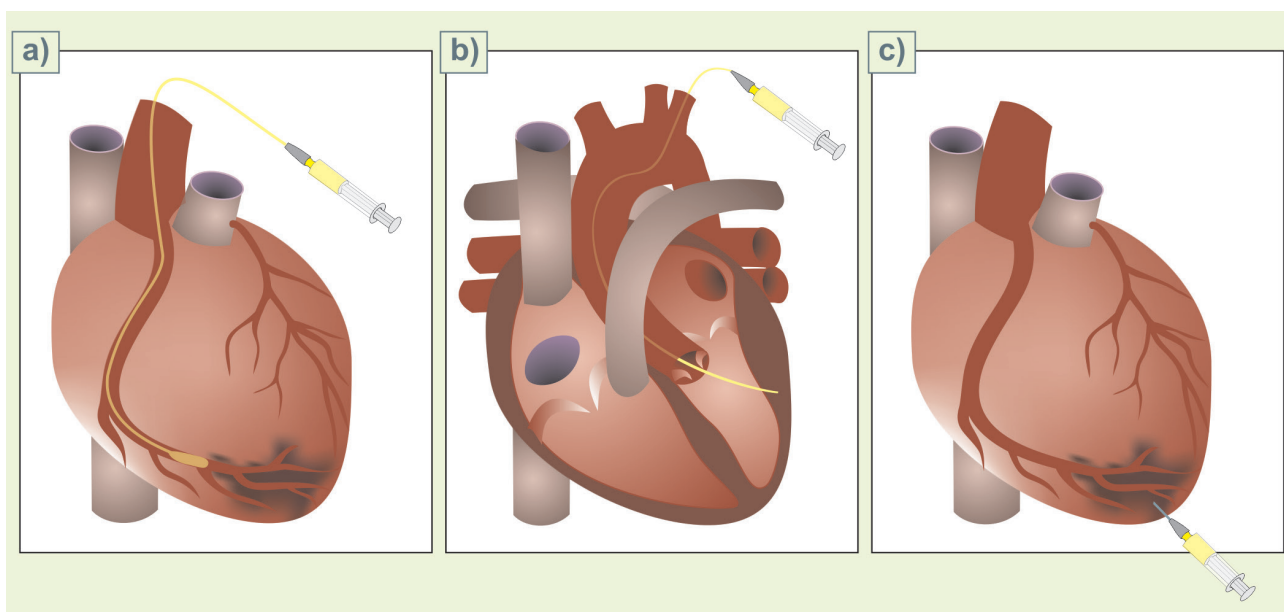
kmenových buněk, ale prozatím nejsou výsledky přesvědčivé natolik, aby se metody využívaly v klinických aplikacích.

Z tohoto důvodu se rozvíjí výzkum zaměřený na regeneraci myokardu využívající poznatky z oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Cílem je vyvinout vhodný materiál (scaffold), jenž by po aplikaci sloužil jako strukturní podpora ischemického srdce, a také jako nosič buněk či růstových faktorů pro regeneraci myokardu.

V mnoha ohledech by mohlo být vhodné využít hydrogely sítujících in vivo. Po nadávkování materiálu do srdeční stěny by mělo dojít ihned k tvorbě hydrogelu, jenž by

tak vytvářel strukturní podporu, a dále by sloužil jako scaffold pro buněčnou infiltraci. Doposud bylo testováno velké množství syntetických i přírodních materiálů in vivo na malých zvířecích modelech a o poznání méně bylo provedeno pokusů u větších zvířat. Mezi materiály studované pro tento účel patří alginát, chitosan, kolagen, decelurizované tkáně, fibrin, hyaluronová kyselina, keratin, Matrigel a syntetické polymery jako jsou např. polyethylenglykol (PEG) nebo termoresponsivní poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm).

Velmi důležitým aspektem je také způsob aplikace daného materiálu do tkáně. Cílem je nalézt metodu, která by byla minimálně invazivní. Pro tento záměr může být vhodná metoda aplikace injekčně. Proto se vývoj zaměřil především na vyvinutí hydrogelů gelujících in vivo až po aplikaci do místa defektu. Pro injekci biomateriálů do srdeční stěny existuje vícero možných metod (Obr. 54). Jednou z nich je intrakoronární aplikace za použití katetru. Další metodou je transendokardiální injekce do oblasti (levé komory) zasažené po infarktu myokardu pomocí katetru. Poslední uvedenou aplikací materiálu do srdce je přímá epikardiální injekce do srdce. Tato metoda má výhodu v kontrolovatelné aplikaci na požadované místo, na druhou stranu vyžaduje invazivní chirurgický zákrok.



Obr. 54 Metody aplikace hydrogelů síťujících in situ do srdce: a) intrakoronární aplikace b) transendokardiální injekce c) přímá epikardiální injekce⁹

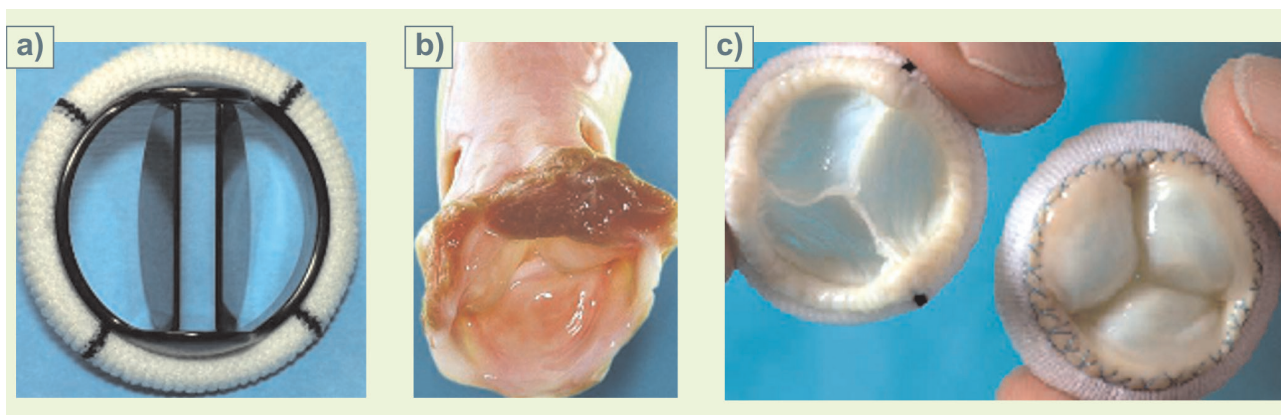
⁹Na základě zdroje: Johnson, T., Christman, K. L. *Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. Expert Opinion on Drug Delivery [online]. 2013, vol. 10, issue 1, s. 59-72 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1517/17425247.2013.739156.*

4.4.3 SRDEČNÍ CHLOPNĚ

Poslední uvedenou částí kardiovaskulárního systému jsou srdeční chlopně. Jedná se o párové vláknité struktury v srdci, které vznikají z endokardu (nitroblána srdeční) a napomáhají jednosměrnému toku krve. V lidském srdci se nachází 4 chlopně: dvě poloměsíčitě a dvě atrioventrikulární (cípaté). Poloměsíčitě chlopně zahrnují strukturně podobné aortální a pulmorální (plicní) chlopně, přičemž mezi atrioventrikulární chlopně patří pravá trojcípá a levá dvojcípá (mitrální). Cípaté chlopně se nachází mezi síněmi a komorami, kdežto poloměsíčitě u výstupu z aorty a plicnice ze srdce, odkud pochází také jejich název. Při systole je chlopeň otevřená, kdežto při diastole uzavřená.

Pokud není chlopeň vážně poškozená, je možné ji upravit plastikou. Zúženou chlopeň lze rozšířit nebo posílit pomocí umělého materiálu. Bohužel při vážném poškození musí být chlopeň nahrazena.

Doposud lze srdeční chlopně nahradit dvěma způsoby: implantací chlopně mechanické či biologické tvořené biologickou tkání (Obr. 55), která je odebrána nejčastěji z jiného živočišného druhu (xenograft implantovaný jako tzv. bioprotéza), dále pak z lidského těla (homograft, alograft) a velmi zřídka z těla pacienta (autograft).



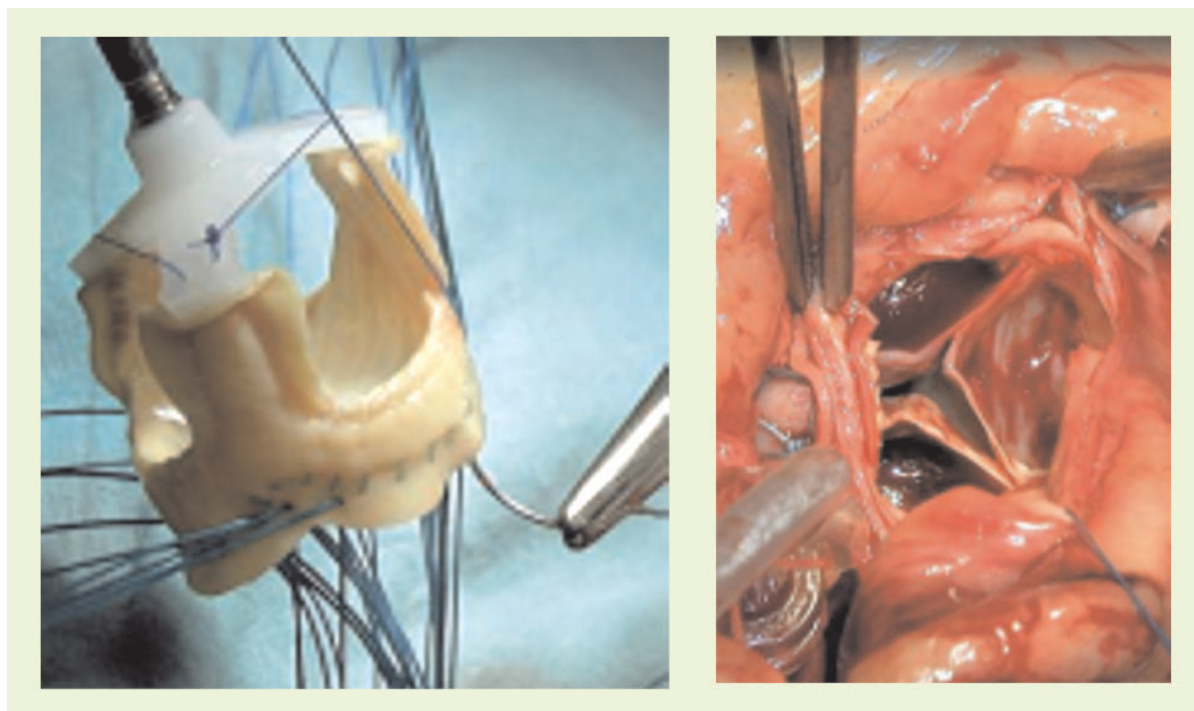
Obr. 55 Náhrady srdečních chlopní: A mechanická chlopeň – dvoulistá St. Jude Medical
B alograft (homograft) připravený k implantaci jako kořen¹⁰ C prasečí aortální chlopeň ¹¹

¹⁰Dominik, J., Žáček, P. *Chirurgie srdečních chlopní: (...nejen pro kardiochirurgy) ve 200 vyobrazeních [online]. Praha: Grada Publishing a.s., 2009, s. 42-79 [cit. 2014-11-26]. ISBN 8024763869.*

¹¹Dominik, J. *Mechanické srdeční chlopně. Interní medicína pro praxi [online]. 2006, č. 12, s. 531-533 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: www.internimedicina.cz*

¹²Dominik, J. *Mechanické srdeční chlopně. Interní medicína pro praxi [online]. 2006, č. 12, s. 531-533 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: www.internimedicina.cz*

Chlopeň z biologického materiálu bývá všita do kostry bioprotézy, která je opletena teflonem nebo polypropylenem, jak je vidět na obrázku Obr. 55 c). Vlastní biologická chlopeň v bioprotézách je tvořena prasečí aortální chlopní nebo chlopní získanou z hovězího perikardu. Také se připravují xenografty bez kostry a našivacího prstence tzv. stentless bioprotézy (Obr. 56), které lze implantovat do aortálních ústí.



Obr. 56 Stentless bioprotéza¹²

Volba typu srdeční chlopně závisí na věku a stavu pacienta a jeho reakci na antikoagulační léčbu. Výhodou biologických srdečních chlopní je minimální riziko vzniku krevní sraženiny či krvácení. Bioprotézy jsou doporučovány pacientům starších 65 let bez rizikových faktorů tromboembolizace, pro nemocné s kontraindikací antikoagulační léčby. Bohužel tyto chlopně nemají dostatečnou stabilitu v závislosti na věku pacienta – u dětí a mladších dospělých degradace probíhá velmi rychle v řádu několika let, a proto je po čase nutná další náročná operace. U pacientů starších 60 let je degradace pomalejší (do 15 let) a u pacientů nad 70 let je tato metoda preferována. Tyto transplantáty jsou také vhodné pro pacienty s kratší životní prognózou. Naproti tomu chlopně mechanické jsou trvalé s neomezeně dlouhou funkcí bez poruch. Nevýhodou je však nutnost antikoagulační léčby.

Jednou z alternativ do budoucna je zaměření se na vývoj nové generace umělých biologických srdečních chlopní. Cílem by bylo vytvořit bioprotézu s listy biologické chlopně, u které by nedocházelo k rozvoji degenerativních změn.

4.5 VYLUČOVACÍ SYSTÉM

Vylučovací systém je důležitou orgánovou soustavou, která zajišťuje vylučování odpadních látek z těla. Jeho primární úlohou je udržení homeostázy organismu. Skládá se z ledvin a vývodných močových cest, kde patří i močový měchýř.

V současné době čeká na transplantaci ledvin mnoho lidí, kteří jsou odkázáni na hemodialýzu. Hemodialýza je jednou ze tří možných náhrad funkce ledvin. Dalšími dvěma jsou transplantace ledvin a peritoneální dialýza. Bohužel vhodných dárců ledvin je málo. Obvykle je pacientem dobře snášena ledvina získaná od geneticky příbuzného člena rodiny. Tento zákrok je ale bohužel náročný i pro dárce orgánu a plynou z něj omezení na celý život.

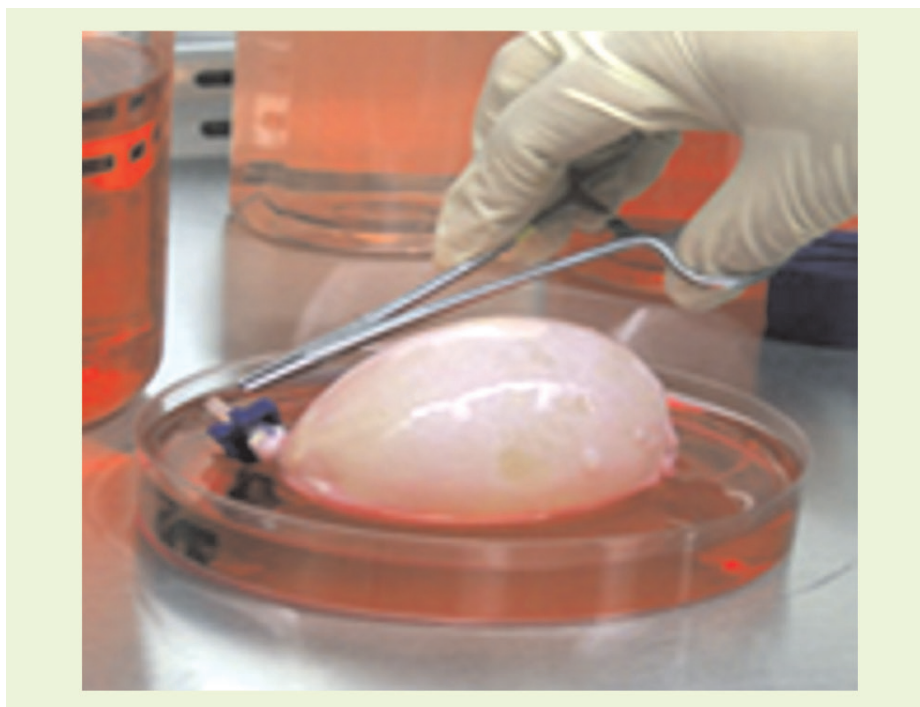
Řešením by mohla být příprava umělé náhrady ledvin. Cíl není jednoduchý, připravený graft musí mít podobnou strukturu jako ledviny, což není jednoduché, protože tento párový orgán uložený při zadní břišní stěně je velmi složitý. Jeho základní anatomickou a funkční jednotkou je nefron, který se skládá z ledvinového tělíska, proximálního kanálku, Henleovy kličky, distálního a sběracího kanálku. Velmi problematická při tvorbě umělé náhrady je zachování funkce ledvin, důležitá je perfuze, filtrace, sekrece, absorpce a odvod moči.

V jedné ze studií byly odebrány ledviny u pokusných zvířat krysy a decelurizovány. Vzniklý scaffold byl osazen epiteliálními a endoteliálními buňkami v bioreaktoru. Výsledné štěpy vyráběly moč in vitro. Po transplantaci u potkanů byla moč vytvářena a vedena přes močovod také in vivo. V jiné studii byly jako pokusné zvířata zvoleny opice. Byly připraveny decelurizované ledviny se strukturou a funkčními vlastnostmi nezbytnými pro využití jako 3D scaffold pro následné osazení buňkami. Bohužel je doposud vytvoření těchto materiálů většinou pouze ve fázi preklinického testování. Další možností je opět využití metody 3D tisku, kterou by mohl být připraven biomateriál obsahující ledvinové buňky.

Co se týká močového měchýře, tak náhrada tohoto orgánu není jednoduchá – jedná se o dutý tenkostěnný orgán, jehož svalová vrstva je velmi silná, dokáže se obdivuhodně roztáhnout, přitom během tohoto procesu nevznikne v jeho vnitřní výstelce místo, kterou by agresivní moč pronikla do stěny měchýře. Obecně funguje močový měchýř jako rezervoár moči přiváděné stahy močovodů.

Pro zajištění obnovy funkce močového měchýře existují dvě metody: první možností je přeměrování toku moči, druhou je náhrada močového měchýře uměle připraveným orgánem.

Pacienti s onemocněním močového měchýře mohou být léčeni metodou cystoplastiky pomocí segmentů trávicí soustavy. Bohužel přítomnost těchto segmentů v močovém měchýři způsobuje řadu komplikací. Řešením by mohl být uměle připravený močový měchýř (Obr. 57). Základem je scaffold na bázi kolagenu a polyglykolové kyseliny osazený buňkami hladké svaloviny a buňkami výstelky močového měchýře.



Obr. 57 Močový měchýř připravený in vitro¹³

4.6 REGENERACE A TRANSPLANTACE JATER

Játra jsou známá svou vysokou regenerační schopností a jsou schopna se při akutním poškození zhojit plně a bez následků. Bohužel při chronickém, dlouhotrvajícím poškození jater může dojít ke zmnožení vaziva, fibróze a k nevratné náhradě jaterní tkáně tuhou vazivovou tkání – onemocnění je nazýváno cirhóza jater. Nejlepší metodou léčby tohoto onemocnění je prevence, jelikož ve většině případů je cirhóza způsobena nadměrnou konzumací alkoholu. Prozatím existuje pouze jediná léčba tohoto onemocnění a to transplantace jater. Obdobně jako u transplantace jiných orgánů, je velmi málo vhodných dárců. Z tohoto důvodu se rozvíjí další možnosti regenerace a příprava nové funkční jaterní tkáně. Cílem je připravit vhodný scaffold osazený buňkami např. lidskými jaterními buňkami. Jako možný materiál pro přípravu scaffoldu mohou sloužit biodegradabilní polymery. Z materiálů přírodního původu lze využít kolagen, fibronectin, želatinu či matrigel. Tyto přírodní polymery jsou vhodné pro proliferaci buněk, na druhou stranu scaffoldy připravené pouze z těchto materiálů se vyznačují nedostatečnými

¹³Atala, A. et al. *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. *The Lancet* [online]. 2006, vol. 367, issue 9518, s. 1241-1246 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68438-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606684389>

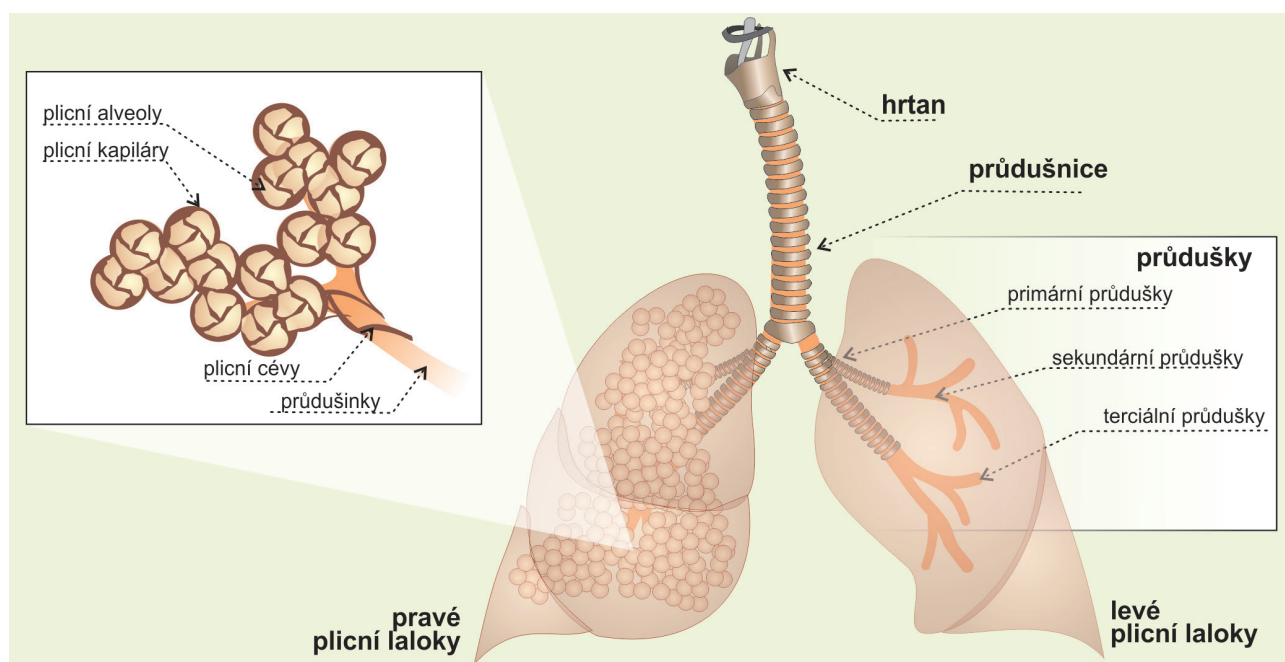
mechanickými vlastnostmi. Ty lze lépe regulovat využitím syntetických polymerů, u nichž lze řídit také porozitu vzniklého scaffoldu a rychlost degradace. Mezi využívané syntetické polymery patří především polyestery – polyglykolová (PGA) a polymléčná kyselina (PLA) a jejich kopolymery (PLGA) a polykaprolakton (PCL). V optimálním případě by se při postupné degradaci scaffoldu vytvářela nová tkáň. V nedávném výzkumu byla úspěšně vyvinuta miniaturní játra, jejichž funkce odpovídala lidským, prozatím za laboratorních podmínek. Pro jejich přípravu byly také použity lidské jaterní buňky. Dalším důležitým krokem je vyzkoušení jejich funkčnosti po transplantaci u zvířecích modelů. Připravená játra by mohla být také použita pro testování bezpečnosti nových léčiv.

4.7 DÝCHACÍ SYSTÉM

Dýchací systém se podílí na plicní ventilaci a difúzi plynů mezi plicními váčky a krví. Respirační cyklus ještě zahrnuje transport plynů, při kterém probíhá výměna mezi krví a tkáněmi. Celý respirační cyklus je výsledkem součinnosti především dvou systémů – oběhového a dýchacího. K dýchací soustavě patří také dýchací cesty (dutina nosní, nosohltan, hrtan, průdušnice, průdušky, plíce a průdušinky). Dýchací systém má velkou schopnost reagovat na poranění a regenerovat poškozené buňky, ale samozřejmě jen do jisté míry, např. regenerace plic a jejich náhrada je problematická, jelikož se jedná o velmi složitý komplexní orgán.

4.7.1 PLÍCE A TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ PLIC

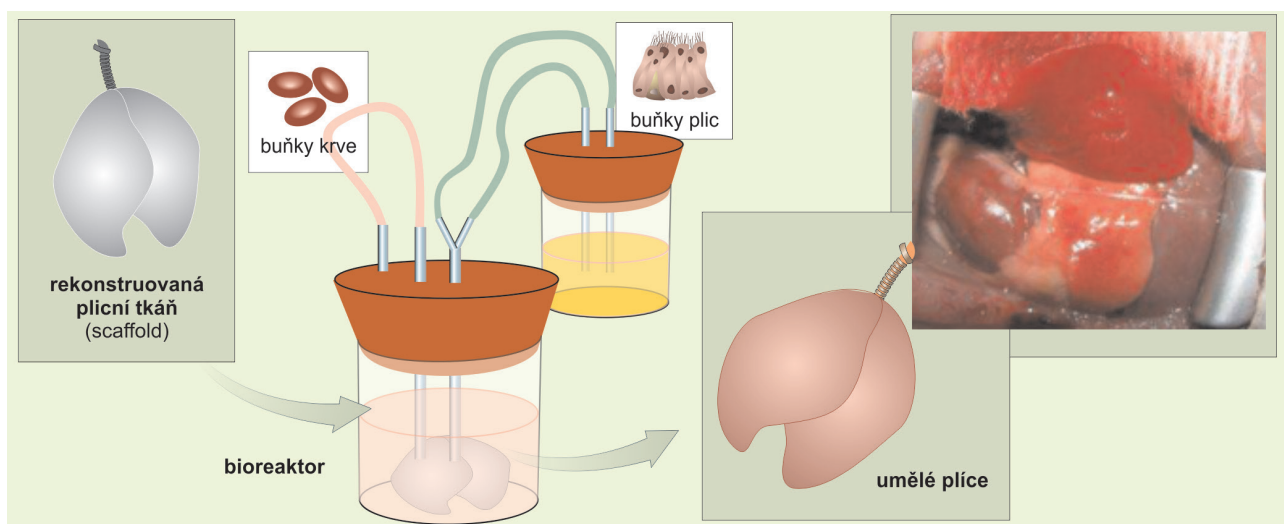
U tohoto párového orgánu je pravá plíce větší než levá a celková velikost plic závisí na velikosti hrudníku. Plíce (Obr. 58) se skládají z laloků, které se dále člení na menší úseky – plicní segmenty, které jsou základními stavebními i funkčními jednotkami plic. Plíce jsou tvořeny větvími se průduškami, které vytváří tzv. bronchiální kmen, jenž se postupně větví. Difúze plynů probíhá mezi plicními váčky a krví. Stěna alveolů je tvořena respiračním epitelem, jehož buňky se nazývají pneumocyty – jejich počet v plíci je přibližně $1,28 \cdot 10^{15}$. Vazivová tkáň obsažená v plicích spojuje jednotlivé větve bronchiálního kmene a vytváří pružný a elastický plicní skelet. Dýchání je řízeno z dýchacího centra v prodloužené míše.



Obr. 58 Struktura plic

(na základě zdroje: <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Lung>)

Tkáňové inženýrství má velký potenciál při vývoji nových možností pro regeneraci plic postižených např. chronickým obstruktivním plicním onemocněním (často nazývaným „kuřácké astma“), plicní fibrózou, cystickou fibrózou či plicní hypertenzí. Doposud jsou léčeny tyto nemoci medikamenty či transplantací plic. Bohužel dárců plic vhodných pro transplantaci je velmi málo. Řešením je vytvoření TE plic – na obrázku (Obr. 59) je znázorněno schéma možné přípravy plic in vitro. V prvním kroku se u plic dárce provede decelurizace. Zůstane pouze tkáňový scaffold, který může být osazen buňkami. Kultivace probíhá v bioreaktoru, kde dochází k vpravení buněk přes průdušku pro obnovu epitelu plicních sklípků. Vhodným typem buněk jsou indukované pluripotentní buňky (iPS) odvozené z vlastních buněk pacienta. V jedné ze studií bylo testování provedeno na zvířecích modelech potkanů, kdy se po 8 dnech nově osazené plíce buňkami transplantovaly příjemci. Na obrázku 59 vpravo je znázorněna zrekonstruovaná plicní tkáň (levý lalok) – snímek pořízen 30 minut po implantaci dospělému potkanovi.



Obr. 59 Znárodněno schéma přípravy náhrady plic pro následnou implantaci. Vpravo je ukázaná zrekonstruovaná plicní tkáň dospělého potkana, snímek pořízený po 30 minutách po implantaci¹⁴

4.7.2 PRŮDUŠNICE, PRŮDUŠKY

Na rozdíl od TE plic je náhrada průdušnice (trachey) již v klinické praxi. Tato 12–13 cm dlouhá trubice je součástí dolních dýchacích cest, navazuje na chrupavku hrtanu a končí větvením na pravou a levou průdušku (bronchus). Stěna průdušnice je tvořena hyalinní chrupavkou.

4.7.2.1 BIOLOGICKÉ A UMĚLÉ NÁHRADY

Větší tracheální defekty je nutno řešit transplantací. Jsou využívány průdušnice od dárců jako alotransplantáty či lze využít umělých náhrad. První alogenní transplantace průdušnice byla provedena v roce 1979. Dalším milníkem byla transplantace kompletní průdušnice od mrtvého dárce dítěti postiženého rozsáhlým vrozeným zúžením.

¹⁴Lung regeneration [online]. [cit. 2014-12-18]. Dostupné z: <http://www.mayo.edu/research/centers-programs/center-regenerative-medicine/focus-areas/lung-regeneration>

Alotransplantace tracheálního segmentu může přinést řešení pacientům s patologickým zúžením či zhoršením průchodnosti průdušnice. Jako scaffold lze použít decelularizovaná trachea dárce (kadaverózní). Opětovné osazení buňkami obvykle probíhá v bioreaktoru, ale také je možné využít jinou metodu, kdy je decelularizovaná trachea vsita pod kůži pacienta, kde tak dochází k jejímu osazení buňkami pacienta a až poté je transplantována pacientovi jako náhrada průdušnice. V jednom z případů byla decelularizovaná trachea vsita pacientce prvně do předloktí, kde asi po 4 měsících došlo k plnému pokrytí trachey sliznicí pacientky. Po transplantaci byla nová trachea prakticky neodlišitelná od původní tkáně a došlo k rehabilitaci dýchacích cest. Dalším příkladem transplantace trachey pomocí tkáňového inženýrství je případ z roku 2008, kdy byla získaná trachea použita k náhradě levé hlavní průdušky. Scaffold byl osazen epitelovými buňkami a chondrocyty, přičemž kultivace probíhala v bioreaktoru. Transplantace byla úspěšná, kdy nenastala imunitní reakce systému, došlo také k obnově jemné cévní pleteně a funkce plic se vrátila k normálu. Po 12 měsících po transplantaci bylo zjištěno, že transplantovaná trachea zůstala otevřená po celé její délce, byla dobře vaskularizovaná a osazená buňkami epitelu.

Využití alotransplantátů však není vždy možné, tato metoda se potýká s problémem nedostatku dárců a to především u dětí. Řešením by mohla být transplantace za použití



Obr. 60 Uměle vytvořená průdušnice
Výše zmíněné metody a možnosti transplantace mají své výhody a nevýhody. Jejich použití v klinické praxi záleží na konkrétním případě.

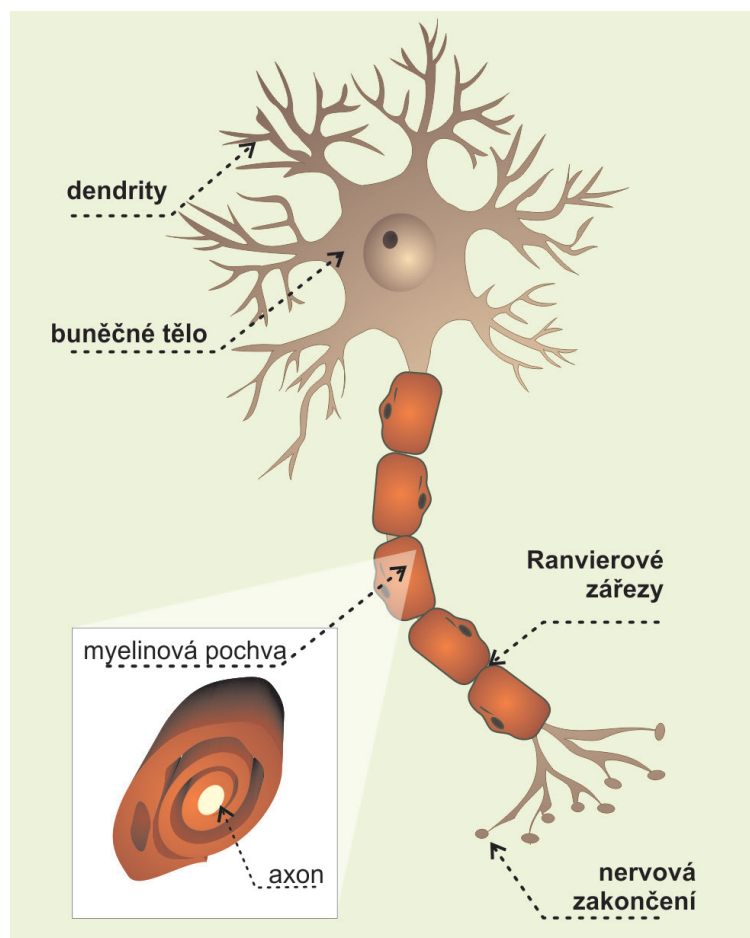
umělých náhrad (Obr. 60). Výhodou těchto transplantátů je jejich možná příprava na míru pacientovy původní průdušnice během několika dní. První transplantace uměle připravené náhrady proběhla v roce 2011 u muže s tracheální rakovinou. 3Dstruktura scaffoldu byla vytvořena do tvaru pacientovy průdušnice z nanokompozitního biomateriálu, jenž byl povrchově upraven biokompatibilní vrstvou pro zlepšení integrace implantátu do okolní tkáně. Poté byl tento konstrukt umístěn do bioreaktoru s kmenovými buňkami získanými z pacientovy kostní dřeně, které byly upraveny tak, aby se diferencovaly do fenotypu buněk tkáně průdušnice. Po dvou dnech byla struktura pokryta nově obrostlou tkání a připravena k transplantaci.

¹⁵In Medical First Doctors Implant Lab Grown Synthetic Trachea Into Patient. Singularity HUB [online]. 2011 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: <http://singularityhub.com/2011/07/09/in-medical-first-doctors-implant-lab-grown-synthetic-trachea-into-patient/>

4.8 NERVOVÝ SYSTÉM

Nervový systém u savců lze rozdělit do dvou hlavních částí: periferní nervový systém (PNS) a centrální nervový systém (CNS). PNS, skládající se z kraniálních a spinálních nervů a jejich asociovaných ganglií, má velkou schopnost opravy a regenerace. Periferní nervy jsou svazky nervových vláken – výběžky buněk míchy, mozkového kmene a buněk spinálních ganglií. Periferní nerv poskytuje funkční a anatomické spojení míchy resp. mozku s periferními tkáněmi. Řídící částí nervového systému je mozek a mícha, které tvoří centrální nervový systém. Regenerace centrálního nervového systému je však značně omezená.

Základní anatomickou funkční jednotkou nervové tkáně je neuron, jehož stavba je znázorněna na obrázku (Obr. 61). Skládá se z buněčného těla, z něhož vystupují dlouhé (axony) a krátké výběžky (dendrity). Na povrchu axonů se nachází dvojitá pochva – vnitřní (myelinová) a vnější (Schwannova) pochva. Vedení vzruchů je ovlivněno silou vláken a myelinových pochev – silnější vlákna vedou vzruchy rychleji.



Obr. 61 Stavba neuronu

(na základě zdroje: <http://hubpages.com/hub/Structure-of-a-Neuron>)

4.8.1 REGENERACE PERIFERNÍHO A CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

Z obecného hlediska jsou periferní nervy schopny značných regeneračních procesů. Na druhou stranu regenerace nervu po stránce anatomické neznamená obnovu funkční a u rozsáhlejších poranění není nikdy úplná. Také je důležité si uvědomit, že nervová vlákna v CNS neregenerují.

Poraněním periferních nervů rozumíme poruchu funkce (motorické, senzitivní či autonomní) v inervační oblasti periferního nervu, vzniklou následkem úrazu. Nervové buňky s přerušným axonem jsou schopny regenerovat, jen pokud není přerušena kontinuita Schwannovy pochvy nervu. V opačném případě se během 24 hodin distální (krajní) úsek vlákna rozpadá na drobné úseky, které jsou postupně fagocytovány. Vlákno (výběžek neuronu) případně celý nerv jsou pro vedení vzruchu ztraceny. Pokud je to možné, je vhodné nerv spojit – sešít. Důležitá je bezjizvá regenerace kvůli vedení vzruchů (elektrická konektivita). Periferní nervy lze rekonstruovat pomocí graftů, které mohou být autologního, alogenního či xenogenního původu. Autologní nervový segment je odebrán z jiné části a vpraven do poškozeného místa (vytvořená mezera mezi částmi axonu), kde tvoří kanálek pro regeneraci axonu. Alografty a xenografty jsou získávány od dárců či jsou zvířecího původu. Tento původ je jejich nevýhodou, jelikož po implantaci dochází většinou k imunitní reakci pacienta a je nutná imunosupresivní léčba.

Metodou regenerace nervů pomocí alogenních, autologních či xenogenních graftů bohužel není obvykle dosažena úplná obnova funkce nervů a získání vhodné náhrady je značně komplikované. Z těchto důvodů se v poslední době výzkum a vývoj zaměřuje na možnost přípravy umělého graftu. Vhodné je využití 3D porézních nebo vlákněných scaffoldů pro růst buněk. Orientace pórů, popř. vláken, nesmí být náhodná, ale velmi specificky orientovaná, jelikož neurony rostou v daném směru. Pro přípravu scaffoldů jsou využívány syntetické a biologické materiály. Mezi používané syntetické materiály patří polymléčná a polyglykolová kyselina a jejich kopolymery, vstřebatelné poly(α -hydroxy) kyseliny a polyfosfoestery, dále dextran, a polyetylglykol. Jsou zkoumány také materiály na bázi kyseliny sialové a biodegradabilní elastomer polyglycerol sebakát. Z přírodních materiálů je využíván kolagen, dále kyselina hyaluronová, alginát nebo např. pavoučí hedvábí, které podporuje buněčnou adhezi a proliferaci. Také je využíván chitosan a scaffoldy na bázi aragonitu, které dle posledních studií také podporují růst neuronů. Výběr vhodného buněčného typu je důležitý. Nervový systém obsahuje mnoho buněčných typů, které podporují růst neuronů. Tyto buňky jsou souhrnně

nazývány gliové buňky. Je u nich zkoumán mechanismus jejich schopnosti podporovat regeneraci neuronů. Především je výzkum zaměřen na Schwannovy buňky, astrocyty a čichové buňky. Kromě gliových buněk se v oblasti výzkumu využívají kmenové buňky, které jsou schopny se diferenciovat do neuronů či gangliových buněk.

V rámci *in vitro* studií jsou připravovány porézní polymerní nanovláknenné scaffoldy za použití biodegradabilní kyseliny polymléčné pro *in vitro* kultivace nervových kmenových buněk (NSCs). Dále mohou ovlivňovat růst nervových vláken nebo rychlost jejich růstu hydrogely na bázi poly(2-hydroxyethyl metakrylátu). Ve studiích *in vitro* je zkoumán vliv tohoto materiálu na adhezi a elongaci axonu neuronu.

Pro regeneraci periferních nervů je možné např. použít scaffoldy připravené z biodegradabilního polymeru na bázi kolagenu zlepšující adhezi a viabilitu neuronů. Scaffold obsahuje multikanálky s větší plochou, jež umožňuje rozpínajícím se axonům lépe adherovat a usnadňuje jejich prodlužování. V preklinické studii byl materiál osazen dospělými kmenovými buňkami a po jeho implantaci došlo u zkoumaných krysk k částečné regeneraci mobility zadních nohou.

Mnoho dalších studií se zabývá vytvořením nervových vodících trubiček např. na bázi chitinu či chitosanu. Bylo zjištěno, že chitosanové trubičky jsou mechanicky pevnější v porovnání s chitinovými. Dle studie chitin i chitosan podporují adhezi a diferenciaci primárních gangliových neuronů *in vitro* získaných od kuřat. Adheze buněk a rozšiřování neuritů lze upravit obsahem aminů. Nervové vodící trubičky lze také připravit na bázi chitosanu a polyesteru. Hybridní vlákna kombinují dobrou biologickou kvalitu materiálu a mechanickou pevnost syntetického polymeru.

4.8.2 MÍCHA

Hřbetní mícha je předozadně zploštělý válcovitý provazec o celkové délce 40–50 cm. Je uložena v durálním míšním vaku uvnitř páteřního kanálu. Hřbetní mícha je členěna na míšní segmenty. Bílou hmotu míšní tvoří vlákna nervových buněk a šedou hmotu míšní tvoří těla nervových buněk. Mícha je tvořena axony prvního neuronu bez schopnosti regenerace, míšní kořeny jsou tvořeny axony druhého neuronu, jenž má schopnost regenerace. Na zadních míšních kořenech se nachází spinální ganglion. Základem arteriálního zásobení míchy jsou tři míšní tepny.

4.8.2.1 DEGENERACE A REGENERACE MÍCHY

Poranění páteře zahrnuje různé typy úrazů, od nekomplikovaných distorzí přes relativně nezávažné zlomeniny až po těžká poranění s postižením obratlů, meziobratlových disků a vazivového aparátu. Nejčastějším poraněním páteře je distorze krční páteře. V důsledku omezené schopnosti regenerace přerušovaných axonů v oblasti léze dochází k nevratné ztrátě motorických a senzorických funkcí.

V současné době neexistuje účinná léčba terapie míšního poranění, proto se mnoho vědeckých pracovišť zabývá výzkumem v této oblasti. Jednou z možností je využití kmenových buněk. V poslední době se rozvíjí také výzkum související s pluripotentními kmenovými buňkami a využití buněčné terapie, která by mohla pomoci pacientům třeba po mozkové mrtvici.

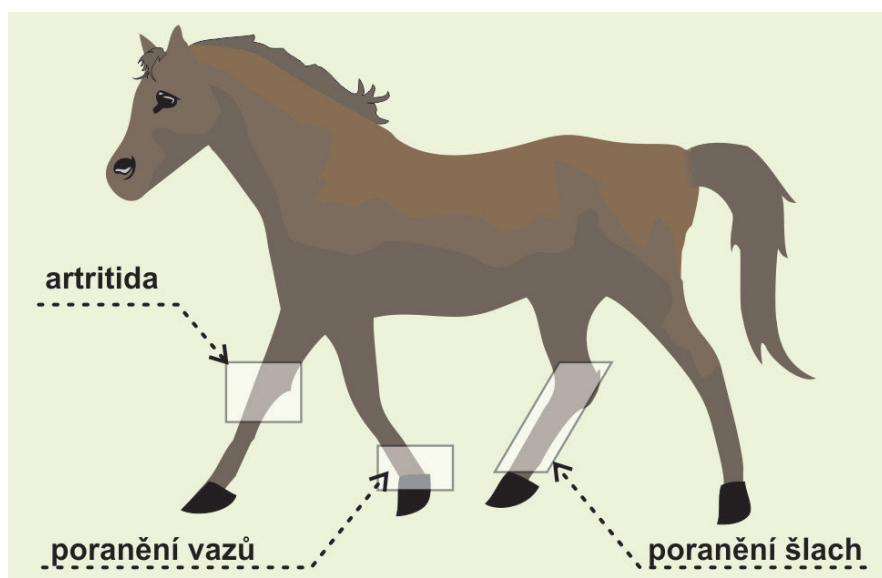
Tkáňové inženýrství by mohlo být vhodným řešením regenerace míchy, kde by biomateriály sloužily jako nosiče kmenových buněk. Mezi materiály by se mohly uplatnit hydrogely či vlákenné scaffoldy. Výhodou těchto materiálů je jejich biokompatibilita, mechanické vlastnosti podobné přirozené mezibuněčné hmotě, strukturní variabilita a u hydrogelů schopnost zcela vyplnit defekt. Mezi slibné materiály pro přípravu scaffoldů v této oblasti tkáňového inženýrství patří např. kyselina polymléčná, polyglykolová a jejich kopolymery, dále silikon, polyakrylonitril, polyvinylchlorid, polyfosfazany nebo kolagen a mnoho dalších.

4.9 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ VE VETERINÁRNÍ PRAXI

Ve většině případů jsou používány zvířecí modely při preklinických studiích, přičemž výsledky hrají důležitou roli pro následnou klinickou studii. V poslední době se s růstem zájmu o ochranu živočišných druhů a prohloubením vztahu mezi zvířetem a člověkem rozvíjí také výzkum léčby defektů a nemocí u zvířat pomocí tkáňového inženýrství. Především je zaměřena léčba na výstavní či závodní zvířata nebo ohrožené druhy.

V současnosti je regenerativní medicína orientována na onemocnění pohybového aparátu především koní a psů. Předmětem studia jsou degenerativní onemocnění kloubů, šlach a kosterní vady (zlomeniny, implantáty či vývojové poruchy) (Obr. 62). V nejpokročilejším stádiu je léčba poranění šlach koní, které se vyskytuje především u závodních koní spojené s celkovým zatížením kloubů, šlach a vazů během náročného výcviku a závodů a také souvisí se stárnutím zvířete. Většina terapií nevede k úplné regeneraci šlach, vytváří se jizvy, které výrazně snižují jejich pružnost. Klinické studie

ukazují slibné výsledky regenerace za využití mezenchymálních stromálních buněk (MSC). Jejich aplikace vede k vytvoření tkáně více podobné té původní, fibrózní jizva oslabující šlachy je méně znatelná v porovnání s přirozenou regenerací bez MSC. Jednou z možností regenerace vazů či šlach u lidí ale i koní je využití scaffoldů např. na bázi biopolymeru elastinu, jelikož je přirozenou součástí ECM a vyskytuje se převážně v elastických tkáních, jako jsou právě cévy, vazy, kůže a šlachy.



Obr. 62 Nejčastější oblasti poranění u závodních koní (artritida, výron vazů a poranění šlach) (na základě zdroje: <http://www.vetmed.vt.edu/emc/clinicalservices/regenmed.asp>)

Další technikou běžně používanou ve veterinární regenerativní medicíně je aplikace PRP (Plazma bohatá na destičky). Je využívána k hojení ran či při regeneraci kostních defektů. K léčbě degenerativního onemocnění kloubů u koní a psů lze využít také autologní sérum s analgetickým a protizánětlivým účinkem.

Dále se rozvíjí výzkum v oblasti náhrady kloubní chrupavky u koní. K regeneraci se používají scaffoldy připravené např. z polyglaktinu a polydioxanonu a mnoho dalších. Prvně se provádí biopsie s odběrem autologní chrupavky kolenního kloubu koně v místě, které není příliš zatíženo pohybem. Poté je vytvořen defekt v kloubní chrupavce a následně provedena transplantace připraveného scaffoldu s autologními chondrocyty.

Kromě závodních koní a psů bylo v jednom z výzkumů využito nejnovějších pokroků regenerativní medicíny ve snaze regenerovat poškozenou hřbetní ploutev u delfína skákavého. Hřbetní ploutev delfína se skládá z měkké chrupavčité tkáně a v tomto případě byla nahrazena scaffoldem obsahující růstové faktory a další biologicky aktivní látky. Do implantovaného scaffoldu časem namigrovaly buňky, což dalo základ vytvoření nové tkáně. Jednalo se o vůbec prvního mořského savce, u kterého byla regenerována tkáň.

4.10 REFERENCE A POUŽITÉ ZKRATKY

1. Dylevský, I. Funkční anatomie; Grada Publishing a.s.: Praha, 2009
2. Little, Ch. J., Bawolin, N. K., Chen, X. Mechanical Properties of Natural Cartilage and Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2011, vol. 17, issue 4, s. 213-227 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1089/ten.teb.2010.0572.
3. Becerra, J.; Andrades, J. A.; Guerado, E., Yamora-navas, P., López-puertas, J. M., Reddi, A. H. Articular Cartilage: Structure and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2010, vol. 16, issue 6, s. 617-627 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1089/ten.teb.2010.0191. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2010.0191>
4. Chung, C., Burdick, J. A. Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, vol. 60, issue 2, s. 243-262 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X07002475>
5. Spiller, K. L., Maher, S. A., Lowman, A. M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2011, vol. 17, issue 4, s. 281-299 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0077. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X07002475>
6. Léčba vlastními kmenovými buňkami už není hudba budoucnosti. In: [online]. [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: <http://www.natic.cz>
7. Baroli, B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, vol. 98, issue 4, s. 1317-1375 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1002/jps.21528.
8. Fikai, A., Andronescu, E., Voicu, G., Fikai, D. Advances in Collagen/Hydroxyapatite Composite Materials. *Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology* [online]. InTech, 2011-04-01 [cit. 2014-11-26]. DOI: 10.5772/13707. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-composite-materials-for-medicine-and-nanotechnology/advances-in-collagen-hydroxyapatite-composite-materials>

9. Tissue engineering technique yields potential biological substitute for dental implants. [online]. 2010 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/05/100524111724.htm>
10. Meyer, U., Round, J. M. Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine: a textbook of muscle physiology [online]. Berlin: Springer, 2009, s. 245-250 [cit. 2014-11-18]. ISBN 3540777555-
11. Abu, Z., Taddese, A., Mohamed Alitheen, N. B., Mohamed, N. Skeletal Muscle Tissue Engineering Using Biological Scaffolds for Repair of Abdominal Wall Defects in a Rabbit Model. Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration [online]. InTech, 2011-08-17 [cit. 2014-12-18]. DOI: 10.5772/21544. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering-for-tissue-and-organ-regeneration/skeletal-muscle-tissue-engineering-using-biological-scaffolds-for-repair-of-abdominal-wall-defects-i>
12. Horch, R. E., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., Bach, A. D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. Journal of Cellular and Molecular Medicine [online]. 2005, vol. 9, issue 3, s. 592-608 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x>
13. Lee, V. et al. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. Tissue Engineering Part C: Methods [online]. 2014, vol. 20, issue 6, s. 473-484 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1089/ten.tec.2013.0335. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tec.2013.0335>
14. Edited by Pallua, N. Tissue engineering from lab to clinic [online]. Berlin: Springer, 2010, [cit. 2014-11-18]. ISBN 3642028241.
15. Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění [online]. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, s. 94-118 [cit. 2014-11-18]. ISBN 978-80-247-0607-8.
16. Atala, A., Lanza, R. Methods of tissue engineering [online]. 1. vyd. San Diego, CA: Academic Press, 2001, [cit. 2014-11-18]. ISBN 0124366368.
17. Johnson, T., Christman, K. L. Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. Expert Opinion on Drug Delivery [online]. 2013, vol. 10, issue 1, s. 59-72 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1517/17425247.2013.739156.

18. Klabusay, M., Skopalík, J., Meluzín, J. Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulární terapie poškozeného myokardu. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, roč. 11, č. 10, s. 452-457 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/artkey/int-200910-0005.php>
19. Dominik, J., Žáček, P. Chirurgie srdečních chlopní: (...nejen pro kardiochirurgy) ve 200 vyobrazeních [online]. Praha: Grada Publishing a.s., 2009, s. 42-79 [cit. 2014-11-26]. ISBN 8024763869.
20. Dominik, J. Mechanické srdeční chlopně. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2006, č. 12, s. 531-533 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: www.internimedicina.cz
21. Song, J. J. et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nature Medicine* [online]. 2013-4-14, vol. 19, issue 5, s. 646-651 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1038/nm.3154. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.3154>
22. Nakayama, K. H. et al. Decellularized Rhesus Monkey Kidney as a Three-Dimensional Scaffold for Renal Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A* [online]. 2010, vol. 16, issue 7, s. 2207-2216 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0602. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2009.0602>
23. Atala, A. et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The Lancet* [online]. 2006, vol. 367, issue 9518, s. 1241-1246 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68438-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606684389>
24. Lung regeneration [online]. [cit. 2014-12-18]. Dostupné z: <http://www.mayo.edu/research/centers-programs/center-regenerative-medicine/focus-areas/lung-regeneration>
25. Haag, J. C., Jungebluth, P., Macchiarini, P. Tracheal replacement for primary tracheal cancer: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Current Opinion in Otolaryngology* [online]. 2013, vol. 21, issue 2, s. 171-177 [cit. 2014-11-19]. DOI: 10.1097/MOO.0b013e32835e212b. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>

26. Delaere, P. et al. Tracheal Allotransplantation after Withdrawal of Immunosuppressive Therapy: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *New England Journal of Medicine* [online]. 2010-01-14, vol. 362, issue 2, s. 138-145 [cit. 2014-11-19]. DOI: 10.1056/NEJMoa0810653. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0810653>

27. Gonfiotti, A. et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *The Lancet* [online]. 2014, vol. 383, issue 9913, s. 238-244 [cit. 2014-11-19]. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62033-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613620334>

28. In Medical First Doctors Implant Lab Grown Synthetic Trachea Into Patient. *Singularity HUB* [online]. 2011 [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: <http://singularityhub.com/2011/07/09/in-medical-first-doctors-implant-lab-grown-synthetic-trachea-into-patient/>

29. Terrance, W. et al. Hydrogels for central nervous system regeneration: Surface modulus and microtopographical effects on neuronal cell behavior [online]. 2008, s. 34-37 [cit. 2014-11-20]. ISBN 0549746188.

30. Tissue Engineered Nerve Guide. In: *Excellence in Tissue Engineering* [online]. [cit. 2014-12-18]. Dostupné z: <http://www.mirm.pitt.edu/innovation/ete.asp>

31. Freier, T. et al. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* [online]. 2005, vol. 26, issue 22, s. 51-66 [cit. 2014-11-24]. DOI: 10.1016/b978-0-08-099939-5.00004-5.

32. Barnewitz, D. et al. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials* [online]. 2006, vol. 27, issue 14, s. 2882-2889 [cit. 2014-11-24]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.008.

33. Pioneer In Extracellular Matrix. In: *Excellence in Tissue Engineering* [online]. [cit. 2014-12-18]. Dostupné z: <http://www.mirm.pitt.edu/innovation/ete.asp>

Použité zkratky

ECM	Extracelulární matrix
HA	Kyselina hyaluronová
OA	Osteoartróza
PLA	Polymléčná kyselina
PGA	Polyglykolová kyselina
PLGA	Kopolymer polymléčné a polyglykolové kyseliny
GAGs	Sulfatované glukosaminoglykany
TGF	Transforming growth factor
FGF	Fibroblast growth factor – fibroblastový růstový faktor
BMP	Bone morphogenic protein – kostní morfogenetický protein
IGF1	Insulin-like growth factor – inzulínu podobné růstové faktory
MSCs	Mesenchymální kmenové buňky
HAP	Hydroxyapatit
TCP	Trikalcium fosfát
ECs	Endothelial cells – endoteliální buňky
SMCs	Smooth muscle cells – buňky hladkého svalstva
PET	Polyetylentereftalát
PTFE	Polytetrafluoroetylen
TEVG	Tissue engineering vascular graft – náhrady krevních cév
PHA	Polyhydroxyalkanoát
EPCs	Endoteliální progenitorové buňky
PEG	Polyethylenglykol
BMSCs	Bone marrow stromal cells – stromální buňky kostní dřeně
PNIPAAm	Poly(N-isopropylacrylamide)
PLGA	Polykaprolakton
PNS	Periferní nervový systém
CNS	Centrální nervový systém
NSCs	Neural stem cells – nervové kmenové buňky
PRP	Platelet-rich plasma, plazma bohatá na destičky
TGF	Transforming growth factor – transformující růstový faktor
IGF	Insuline...
TEVG	Tissue engineering...

Seznam doporučené literatury a odkazy na internetové zdroje

Meyer, U.; et al. Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 1st ed.; Springer: Berlin, 2009.

Atala, A.; et al. Foundations of Regenerative Medicine: Clinical and Therapeutic Applications, 1st ed.; Academic Press, 2009.

<http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering-for-tissue-and-organ-regeneration>

<http://www.intechopen.com/books/advances-in-regenerative-medicine>

KAPITOLA 5

OD VÝZKUMU DO PRAXE

Lucie Jurečková

Tak jak již bylo uvedeno, cílem tkáňového inženýrství je vytvořit produkt, který by byl vhodným spojením optimálního nosiče a buněk pro zvolenou aplikaci určenou pro regeneraci nebo opravu orgánů a tkání (kožní defekty – popáleniny, náhrada tracheální trubice, kloubní chondrální defekty, oční rohovkový epitel).

Nalezení vhodné kombinace nosiče a buněk je klíčové pro dosažení efektivních výsledků při regeneraci. Pro aplikaci jsou většinou vybírány biokompatibilní nosiče, které poskytují vhodné prostředí pro proliferaci buněk. Tyto nosiče mohou být uměle připravené z různých polymerů včetně nanovláknenných nosičů, ale mohou být také připraveny decelularizací tkáně. Složení a vlastnosti scaffoldů jsou velmi důležité. Jejich vlastnosti by měly být modelovány podle toho, k jakému účelu mají sloužit – jiné vlastnosti bude mít scaffold určený pro regeneraci kosti, chrupavky nebo trachey a jiný k léčbě kožních defektů nebo orgánů.

Regenerace různých typů tkání a orgánů za pomoci „živých graftů“ je v různých stádiích vývoje nebo klinického použití pro různé tkáně.

Výzkum a vývoj a testování spojený s novým produktem tkáňového inženýrství je do určité míry podobný vývoji nového léku. Ve srovnání s vývojem léku do procesu ale vstupuje více neznámých faktorů, spojených s vlastnostmi materiálu, scaffoldu a buněk a jejich působením v organismu, které je vhodné a žádoucí ověřit, než je přistoupeno k preklinickému testování. Vzhledem k tomu, že tkáňové inženýrství je stále relativně mladým oborem dostávajícím se pomalu do klinické praxe, je klinické hodnocení realizováno stejným způsobem jako pro režim léčiva.

5.1 VÝZKUM A VÝVOJ

Celkový vývoj a výzkum nového produktu tkáňového inženýrství je rozdělen na dvě části. Na jedné straně je žádoucí najít vhodný scaffold, na straně druhé je živá složka produktu, kterou jsou buňky. Obě složky by následně měly být vhodně skloubeny, tak aby byly ověřeny jejich regenerativní a reparativní vlastnosti a tím i zabezpečena efektivní léčba.

- Jaký typ buněk použít?
 - o **Typ buněk:** by měl být vybrán dle typu tkáně, která by měla být regenerovaná (chrupavka – chondrocyty, kůže – epidermis-keratinocyty, dermis – fibroblasty, atd.). Případně, použití kmenových buněk s nutností diferencovat do daného buněčného typu.
 - o **Použití autologních nebo alogenních buněk?** Cílová aplikace bude klinická, je tedy žádoucí, aby byly použity buňky, které jsou pacientovi vlastní (autologní). Může se stát, že použití autologních buněk nebude možné (zdravotní stav pacienta, příliš vysoká náročnost odběru vysokého počtu buněk, dlouhá kultivace atd.). Je proto možné použít alogenní buňky, ale je nutné mít na paměti, že musejí být vyšetřené, podrobně charakterizované a po aplikaci hrozí riziko odmítnutí štěpu organismem (alogenní buňky je možné aplikovat např. u regenerace popálené kůže, kde i aplikace alogenních buněk na nosiči vytvoří kryt rány a vhodné mikroprostředí pro regeneraci, ale následně dochází k odhojení).
 - o **Liniové/ primokultivované buňky** – při úvodních testech je prováděno široké spektrum testů, tedy jsou kladeny zvýšené nároky na kvalitu (vlastnosti) buněk a samozřejmě jejich množství. Proto je vhodné zvážit, zda je možné, alespoň pro úvodní testování použít liniové buňky, které mají stabilní vlastnosti a jsou dostupné. Při použití primokultivovaných buněk je dobré zhodnotit dostupnost kultury – zda primokultivovaná bude dlouhodobě dostupná, v jaké kvalitě? Je nutné vzít v úvahu, že mezi jednotlivými primokulturami je určitá variabilita, kterou není možné předem eliminovat a míru variability není možné předem předpokládat. V obou případech, je ale vhodné zajistit buňky v přiměřeném počtu.
Adherentní/ suspenzní kultury – Při vysokých nárocích na počet buněk je také ke zvážení použití (alespoň v úvodních testech) suspenzní kultury. Je vhodnější pro práci ve vyšších objemech, je u ní snáze udržitelná log-fáze, je jednodušší manipulace, kdy nejsou potřeba látky pro uvolnění kultury z kultivační lahve. Nevýhodou je, že není možné stanovit okamžitý stav kultury mikroskopickým posouzením morfologie buněk.

- Při použití primokultivovaných buněk v kterémkoli stádiu vývoje, je velmi důležitá optimalizace procesu izolace buněk. Izolace by měla být co nejefektivnější s maximální výtěžností buněk, aby zákrok, kdy je odebírána tkáň pacientovi byl co nejméně invazivní a nepředstavoval pro pacienta výraznou zátěž.

- Následná kultivace buněk by měla být co nejrychlejší, pokud jsou kultivovány diferencované buňky, při co nejnižším možném počtu pasáží, aby nedocházelo ke změnám ve fenotypu buněk kultivovaných v in vitro podmínkách. U buněk kmenových je nutné zajistit udržení jejich fenotypu případně diferenciaci určitého typu buněk s konečným ověřením efektivity diferenciaci pomocí povrchových znaků a funkčních testů (produkce ECM).

Z hlediska výběru vhodného scaffoldu pro buňky a následnou aplikaci, je žádoucí zvážit aspekty, jako jsou:

- Výběr vhodného materiálu, který bude použit jako scaffold pro osazení buňkami je alfa a omegou úspěšnosti celého produktu tkáňového inženýrství. Tento materiál a celý scaffold musí:
 - o splňovat požadavky na biokompatibilitu
 - o mít optimální porozitu tak, aby buňky mohly osídlit scaffold v celém objemu a také aby poskytl vhodné prostředí pro jejich růst, ale také k migraci buněk z okolní tkáně defektu a jejich růst tak, aby došlo k integraci štěpu do organismu. Je vhodné, aby zvolený nosič byl certifikovaný jako zdravotnický materiál.
 - o mít vhodné chemické vlastnosti (pH, složení)
 - o mít vyhovující mechanické vlastnosti
 - o mít dobré vlastnosti pro manipulaci jak během osazení buňkami, tak i následně při implantaci celého produktu tkáňového inženýrství pacientovi
 - o splňovat požadavky na stabilitu a degradabilitu

Pokud se jedná o nově vyvíjený nosič, který není dostupný komerčně na trhu, je nutná jeho certifikace (před uvedením do klinické praxe by měl být použitý nosič certifikován jako zdravotnický prostředek v kategorii, která zohledňuje jeho zamýšlené použití v klinické praxi).

Jakmile je k dispozici vhodný dobře ocharakterizovaný materiál, scaffold a buňky, je možné zahájit proces osazování.

- Osazení scaffoldu by mělo být provedeno co nejefektivněji, ve většině případů je žádoucí, aby bylo osídleno co možná největší procento plochy nosiče.
- Při osídlení scaffoldu buňkami je cílem homogenní (rovnoměrné) rozložení buněk v nosiči.
- Scaffold by měl svými vlastnostmi poskytnout optimální podmínky pro buňky, jejich proliferaci, udržení optimálního fenotypu a produkci ECM.

- Vzhledem k tomu že buňky mohou na 3D kultivaci reagovat odlišně, je nezbytné, aby byly stanoveny kontrolní mechanismy pro ověření, že nedochází k nežádoucí diferenciaci nebo dediferenciaci buněk. Toto by mělo být ověřeno pokud možno jednoduchými funkčními testy. Samozřejmostí je průběžná kontrola sterility a závěrečné ověření toho, že produkt neobsahuje žádné nežádoucí mikroorganismy před implantací pacientovi.

5.2 PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

Na základě úspěšně provedených základních testů je přikročeno k pokusům na zvířatech. Cílem je určit míru rizika po podání látky při specifikovaných podmínkách. Měly by být testovány následující parametry:

- Akutní toxicita – dosažení letálního účinku po podání jedné dávky
- Subakutní a chronická toxicita – účinek opakovaných dávek léčiva, důležité především u léčiv pro dlouhodobé podávání
- Účinky na reprodukční funkce včetně teratogenity
- Kancerogenita
- Mutagenita
- Speciální toxikologické testy (do této kategorie spadají např. testy na místní dráždivost)

Pro realizaci některých testů se stále častěji, tam, kde je to možné využívají tkáňové kultury a počítačové modely.

Je také nutné brát v úvahu, že přenos toxikologických údajů ze zvířat na člověka není zcela spolehlivý.

Kromě uvedených testů je také vhodné získávat informace (především u produktů tkáňového inženýrství), které se týkají vhodnosti zvolené aplikační formy, přijmutí / odvržení připraveného štěpu, funkčnost štěpu v prostředí organismu nebo ověření případné degradability/ stability scaffoldu.

5.3 KLINICKÉ HODNOCENÍ

Jakmile jsou úspěšně dokončena všechna preklinická testování (vzhledem k povaze některých testů mohou dosahovat 2 až 5ti let), je možné přikročit ke klinickým testům prováděným na pacientech. S ohledem na charakter testů a počet pacientů zahrnutých

v jednotlivých fázích testování, jsou rozlišovány 4 fáze klinického testování/hodnocení:

5.3.1 FÁZE I KLINICKÉHO HODNOCENÍ

Zahrnuje první podání zdravým dobrovolníkům (většinou se počet pohybuje v desítkách). Účelem této fáze testování je:

- Zjištění tolerance lidským organismem
- Testování reakce a osudu podaného preparátu v organismu (farmakokinetika a farmakodynamika a primární snášenlivosti hodnoceného preparátu. Z farmakokinetického hlediska se ověřuje např. vstřebávání aplikované látky (ovlivnění přijatou potravou apod.), kinetiku dosažené koncentrace látky v plazmě, její eliminaci atd. Z farmakodynamického hlediska je sledováno např. ovlivnění vitálních funkcí (tlak, puls apod.).
- Jsou sledovány případné nežádoucí účinky

5.3.2 FÁZE II KLINICKÉHO HODNOCENÍ

Léčivo nebo zdravotnický prostředek je podáván malému počtu vybraných, přesně definovaných nemocných. Počet pacientů je v řádech desítek až stovek. Cílem je ověření léčebných účinků na lidský organismus a shromažďování dalších údajů, např. o chování v organismu a snášenlivosti, zjišťují se případné nežádoucí účinky.

5.3.3 FÁZE III KLINICKÉHO HODNOCENÍ (ROZŠÍŘENÁ KLINICKÁ STUDIE)

V této fázi se studie účastní několik set až tisíc pacientů. Na velkém souboru jedinců se prokazuje terapeutická účinnost a bezpečnost hodnoceného přípravku, srovnáním s jinými, již zavedenými léky, považovanými za standardní a nejúčinnější pro danou terapeutickou indikaci (srovnávací léčivo, komparátor).

Statisticky zpracované údaje získané ze všech fází klinického hodnocení jsou předkládány kontrolním úřadům (u nás Státní ústav pro kontrolu léčiv, SÚKL) pro potřeby registračního řízení a získání povolení používat léčivo v široké klinické praxi.

5.3.4 FÁZE IV KLINICKÉHO HODNOCENÍ (POSTREGISTRAČNÍ HODNOCENÍ)

V této fázi klinického hodnocení probíhá ověření účinků léčiva v široké klinické praxi za normálních terapeutických podmínek po dobu minimálně pěti let od registrace. Nové léčivo je výrobcem aktivně sledováno v běžných klinických podmínkách. Sledují se zejména údaje o výskytu a závažnosti nežádoucích účinků, možných interakcích s jinými léčivy, nebo se ověřuje účinnost v různých věkových skupinách pacientů.

ISBN ?

Toto dílo je chráněno autorským právem.

Editoři:
Lucie Wolfová
Lucy Vojtová
Lucie Jurečková
Lenka Kohutová

Úvod do tkáňového inženýrství

Obsah

TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	1
Lucie Wolfová	
SYNTETICKÉ POLYMERY A BIOPOLYMERY VYUŽITELNÉ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	19
Lucy Vojtová	
BUŇKY A TKÁŇOVÉ KULTURY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	47
Lucie Jurečková	
APLIKACE TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ.....	71
Lenka Kohutová	
OD VÝZKUMU DO PRAXE.....	119
Lucie Jurečková	