



# Biomateriály v regenerativní medicíně

PharmDr. Šárka Kubinová, Ph.D.

Ústav Experimentální Medicíny AV ČR, v.v.i.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Obsah:

- Regenerativní medicína – principy, členění
- Buněčná terapie – kmenové buňky
- Tkáňové inženýrství – principy, materiály, buněčná adheze
- Nanovlákná – příprava, použití v reg. medicíně
- Hydrogely v regeneraci míšního poranění
- Bioprinting



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Regenerativní medicína - cíle

„Náhrada nebo obnova poškozených buněk, tkání nebo orgánů za účelem navrácení jejich funkce.“

## **náhrada poškozených nebo nefunkčních buněk**

- **buněčná terapie (autologní, alogenní)**

## **rekonstrukce poškozených tkání a orgánů**

- **tkáňové inženýrství – biomateriály**

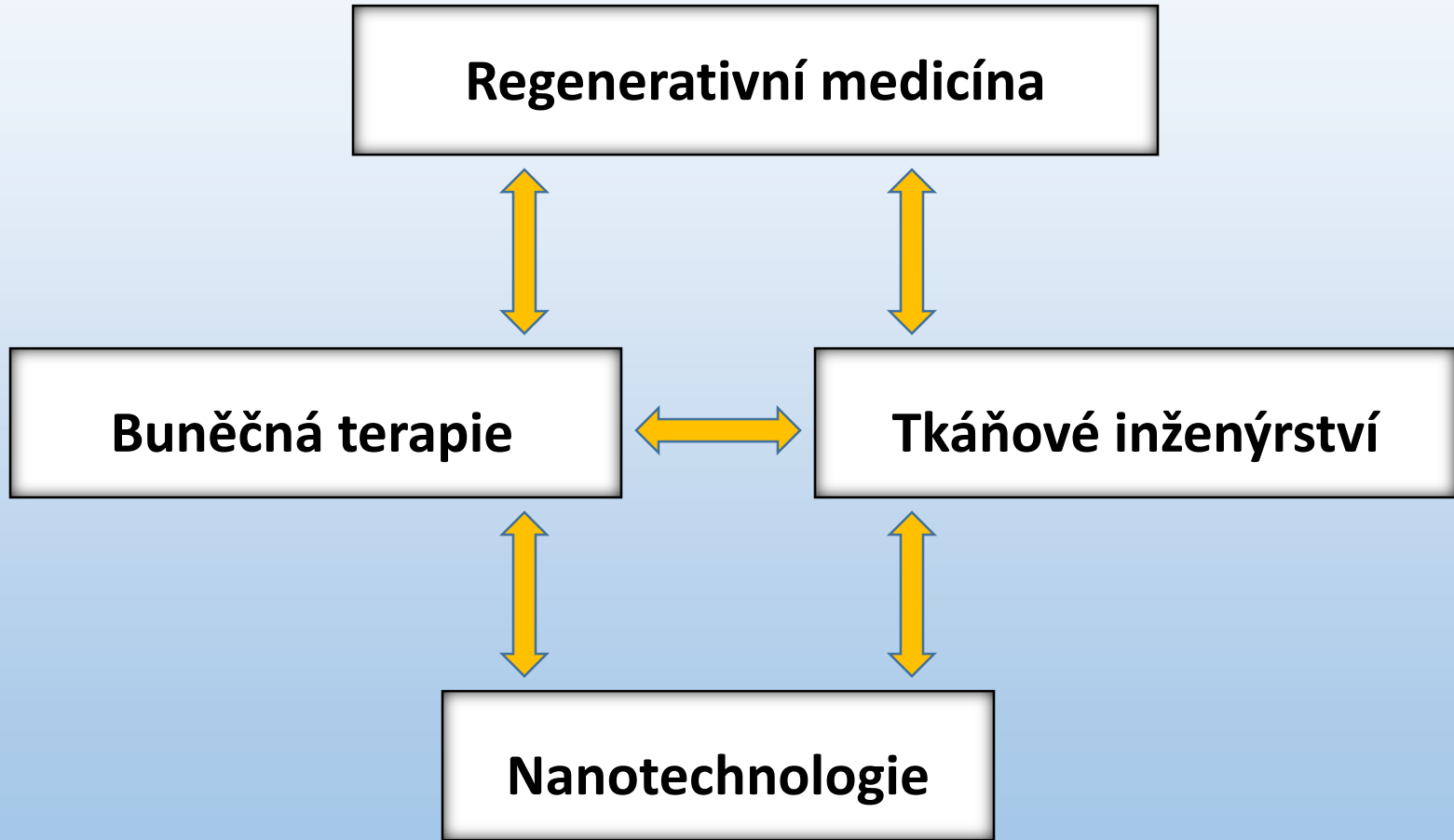
## **indukce endogenních regenerativních procesů**

- **aplikace biologicky aktivních látek**
- **aplikace buněk produkujících aktivní látky**

# Proč potřebujeme regenerativní medicínu?

- Neschopnost léčit některé nemoci (cukrovka, Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, amyotrofická laterální skleróza, roztroušená skleróza, cystická fibróza....)
- Lidské tělo samo nedokáže nahradit poškozené tkáně a orgány (míšní poranění, infarkt, iktus, degenerace sítnice)
- Stárnoucí populace
- Nedostatek tkáňových nebo orgánových transplantátů (hodně pacientů, málo orgánů)

# Regenerativní medicína - členění



# Buněčná terapie – buněčné typy

## Kmenové buňky:

- Embryonální kmenové buňky
- Dospělé kmenové buňky
  - Mesenchymální kmenové buňky - kostní dřeň, tuková tkáň
  - Hematopoetické kmenové buňky – kostní dřeň
  - Kmenové buňky z pupečnickové krve/tkáně
  - Fetální kmenové buňky
- Indukované pluripotentní buňky - iPS cells

## Somatické buňky:

- Fibroblasty, keratinocyty, chondrocyty, endotelové buňky
- Olfaktorické gliové buňky
- Schwannovy buňky

## Geneticky modifikované buňky:

- Genová terapie

# Co jsou kmenové buňky?

**Kmenová buňka** je buňka schopná sebeobnovy a zároveň produkce diferencovaných dceřiných buněk

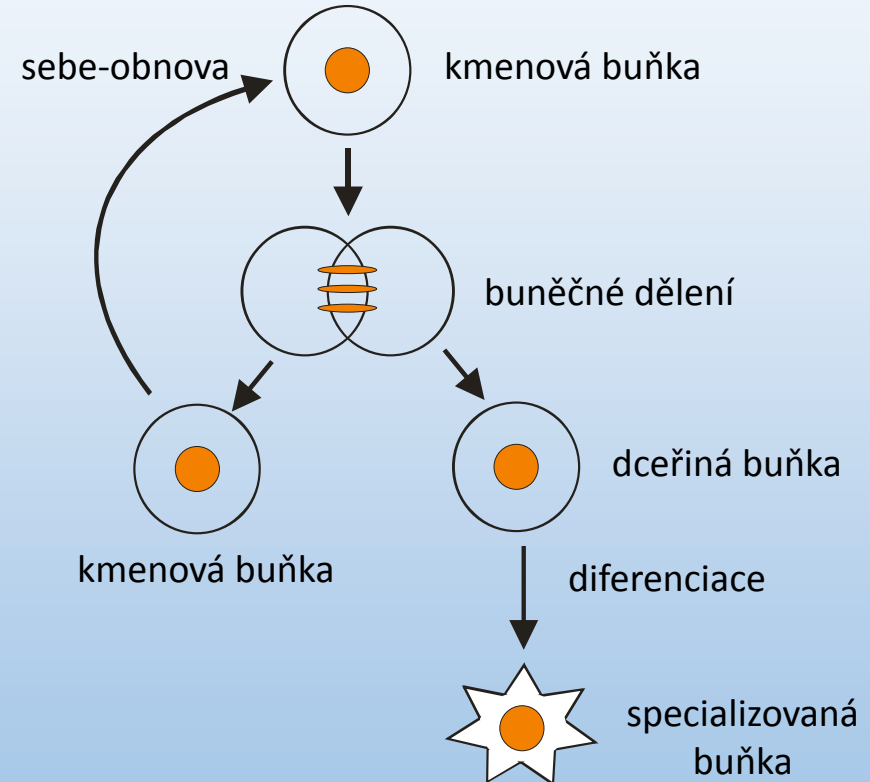
## Sebeobnova

- Trvalé dělení za účelem obnovy tkáně
- Nejméně jedna ze dvou dceřiných buněk si zachová charakteristiky buňky původní

## Diferenční potenciál

- Schopnost tvořit jeden či více buněčných typů, jiných, než je mateřská buňka

## Asymetrické dělení



# Kmenové buňky dle diferenciačního potenciálu

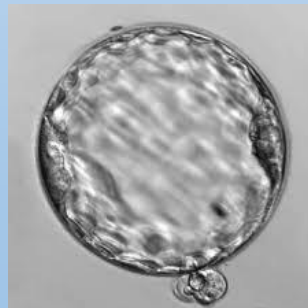
- **Totipotentní KB** – mohou produkovat jakékoliv buněčné typy bez omezení. Zygota vzniklá splynutím vajíčka a spermie je totipotentní stejně jako buňky vzniklé jejím prvním dělením.
- **Pluripotentní KB** – embryonální buňky blastocysty (5 – 14 den vývoje) vznikají z totipotentních buněk a mohou produkovat jakékoliv buňky kromě buněk trofoblastu (zevního obalu savčího embrya), nemohou vytvořit embryo.
- **Multipotentní KB** – mohou produkovat příbuzné buňky určité tkáně (fetální kmenové buňky, pupečníkové kmenové buňky, dospělé kmenové buňky).
- **Progenitorové KB** (někdy zvané unipotentní) – mohou produkovat pouze jediný typ buněk, ale mají schopnost se plně samy obnovit – tak se liší od buněk, které nejsou kmenové.

Totipotentní KB



Zygota

Pluripotentní KB



Blastocysta

Multipotentní/  
progenitorové KB



Embryo/fetus

Multipotentní/  
progenitorové KB



Dospělý jedinec

# Dospělé kmenové buňky vs. embryonální

## Výhody:

- Dostupnost, snadná kultivace
- Možnost autologního použití – vlastní KB pacienta
- Eticky přijatelné
- Geneticky modifikovatelné
- Nevytváří nádory



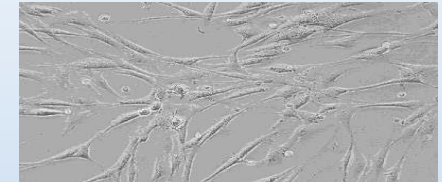
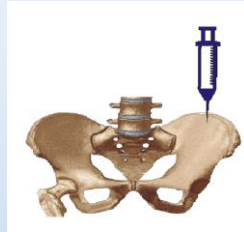
## Nevýhody:

- Limitovaný diferenciační potenciál
- Omezená délka kultivace



# Mezenchymální kmenové buňky

- ✓ - Kostní dřeň - izolace aspirací z pánevní kosti
- ✓ - Tuková tkáň – liposukce
- ✓ - autologní podání – transplantace vlastních kmenových buněk



hMSC

Purifikace mononukleární frakce – adheze MSC na kultivační plastik

## Výhody:

### Multipotentní diferenciací kapacita

Osteoblasty

Chondrocyty

Adipocyty

Myocyty, endoteliální buňky

Beta-buňky pankreatu (?)

Nervové buňky (?)

### Snadná izolace

Kostní dřeň

Tuková tkáň

Dentální pulpa

Periferní krev

Pupečníková krev/tkáň

- Snadná expanze

- Imunomodulační vlastnosti

- Produkce růstových faktorů, cytokinů a jiných bioaktivních látek

**Nevýhody:** omezená diferenciací schopnost

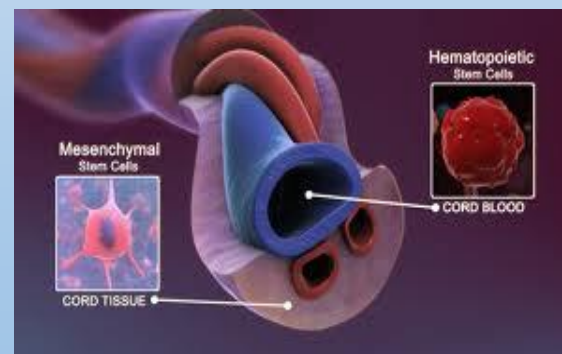
# Mezenchymální kmenové buňky z pupečníku

**Kmenové buňky z pupečnickové krve/tkáně** - bohaté na mezenchymální KB

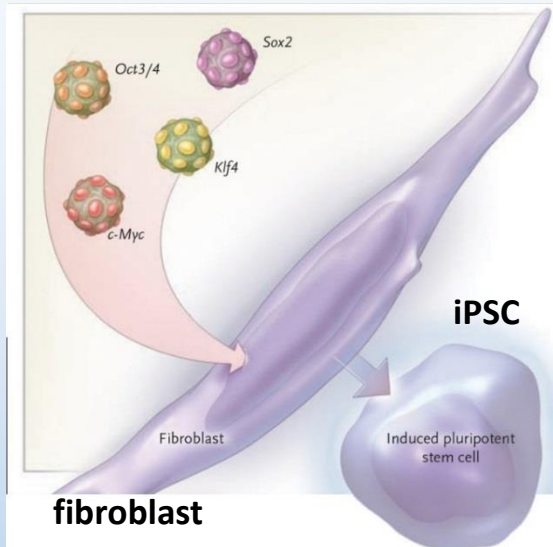
**Mezenchymální kmenové buňky** z pupečnickové krve/tkáně jsou multipotentní - schopné se přeměnit na specializované buňky v lidském organismu jako jsou např. kosti, chrupavka, šlachy, svaly, nervy, srdeční tkáň, kůže či jaterní buňky

**Odběr** na porodním sále po porodu a odstřižení dítěte, před porodem placenty

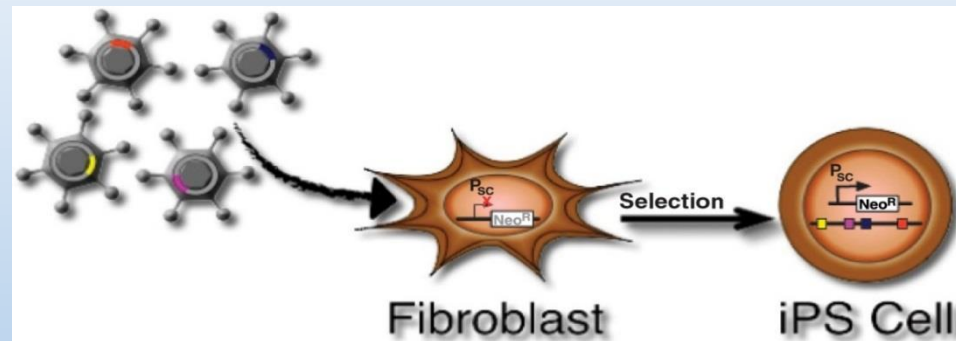
**Klinické studie** – využití KB pupečníku v celé řadě vážných onemocnění – cukrovka, dětská mozková obrna



# Indukované pluripotentní buňky (iPSC)



**iPSC** - uměle vytvořená kmenová buňka – přenos genů pro kmenovost (Oct-3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) do již diferencované buňky a její přeměna na buňku pluripotentní.



## Výhody:

- lze je derivovat přímo z buněk pacienta (jsou imunologicky kompatibilní)
- pluripotentní - možnost diferenciacce na typ buněk, které nemoc postihuje
- možnost hledání vhodných terapií *in vitro*
- eticky akceptovatelná metoda

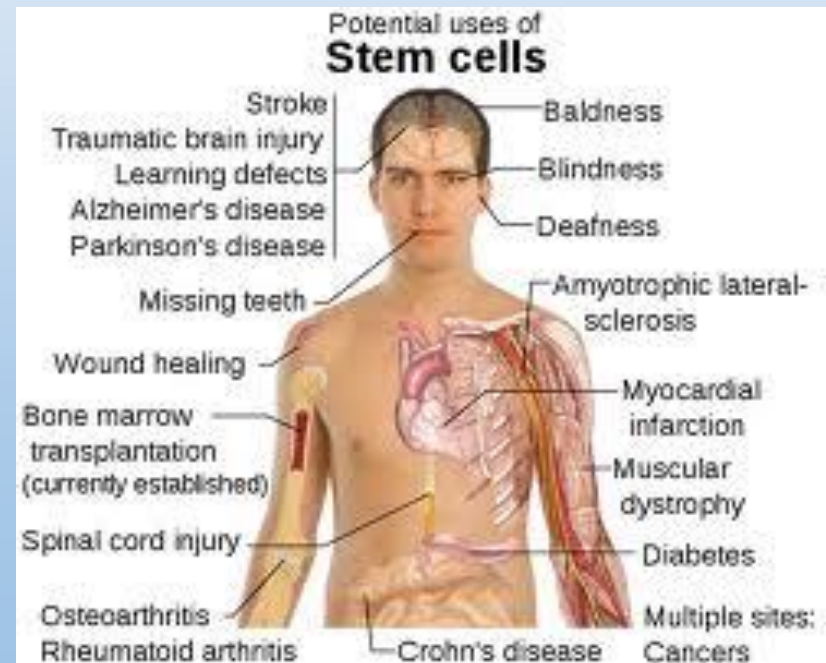
# Výzkum kmenových buněk, buněčná terapie

## Proč je výzkum kmenových buněk důležitý?

- Náhrada chybějících nebo poškozených buněk nebo tkání, které se samy nedokáží obnovit
- Prohloubení znalostí o kmenových buňkách pro jejich bezpečné a efektivní použití
- Testování nových léků a sloučenin

## Která lidská onemocnění mohou být léčena kmenovými buňkami?

- Leukémie (transplantace kostní dřeně)
- Parkinsonova nemoc
- Alzheimerova nemoc
- Roztroušená skleróza
- Poškození mozku a míchy
- Mozková mrtvice
- Artritida – obnova chrupavky
- Těžké popáleniny
- Cukrovka
- Infarkt
- Genetické poruchy
- A další.....



# Buněčná terapie - klinické studie

Více než 3600 studií ověřuje bezpečnost a účinnost buněčné terapie v klinickém hodnocení ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

<b>CNS</b>	neurodegenerativní onemocnění (Amyotrofni laterální skleróza (ALS) Parkinsonova ch., Alzheimerova ch., poranění míchy, iktus)
<b>Kardiovaskulární choroby</b>	kardiomyopatie, infarkt myokardu, ateroskleróza, koronární ischemie
<b>Pohybový aparát</b>	osteoartritida, osteoporóza, kostní náhrady
<b>Crohnova choroba</b>	
<b>Diabetes</b>	revaskularizace ischemických končetin,
<b>Oftalmologie</b>	reparace rohovky, limbu, makulární dystrofie
<b>Dermatologie</b>	lupus erythematosus, kožní náhrady – chronické rány, popáleniny, vitiligo, melanomy
<b>Jaterní cirhóza</b>	
<b>Nádorové onemocnění krve</b>	leukemie a lymfomy, mnohočetný myelom, Hodgkinova n., graft vs. host disease

# Biomateriály – tkáňové inženýrství

„ Příprava umělých biologických náhrad sloužících k rekonstrukci nebo obnově poškozených tkání“

## Interdisciplinární obor:

Materiálové inženýrství, chemie, biochemie, fyzika, medicína, buněčná a molekulární biologie, počítačové technologie....

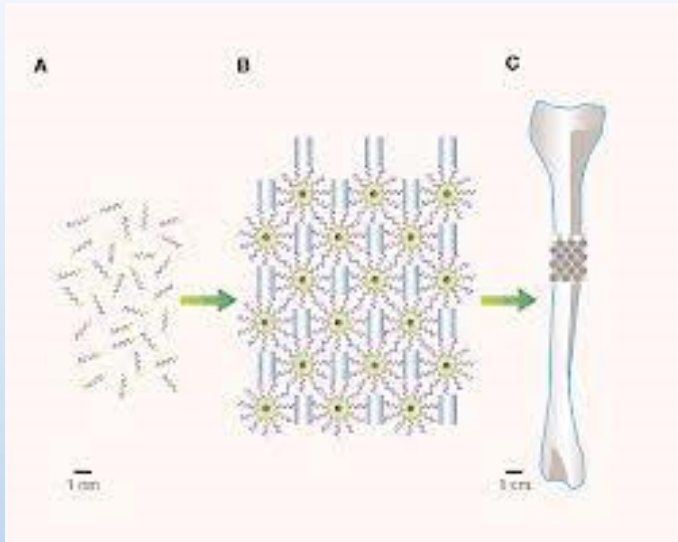
### Náhrada tkání:

- ✓ Kosti
- ✓ Chrupavky, šlachy
- ✓ Cévy
- ✓ Kůže
- ✓ Srdeční tkáň, chlopně
- ✓ Nervová tkáň
- ✓ Močový měchýř
- ✓ Játra, atd.

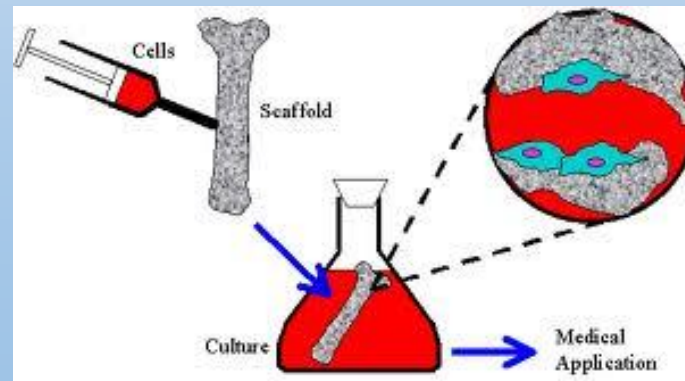
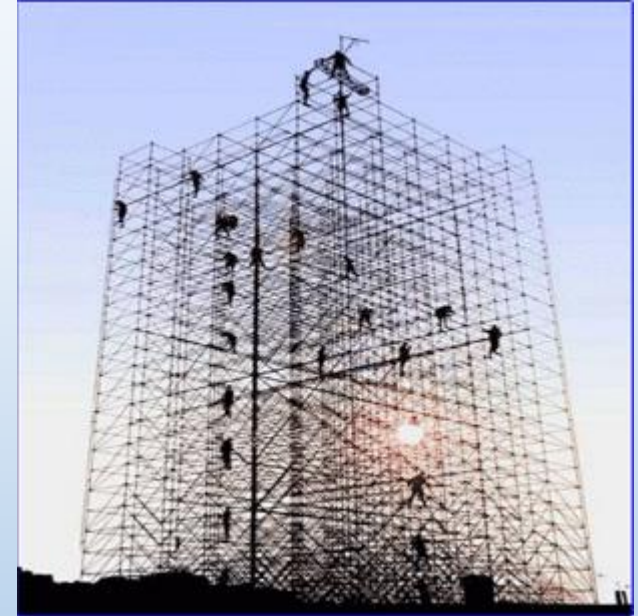


# Principy tkáňového inženýrství

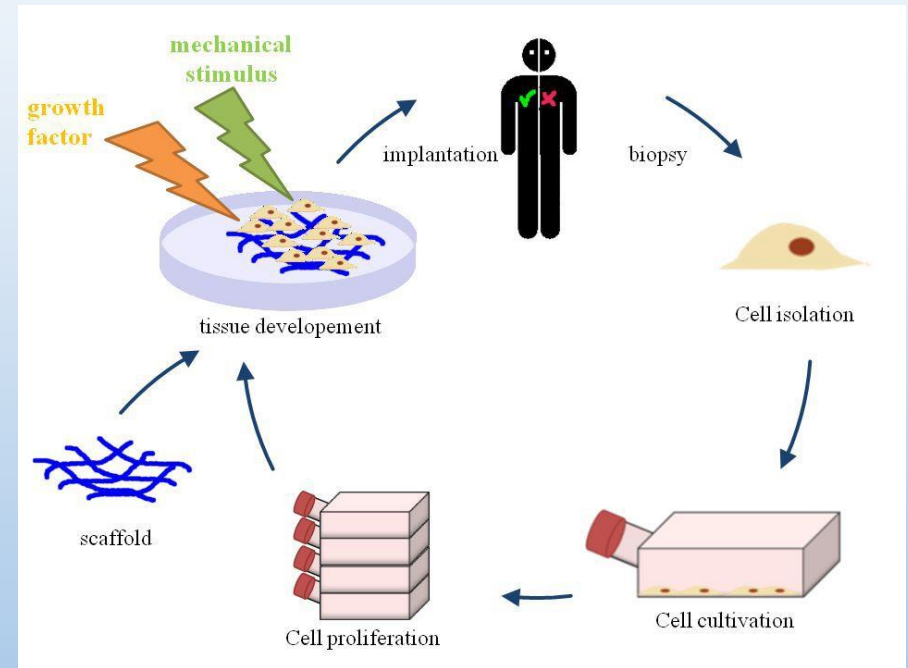
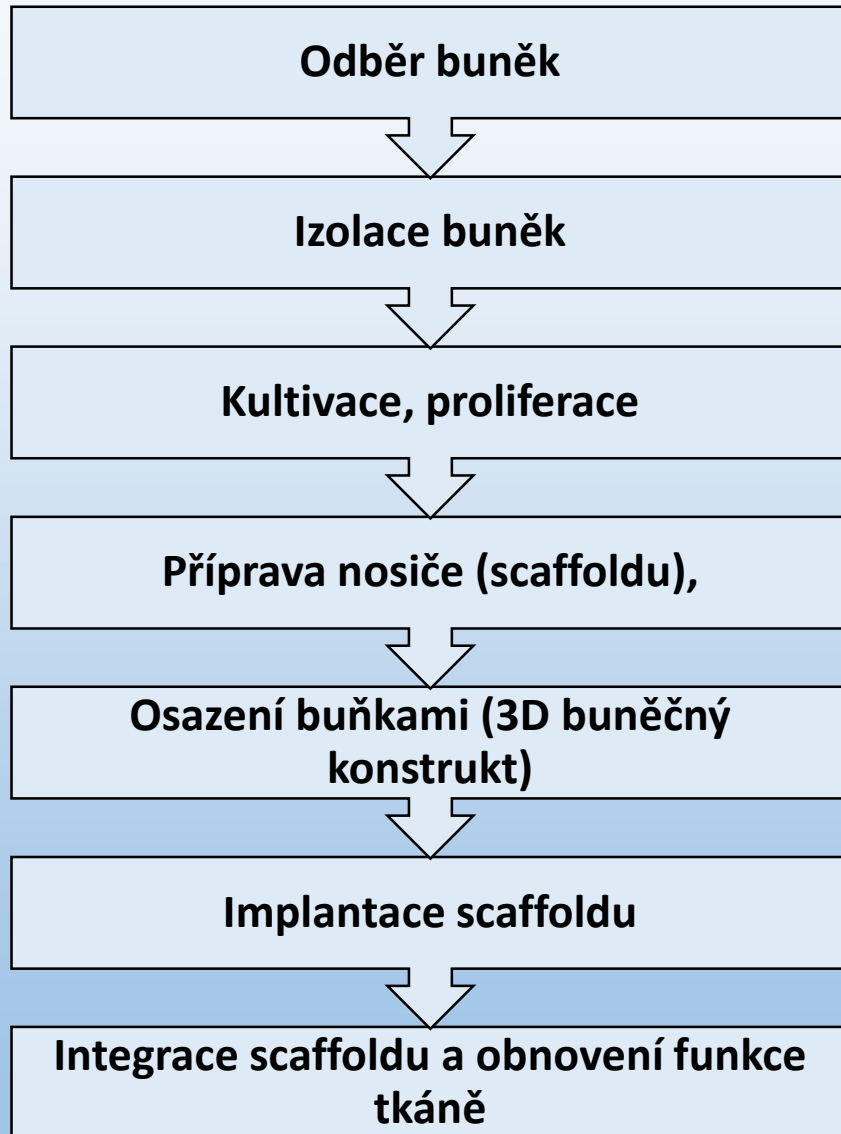
**Scaffold** („lešení“) - 3D konstrukt sloužící jako opora buněk pro tvorbu nové tkáně



Buňky + scaffold = náhrada tkáně

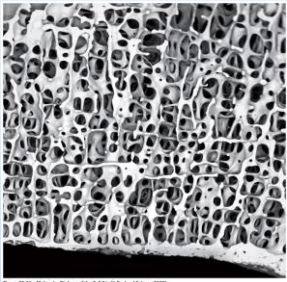


# Principy tkáňového inženýrství

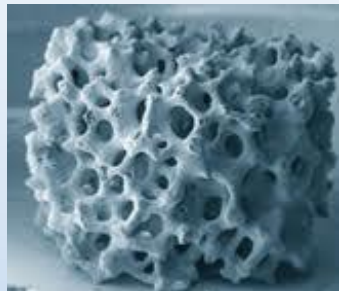


# Scaffolds pro tkáňové inženýrství

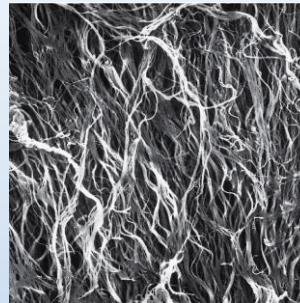
- **Scaffold** – nosič a podpůrná struktura pro kultivované buňky a tvorbu nové tkáně
- Různý design dle charakteru a struktury cílové tkáně



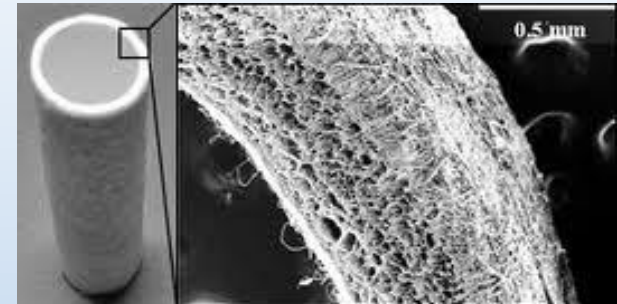
Bone



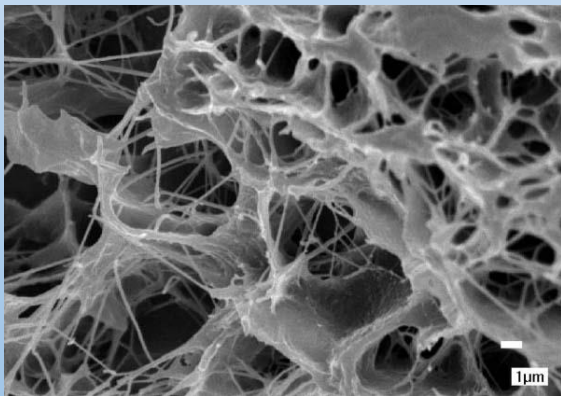
Calcium phosphate scaffold



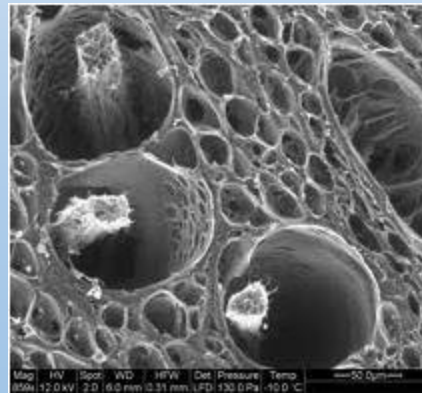
Aorta



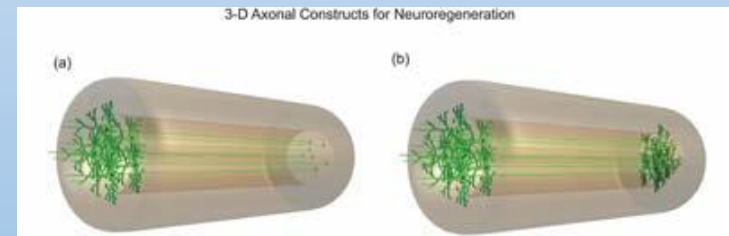
Nanofibrous vascular scaffold



Heart tissue scaffold



Hydrogel scaffold for spinal cord repair



Neural conduit scaffold

# Vlastnosti scaffoldu

## Biokompatibilita

Kompatibilita s tkání bez nežádoucích lokálních nebo systémových změn

Žádná nebo minimální imunitní reakce

Nulová toxicita

## Biomimetika

Struktura podobná cílové tkáni

Vhodné fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti

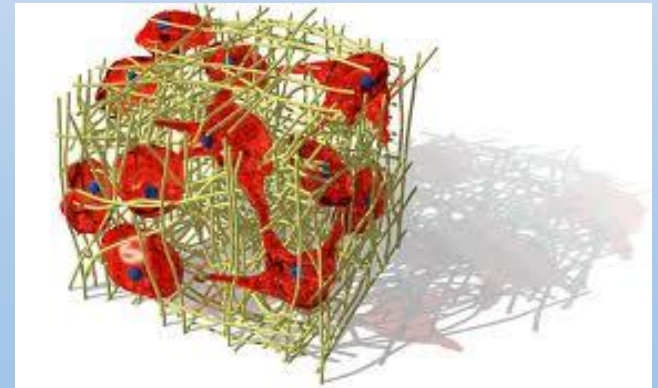
Porozita – vrůstání buněk a tkáně, difuze živin a metabolitů

## Bioadhezivita

Povrch umožňující buněčnou adhezi, růst a diferenciaci

## Biodegradabilita

Materiál se rozloží a je nahrazen nově vytvořenou tkání



# Biomateriály pro tkáňové inženýrství

## Anorganické – kov, keramika, hydroxyapatit, kalcium fosfát

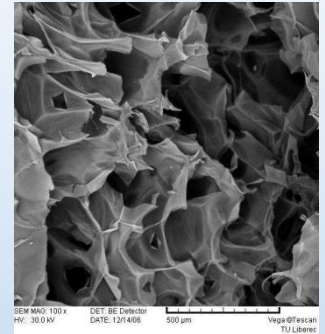
- zubní, kostní a kloubní náhrady

## Organické

- **Přírodní** - materiály izolované z přírodních zdrojů – kolagen, agar, chitosan, hyaluronan, želatina, fibrin, hedvábí
- **Syntetické** – polymery – polylaktát, polykaprolakton....
- **Kompozitní materiály**

➤ Degradovatelné

➤ Nedegradovatelné



želatina



Chitosan – krabí krunýře

# Syntetické polymery

## Výhody:

Dobře definované, reprodukovatelná výroba, možná modifikace fyzikálních a chemických vlastností

## Nevýhody:

Nejsou adhezivní pro buňky, degradační produkty

## Polymery:

Kyselina polyléčná – PLA

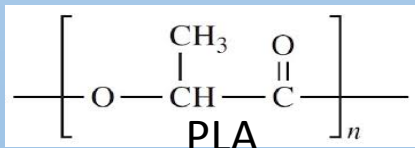
Kyselina polyglykolová - PGA

Polyethylenglykol – PEG

Polykaprolacton – PCL

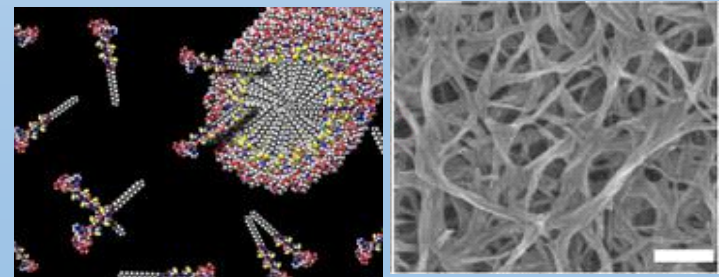
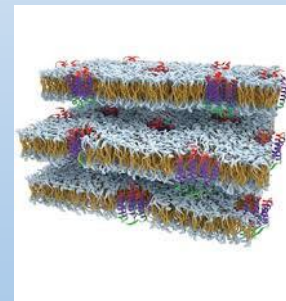
poly(hydroxyethyl methakrylát) - pHEMA

poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamide] HPMA



## Self-assembling nanovlákná:

Spontánní organizace krátkých proteinových skupin do nanovláknenné struktury



# Přírodní polymery

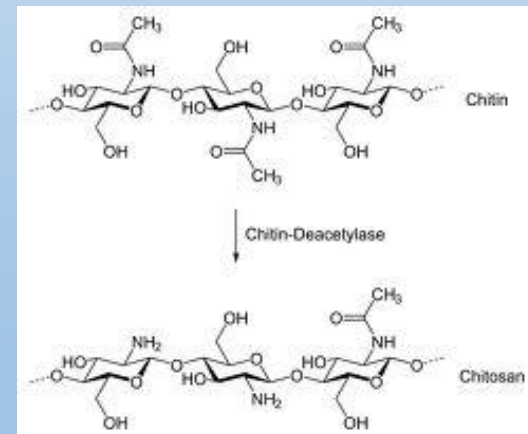
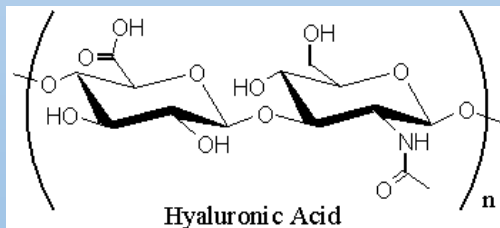
## Výhody:

- Biokompatibilita
- Buněčná adheze

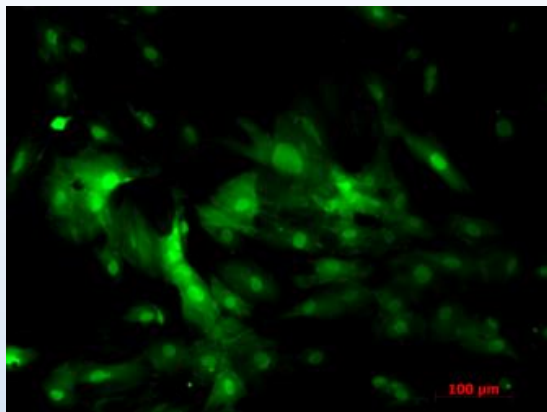
## Nevýhody:

- Variabilita, špatné mechanické vlastnosti, potenciálně imunogenní

- **Proteiny:** kolagen, fibrin, hedvábí
- **Polysaccharidy:** algináty, agaróza, hyaluronan, chitosan
- **Biologické scaffoldy:** decelularizovaná extracelulární matrix (ECM)



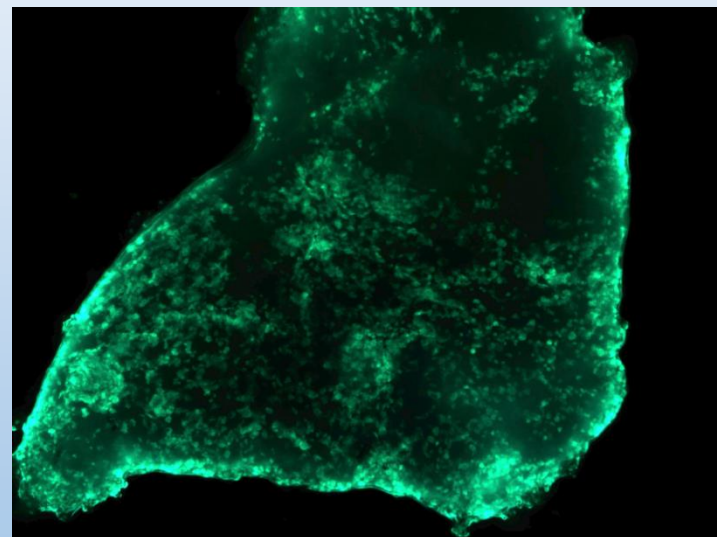
# Biomateriály jako nosiče buněk



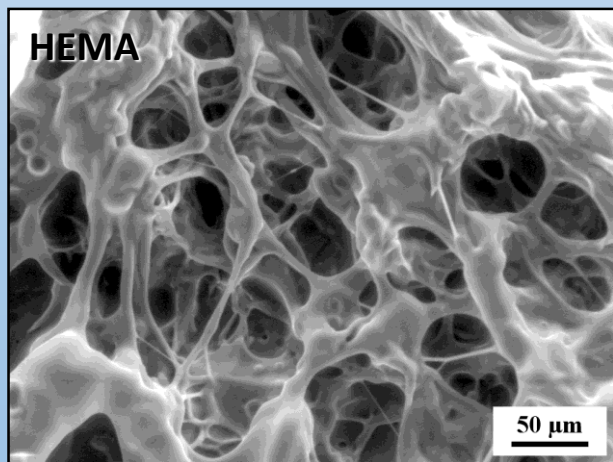
**Buňky**

**+**

**Biomateriály**

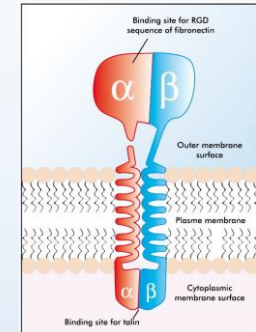


**Implantace do tkáně**



# Buněčná adheze na biomateriály

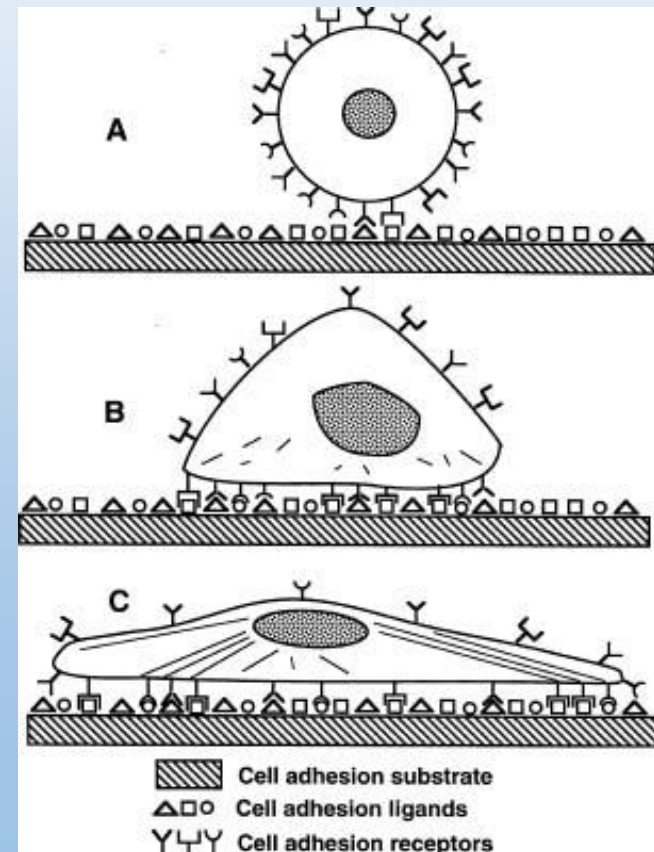
**Buněčná adheze** – přichycení buněk na specifické sekvence extracelulární matrix (kolagen, laminin, fibronektin, vitronektin) prostřednictvím transmembránového integrinového receptoru



cell attachment

cell spreading

organization of an actin cytoskeleton,  
and formation of focal adhesions



# Integrinové receptory

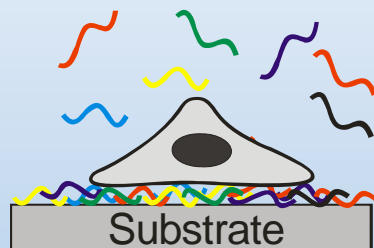
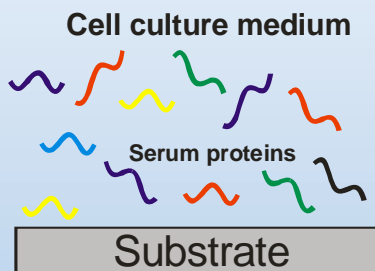
- Transmembránové receptory zajišťující vazbu buněk k extracelulární matrix
- Heterodimery složené z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek

Name	Distribution	Ligands
$\alpha_1\beta_1$	Many	Collagens, laminins
$\alpha_2\beta_1$	Many	Collagens, laminins
$\alpha_3\beta_1$	Many	Laminin-5
<a href="#"><u><math>\alpha_4\beta_1</math></u></a>	<a href="#"><u>Hematopoietic</u></a> cells	<a href="#"><u>Fibronectin</u></a> , <a href="#"><u>VCAM-1</u></a>
<a href="#"><u><math>\alpha_5\beta_1</math></u></a>	widespread	fibronectin and <a href="#"><u>proteinases</u></a>
$\alpha_6\beta_1$	widespread	Laminins
$\alpha_7\beta_1$	muscle, glioma	laminins
<a href="#"><u><math>\alpha_1\beta_2</math></u></a>	<a href="#"><u>T-lymphocytes</u></a>	<a href="#"><u>ICAM-1</u></a> , ICAM-2
<a href="#"><u><math>\alpha_M\beta_2</math></u></a>	<a href="#"><u>Neutrophils</u></a> and <a href="#"><u>monocytes</u></a>	<a href="#"><u>Serum</u></a> proteins, ICAM-1
<a href="#"><u><math>\alpha_{IIb}\beta_3</math></u></a>	<a href="#"><u>Platelets</u></a>	fibrinogen, fibronectin
$\alpha_V\beta_1$	ocular melanoma; neurological tumors	<a href="#"><u>vitronectin</u></a> ; fibrinogen
<a href="#"><u><math>\alpha_V\beta_3</math></u></a>	activated endothelial cells, melanoma, glioblastoma	<a href="#"><u>vitronectin</u></a> , fibronectin, fibrinogen, <a href="#"><u>osteopontin</u></a> , Cyr61
<a href="#"><u><math>\alpha_V\beta_5</math></u></a>	widespread, esp. fibroblasts, epithelial cells	<a href="#"><u>vitronectin</u></a> and adenovirus
$\alpha_V\beta_6$	proliferating epithelia, esp. lung and mammary gland	<a href="#"><u>fibronectin</u></a> ; TGF $\beta$ 1+3
$\alpha_V\beta_8$	neural tissue; peripheral nerve	<a href="#"><u>fibronectin</u></a> ; TGF $\beta$ 1+3
$\alpha_6\beta_4$	<a href="#"><u>Epithelial</u></a> cells	<a href="#"><u>Laminin</u></a>

# Buněčná adheze na biomateriály

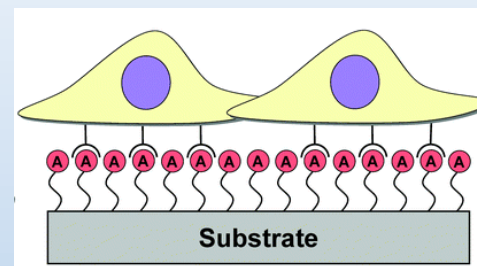
## Nespecifická

- Adsorpce proteinů na povrch materiálu (chemické složení, náboj, topografie)



## Specifická

- Přímá vazba buněk na specifické sekvence (domény) ECM pomocí integrinových receptorů

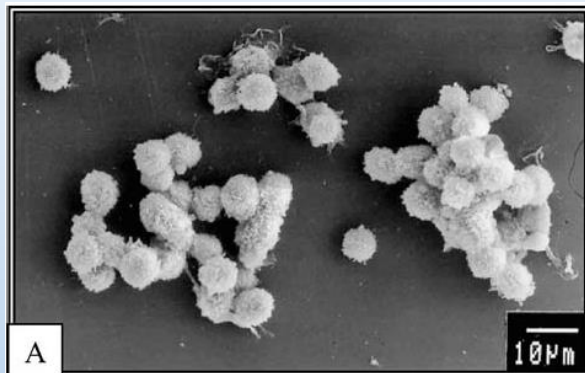


## Vazebné proteinové sekvence:

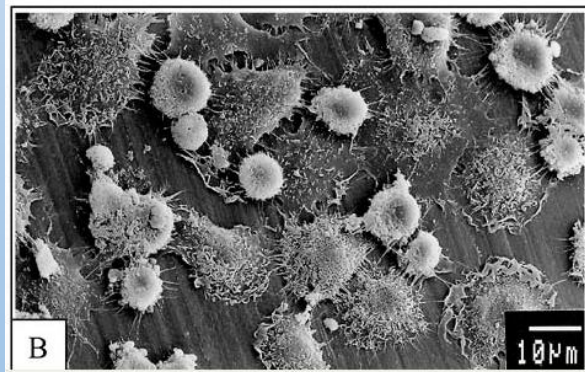
- RGD (Arg-Gly-Asp) - fibronectin -  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ , vitronectin -  $\alpha v\beta 3$
- IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) - laminin -  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$
- YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) –  $\beta 1$  laminin –  $\alpha 4\beta 1$
- GFOGER (Gly-Phe-Pyl-Gly-Glu-Arg) - collagen -  $\alpha 1\beta 1$ ,

# Buněčná adheze na biomateriály

Modifikace povrchu biomateriálů pomocí bioadhezivních proteinů



Neadhezivní substrát

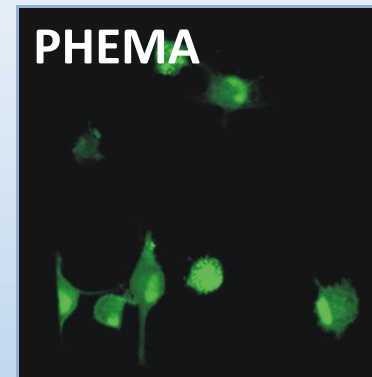


Adhezivní substrát

Sérové proteiny

-

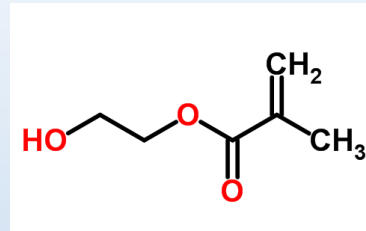
+



# Biomateriály – biomodifikace povrchu

## Bioadhezivní modifikace povrchu syntetických poly(2-hydroxyethyl methakrylát) (PHEMA) hydrogelů

- Pozitivní náboj
- Cholesterol
- IKVAV, RGD
- Fibronectin

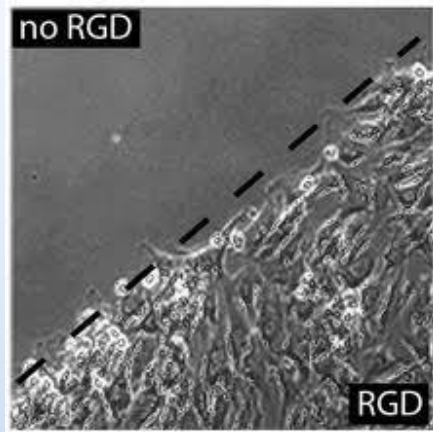


## Vývoj scaffoldů pro regeneraci míšního poranění

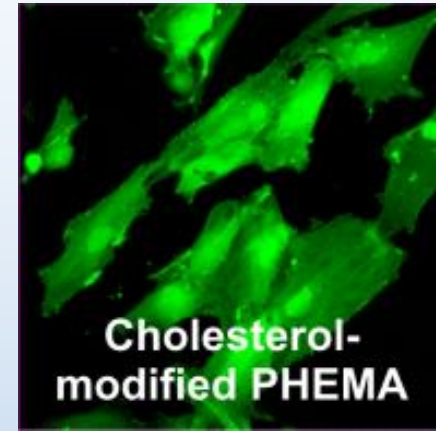
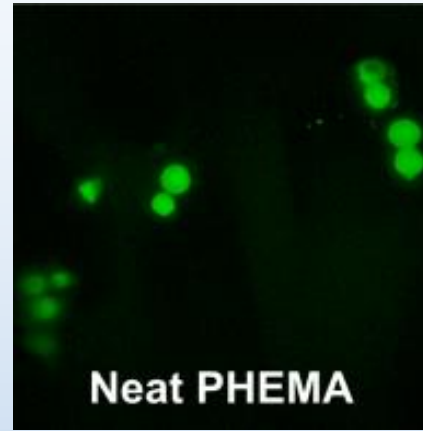
- Cholesterol-PHEMA scaffoldy s různou tvrdostí
- IKVAV-PHEMA scaffoldy s orientovanou porozitou
- poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] (PHPMA) scaffoldy modifikované RGD

# Modifikace povrchu biomateriálů pomocí adhezivních proteinů

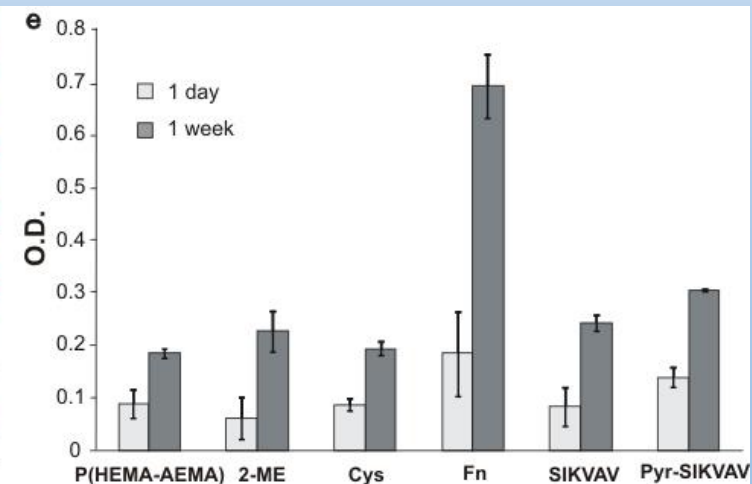
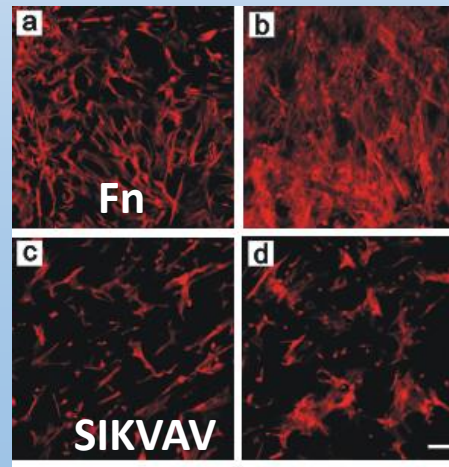
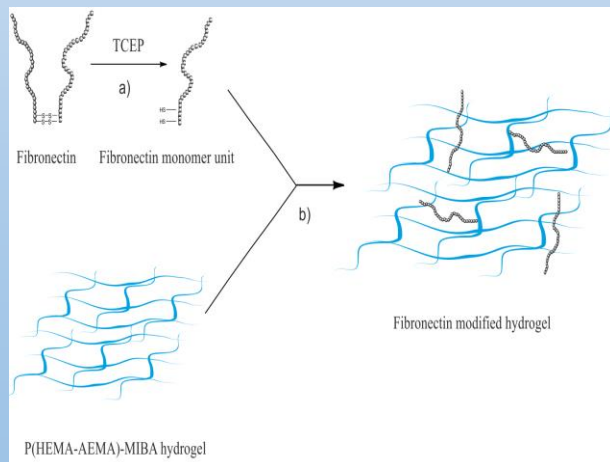
## RGD



## Cholesterol



## Fibronectin - fragment

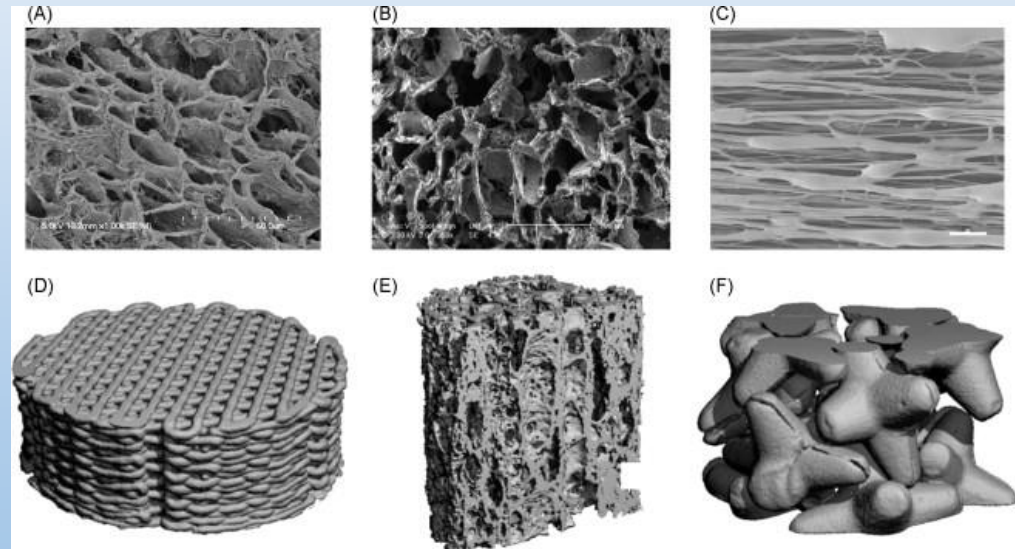
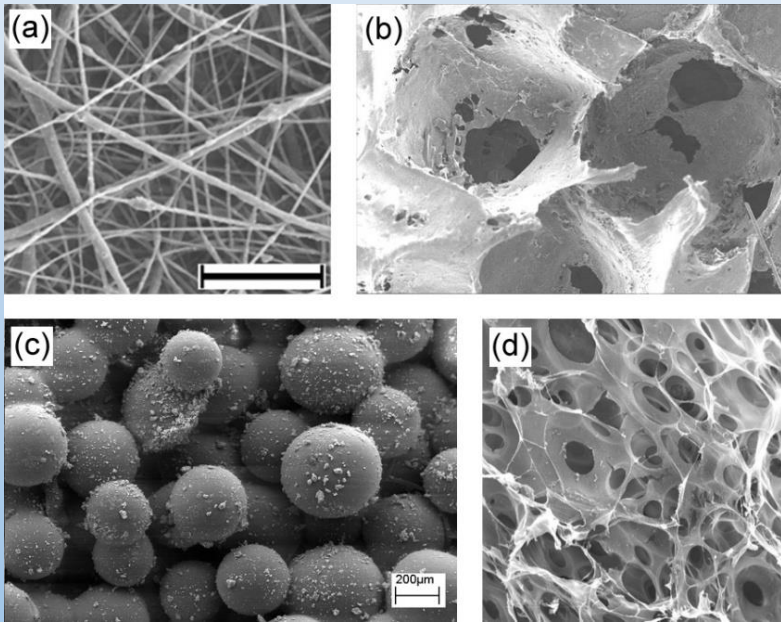




# Scaffolds ve tkáňovém inženýrství

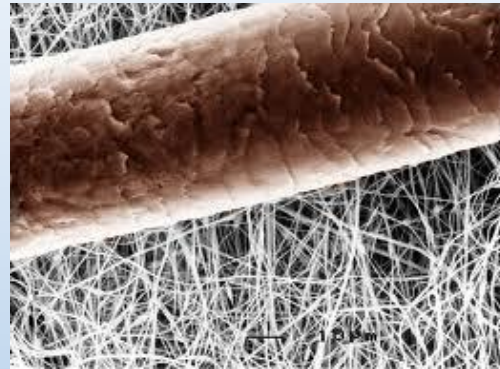
Různá struktura a mechanické vlastnosti – nanovláknna, hydrogely, porézní pěny...

Různý průměr a orientace pórů



# Nanovlákná pro tkáňové inženýrství

- Vlákna tenká < 100 nm
- Napodobují strukturu extracelulární matrix tvořící strukturu tkání



Lidský vlas

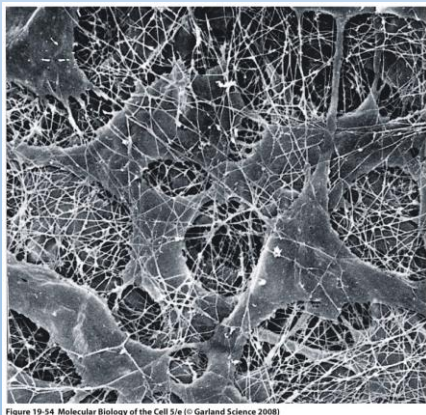
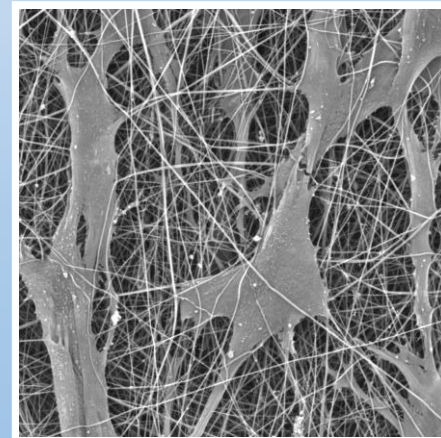


Figure 19-54 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

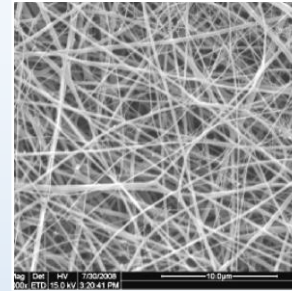
Fibroblasty v rohovce



Fibroblasty rostoucí  
na nanovláčkách

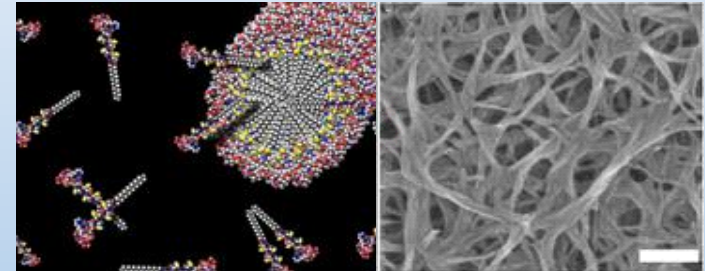
# Nanovlákná pro tkáňové inženýrství

- **Elektrostatické zvlákňování – elektrospinning**

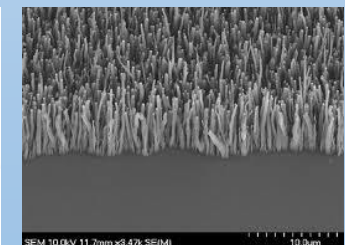
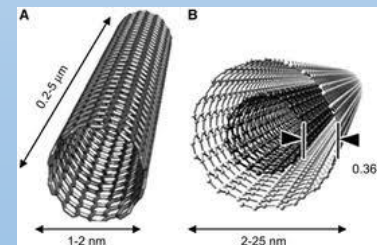


- **Self-assembly**

Peptidy se střídavými hydrofobními a hydrofilními doménami spontánně agregují a tvoří stabilní nanovláknennou strukturu pomocí nekovalentních vazeb



- **Karbonová nanovlákná - elektricky vodivá**

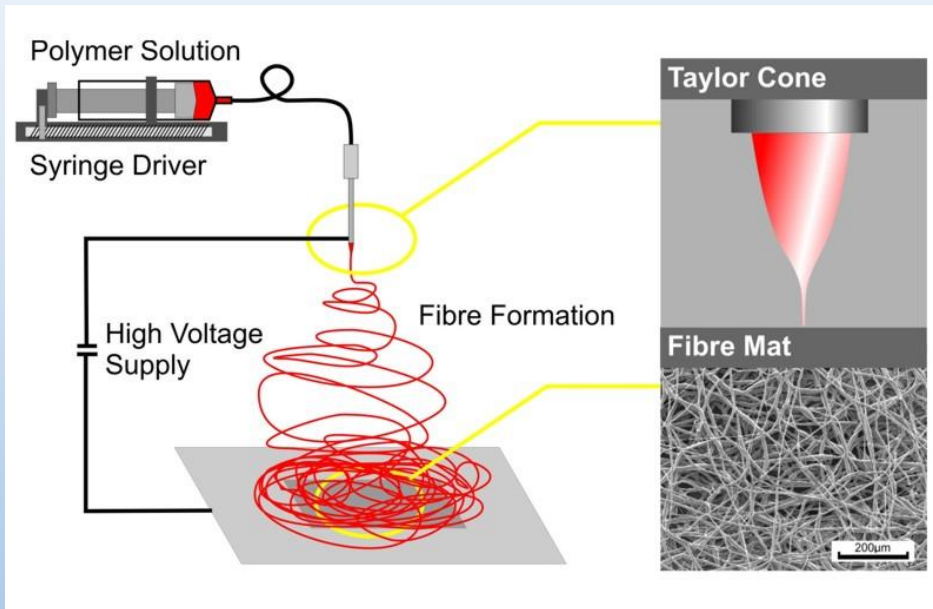


# Nanovlákná pro tkáňové inženýrství - vlastnosti

- **Struktura podobná extracelulární matrix**
- **Biokompatibilní**
- **Bioadhezivní** - vysoký specifický povrch - adsorpce proteinů - adheze buněk
- **Porézní** – difúze živin a odpadních látek
- **Flexibilní** – procesem zvlákňování lze ovlivnit průměr vláken, porozitu, mechanické vlastnosti, povrchovou topografii
- **Snadná výroba** – více než 100 syntetických nebo přírodních zvláknitelných polymerů

# Nanovláknna – elektrosinning

- Principy objeveny již v 19. stolení (lord Rayleigh)
- První patent publikován v r. 1902 - J. F. Cooley and W. J. Morton
- Od r. 1990 obnovení zájmu – tkáňové inženýrství, textilní průmysl, filtrace

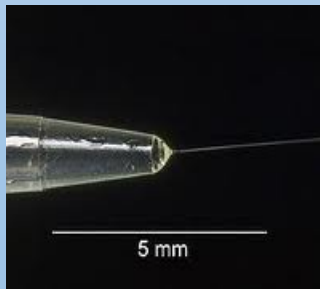


- Roztok polymeru vytéká z tenké trysky v silném elektrostatickém poli (10–100 kV)

- Na konci trysky se z kapky polymeru formuje Taylorův kužel

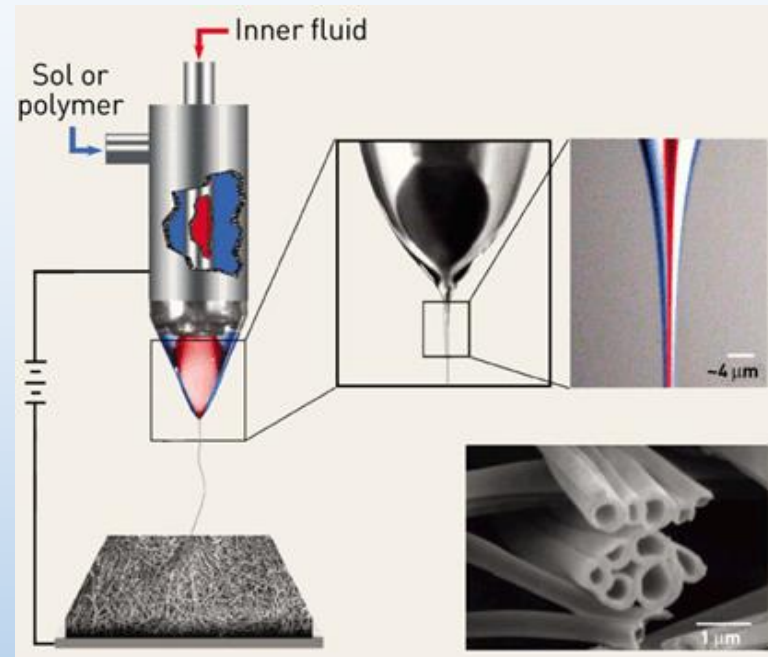
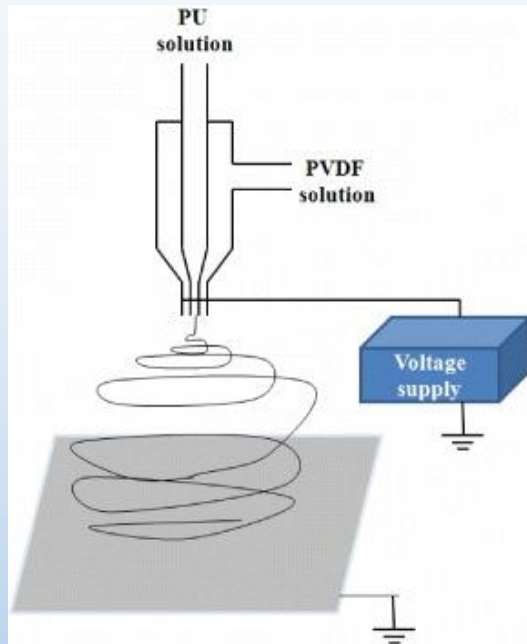
- Elektrické pole překoná povrchové napětí polymeru

- Polymer je v elektrickém poli tažen ke kolektoru a vytváří nanovláknenná struktura



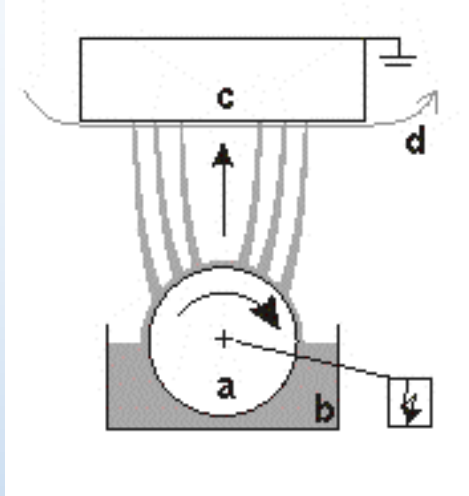
Taylorův kužel

# Koaxiální elektrospinning



- jedna nebo více koaxiálních trysek formující strukturu jádro - plášť
- enkapsulace bioaktivních substancí a léčiv (růstové faktory, buňky, ATB )
- konstrukce scaffoldů s řízeným uvolňováním léčiv

# Nanovláknna – průmyslová výroba



## Principy bezjehlového electrospinningu

- a - electrode metal roller as positive electrode
- b - reservoir of polymer solution
- c - electrode ground shield
- d - textile substrate (supportive material)



## Výhody

- produkce nanovláken v průmyslovém měřítku

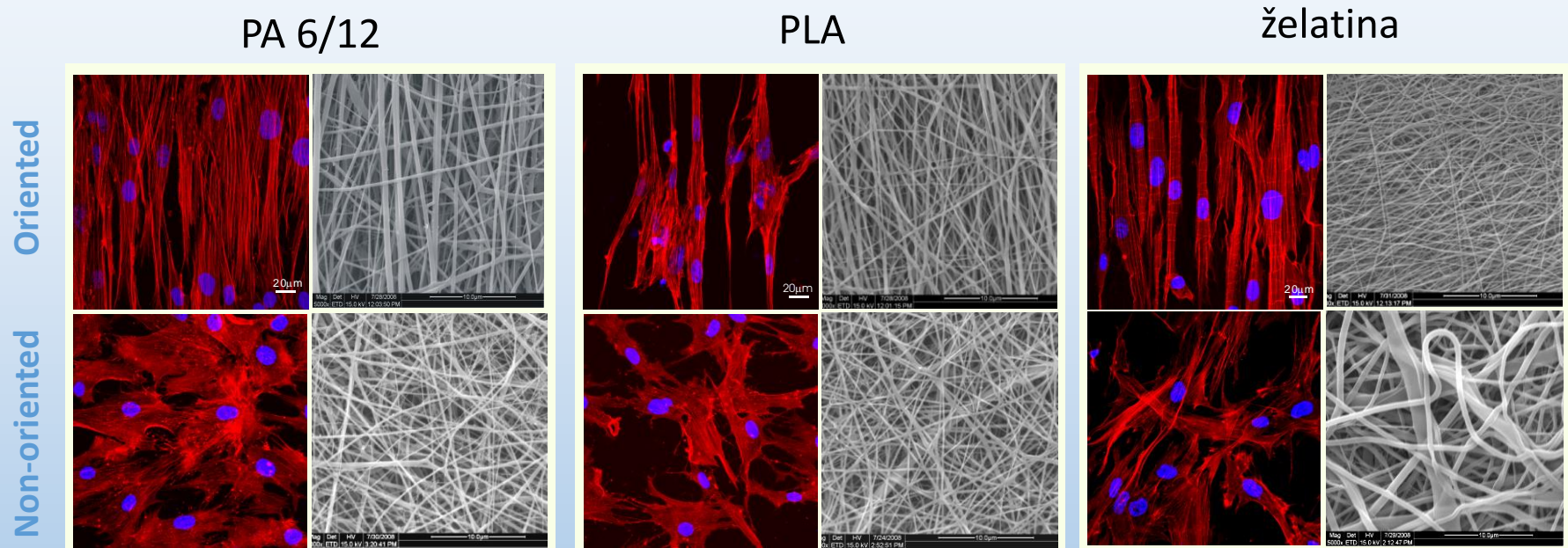
## Aplikace

- Filtrace
- Textil, ochranné oděvy
- Kryty ran



# Nanovlákná – nosiče kmenových buněk

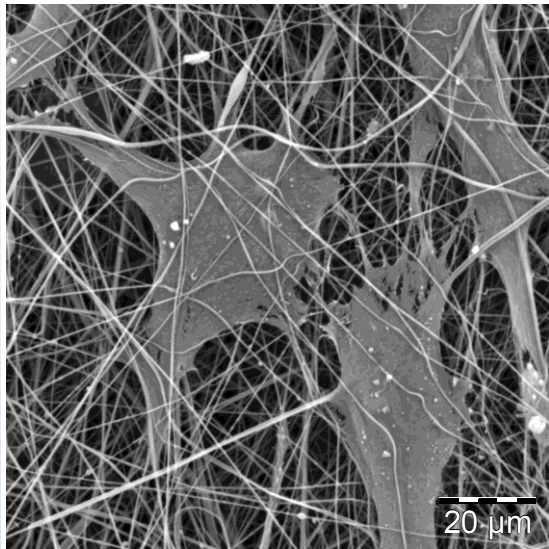
## Růst kmenových buněk na nanovláčknech



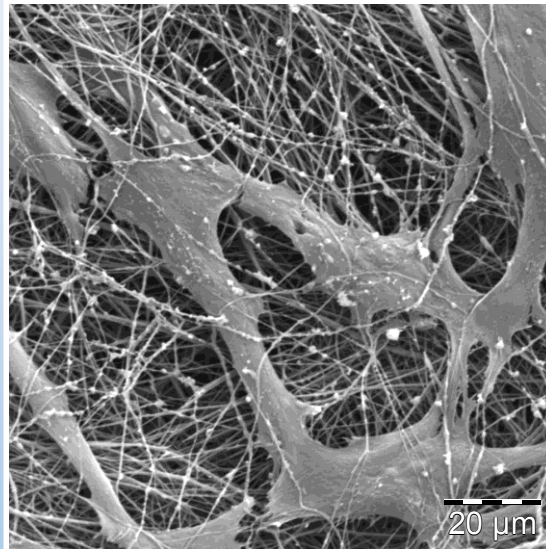
- ✓ Tvar a růst buněk ovlivňuje struktura nanovláčenného nosiče

# Nanovláknna v tkáňovém inženýrství

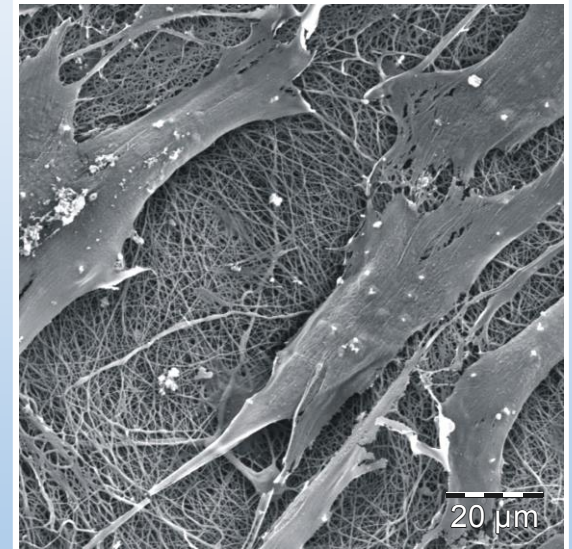
## Růst kmenových buněk na nanovláčknech - SEM



gelatin



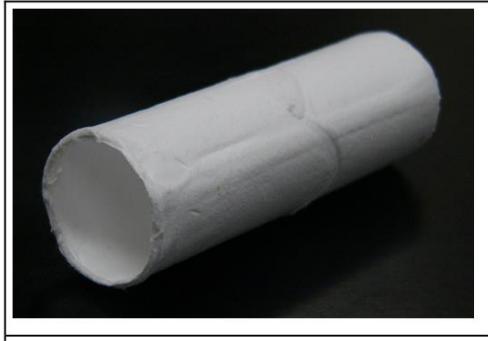
PLA



PUR

# Nanovláknna v tkáňovém inženýrství

Umělá céva



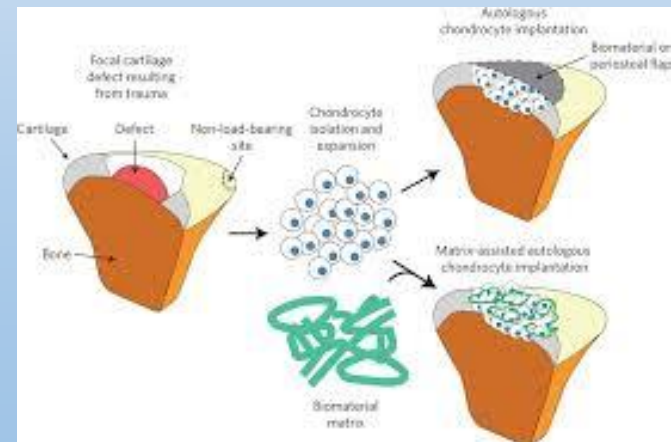
Umělá kost



Umělá trachea



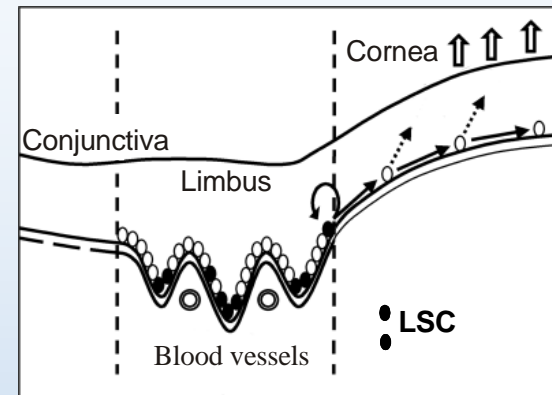
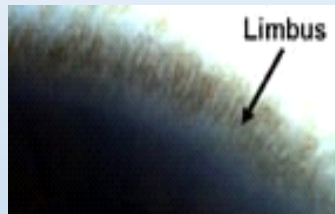
Léčba poškozených chrupavek



# Rekonstrukce poškozené rohovky pomocí limbálních kmenových buněk na nanovláknenném nosiči

## Limbální kmenové buňky (LSC)

- ✓ Kmenové buňky limbu
- ✓ při poškození diferencují a obnovují rohovku



Chee et al. Limbal stem cells: the search for a marker. *Clin Exp. Ophthalmol.* 34, 64-73, 2002.

## Deficience LSC

- ✓ Stevens-Johnson syndrom
- ✓ Poškození – chemické - louh



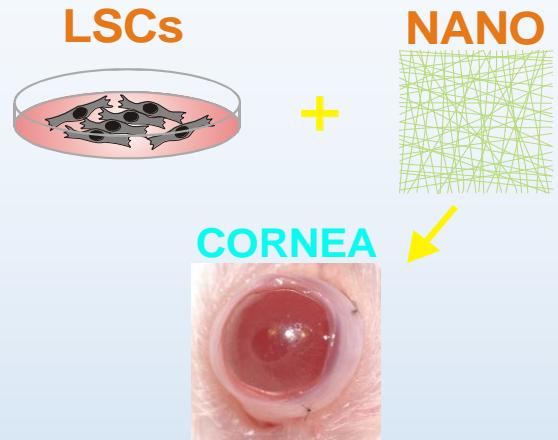
Alkalické poškození Stevens-Johnson syndrom

**Léčba** – transplantace rohovky, transplantace **LSC** na amniové membráně alternativa – nanovláknenný nosič

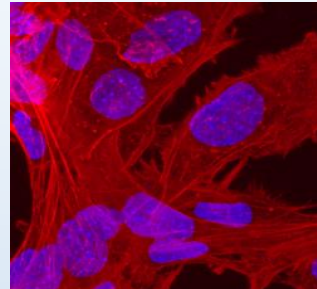
# Rekonstrukce poškozené rohovky pomocí limbálních kmenových buněk na nanovláknenném nosiči



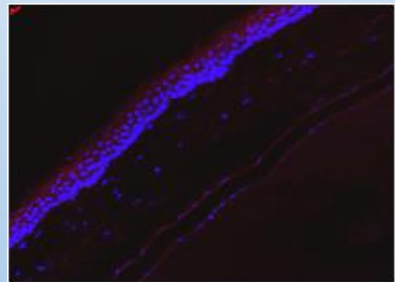
BALB/c  
inbrední myši



Nanovláknenný nosič - PA6/12

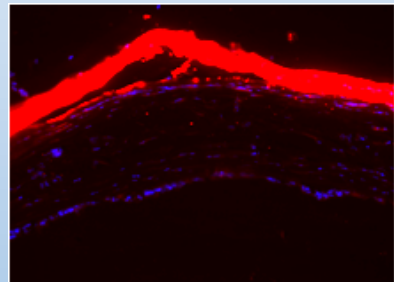


DAPI – buněčná jádra

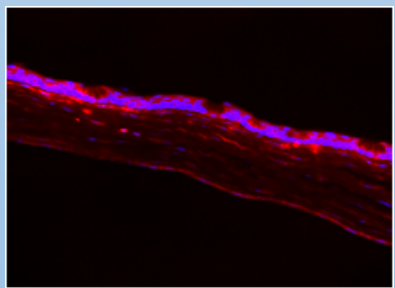


Control cornea

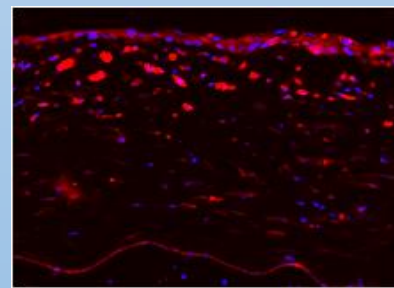
PKH26 – LSC + MSC



2 days after LSC transfer

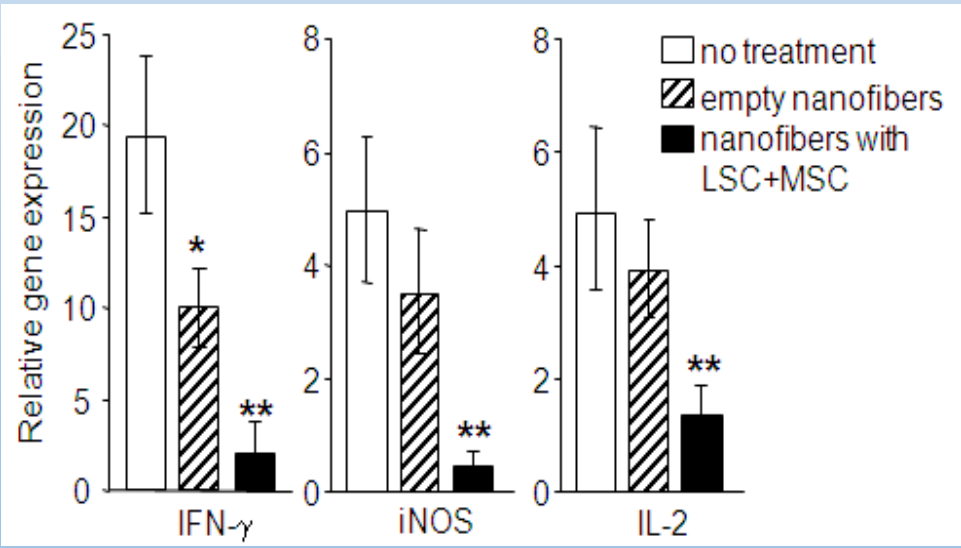


7 days after LSC transfer



14 days after LSC transfer

## Potlačení zánětlivé reakce u poškozené rohovky aplikací limbálních a mezenchymálních kmenových buněk na nanovláknenném nosiči

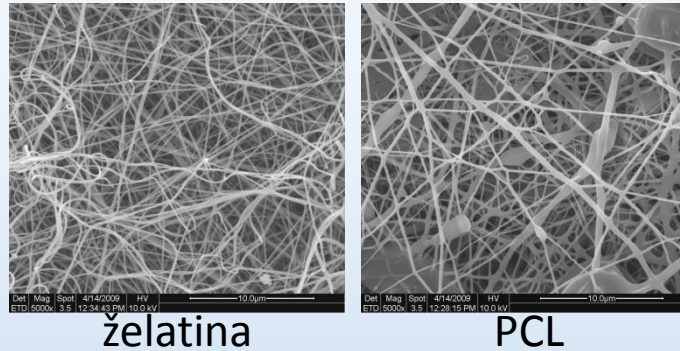


# Nanovlákná jako kryty ran

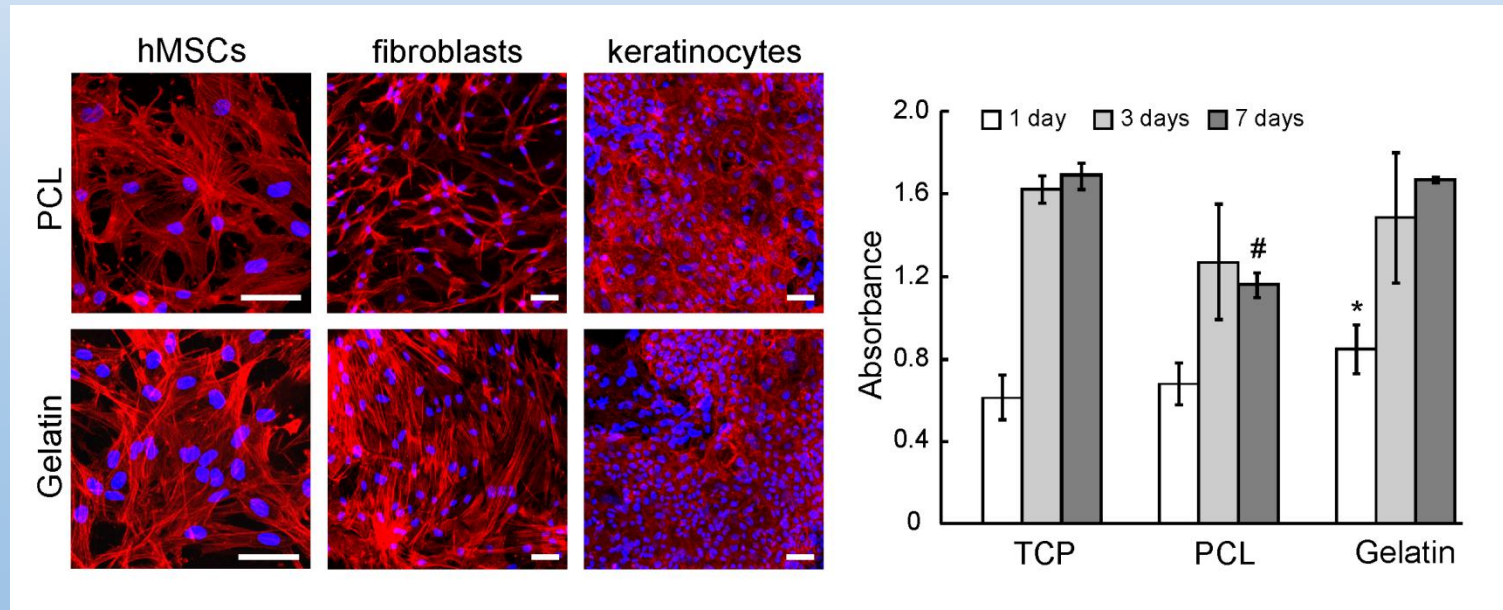
- 50% chronických ran je rezistentní k léčbě
- Diabetická noha
- Bércové vředy
- Dekubity
  
- Komerční biologické kryty (Dermagraft™, Apligraf™ ) – 3D dermální substituty obsahující scaffold osazený fibroblasty a keratinocyty
  
- **Nanovlákná jako kryty ran:**
  - Porozita
  - Permeabilita pro kyslík a vodu
  - Absorpce tekutin
  - Ochrana rány před bakteriální penetrací a dehydratací

# Nanovlákná jako kryty ran

## Nanospider™ technology

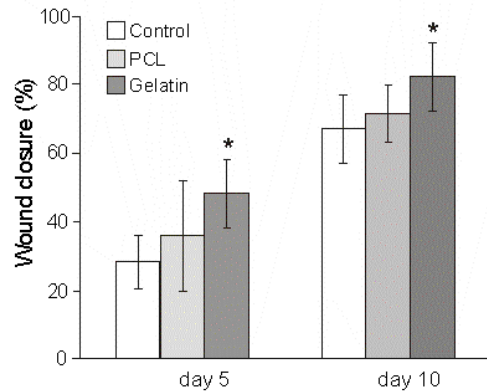
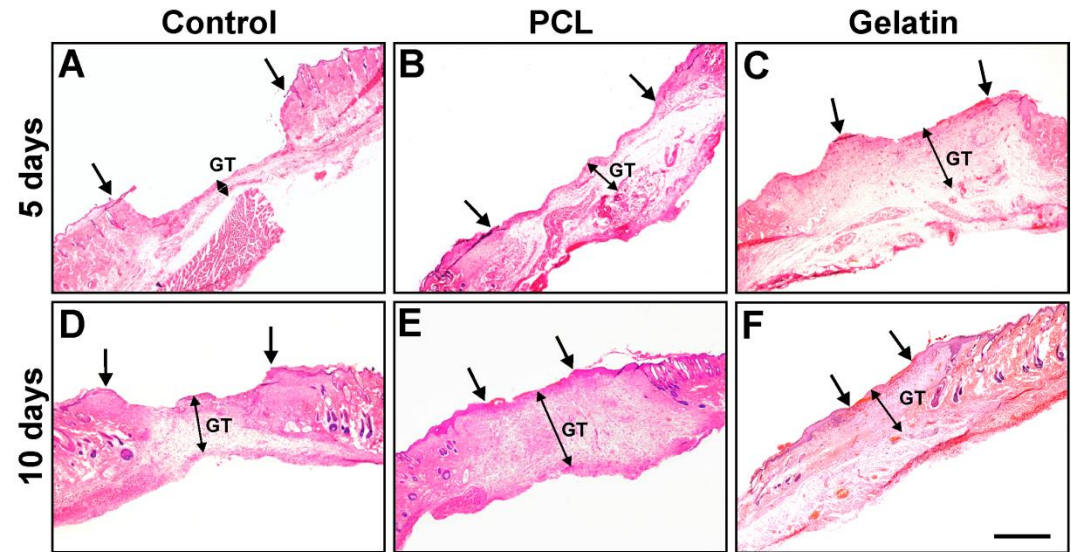
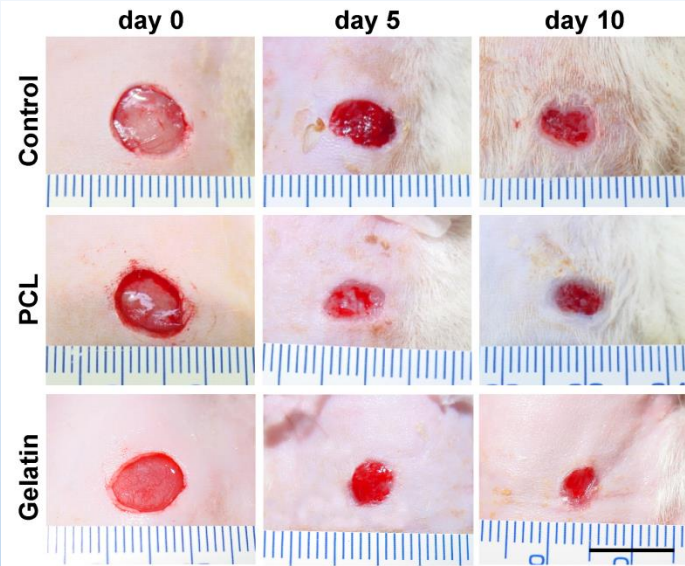


## Růst buněk na nanovlákněch



# Nanovláknna jako kryty ran

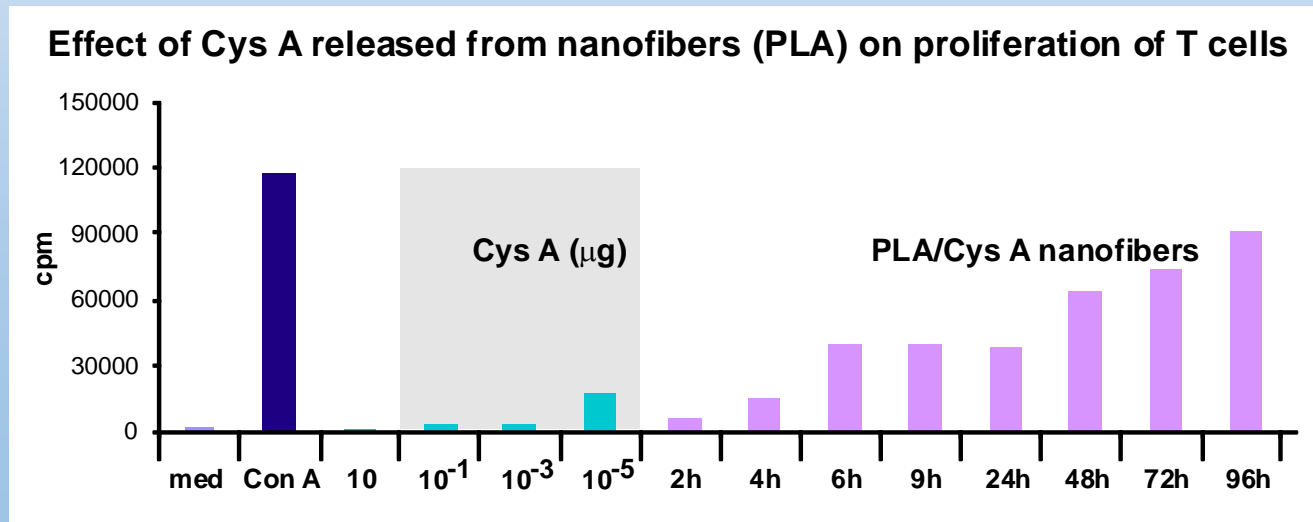
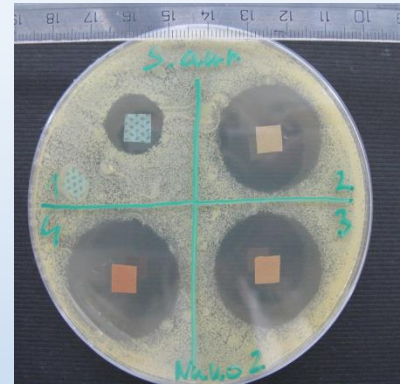
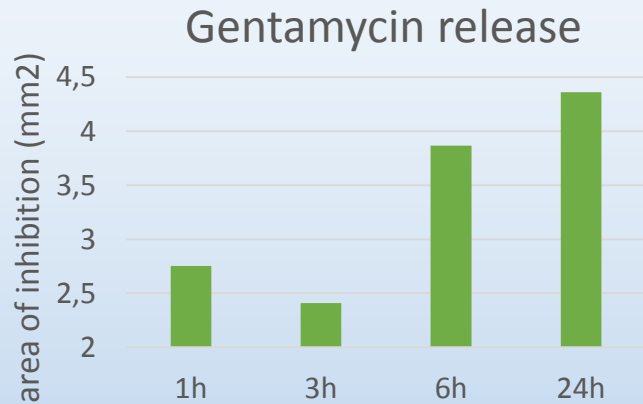
## Kontrakce rány



**Závěr:** Nanovláknna z želatiny významně urychlila hojení ran u potkana.

# Nanovlákná jako nosiče léčiv

Nanovlákná s regulovaným uvolňováním gentamycinu and cyclosporinu A



# Umělé náhrady tkání – biologický scaffold

- Odstranění buněk z tkání pomocí enzymů a detergentů – **decelularizace**  
*Srdce, cévy, kůže, svaly, šlachy, tenké střevo, močový měchýř, játra, plíce, atd.*
- Složení – extracelulární matrix (ECM) specifická pro danou tkáň  
*kolagen, glykosaminoglykany, růstové faktory (b-FGF, VEGF, TGF- $\beta$ )*
- **3D architektura** – struktura stejná jako původní orgán nebo tkáň
- **Biodegradabilita, biokompatibilita**
- **Možnost vytvoření celého orgánu**  
Re-celularizace scaffoldu specifickými buňkami

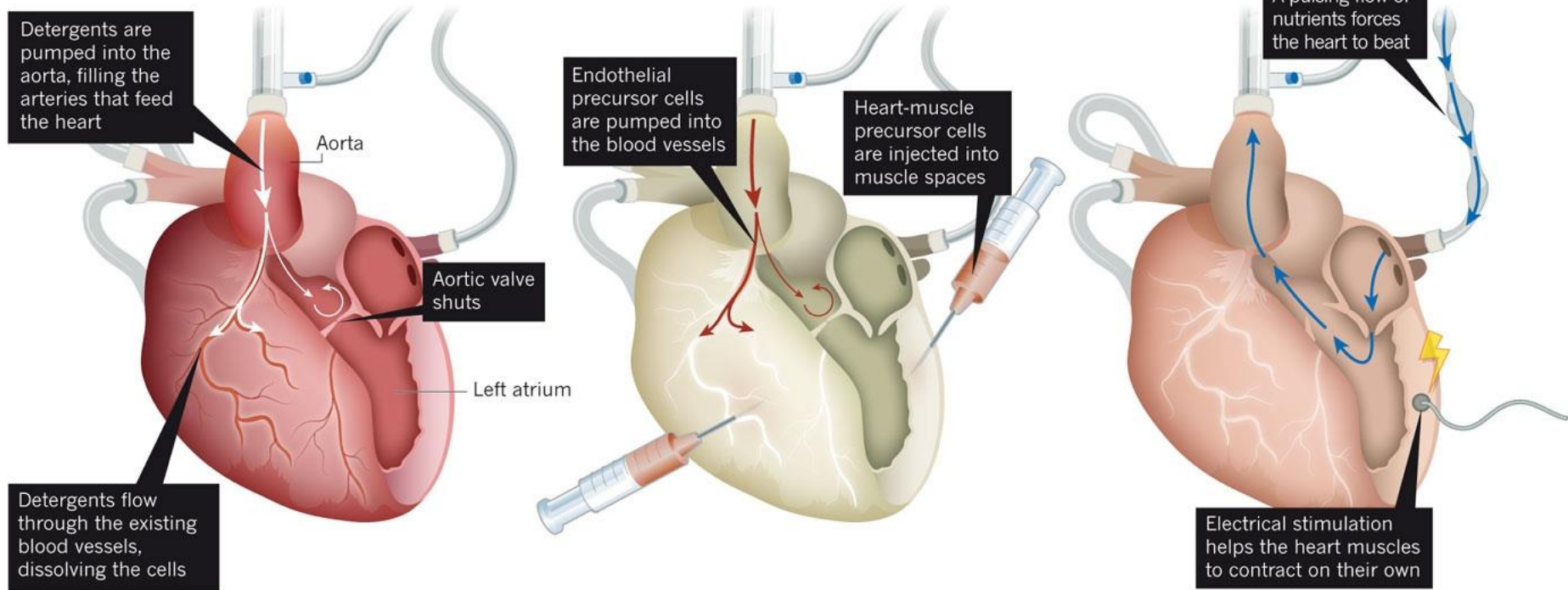


# Umělé náhrady tkání – biologický scaffold

Decelularizace prasečího srdce – zachování struktury orgánu

## CUSTOMIZED ORGANS

To construct a new heart, researchers first remove all cells from a donor organ (left), leaving a protein scaffold. That is seeded with cells (centre), which mature under the influence of growth factors and mechanical stimulation (right).



Odstranění buněk z orgánu pomocí enzymů a detergentů  
Vytvoření scaffoldu

Osazení (re-celularizace) scaffoldu buňkami srdečního svalu a cév

Promývání orgánu živným roztokem, mechanická a elektrická stimulace – samostatné kontrakce

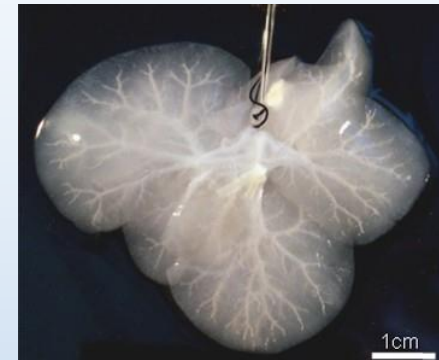
# Umělé náhrady tkání – biologický scaffold



Decelularizované prasečí játra



Decelularizovaná játra potkana

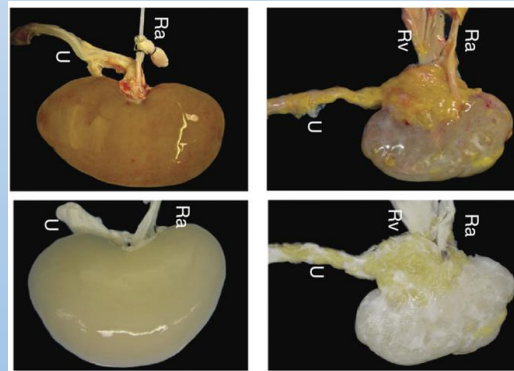


Decelularizovaná játra potkana



YouTube

srdce



Decelularizovaná ledvina



Decelularizované plíce

# Hydrogely

- Hydratované polymerní materiály (gely)
- Vysoký obsah vody (> **97%**)
- Biokompatibilita
- Fyzikální a chemické vlastnosti lze modifikovat
- Porozita – lze modifikovat různými porogeny
- Mechanická podpora buňkám a vrůstající tkáni

## Přírodní polymery

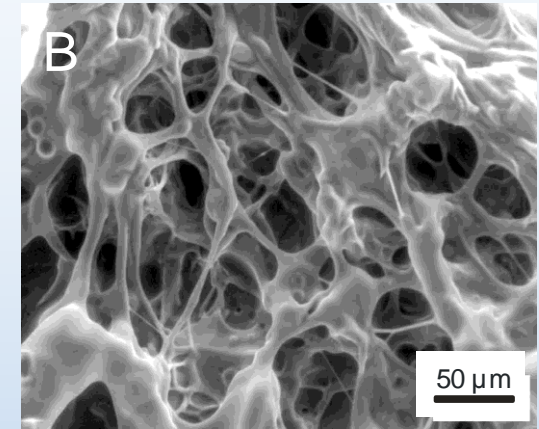
kolagen, alginát, agar, chitosan, fibrin, atd.

## Synthetické hydrogely

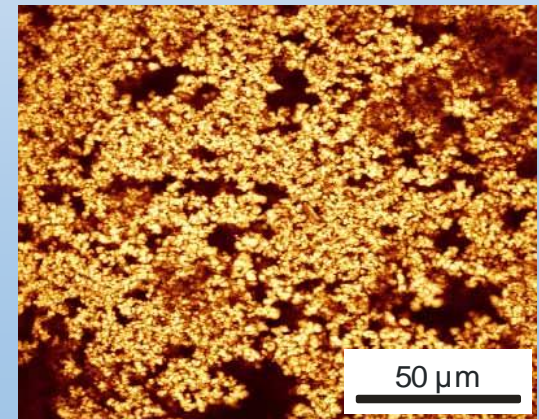
poly(2-hydroxyethyl methacrylate) HEMA

poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] HPMA

## HEMA



## HPMA-RGD



# Hydrogely v regeneraci míšního poškození

- **Poranění míchy** – nevratná ztráta motorických a sensorických funkcí v důsledku omezené schopnosti regenerace přerušovaných axonů v oblasti léze.
- **Příčiny:** traumatické – automobilové nehody (50%), úrazy při sportu (14%), pády (20%), střelné a bodné poranění, nádory, cysty, krvácení, vývojové vady
- 10 tis. nových pacientů ročně (USA)

## Komplikace:

Trombóza, spasticita, autonomní dysreflexie, neuropatická bolest, ztráta kontroly vyprazdňování, dekubity, syringomyelie, sexuální dysfunkce, infekce...



## Paralýza dle rozsahu poškození

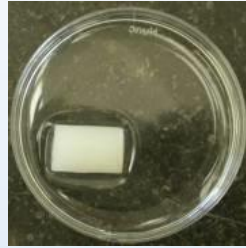


## V současné době nexistuje účinná léčba terapie míšního poranění

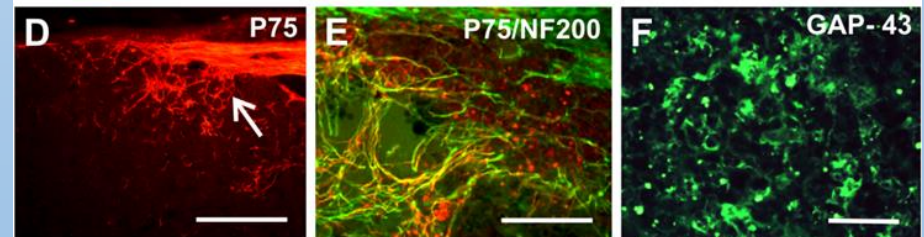
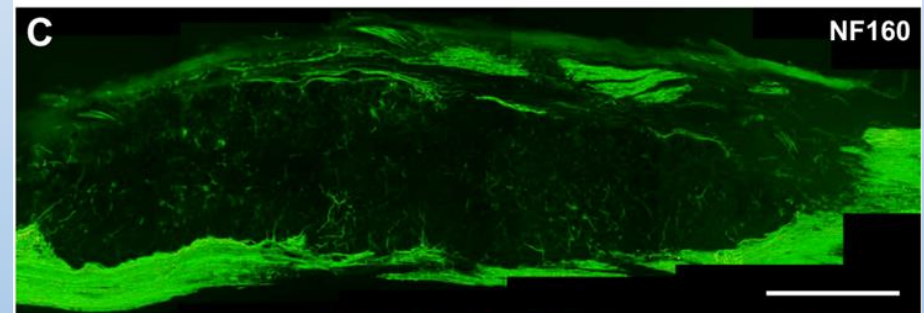
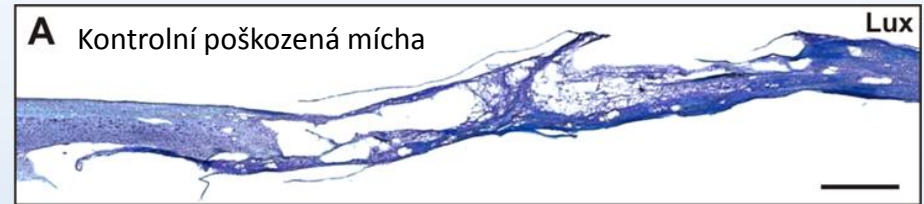
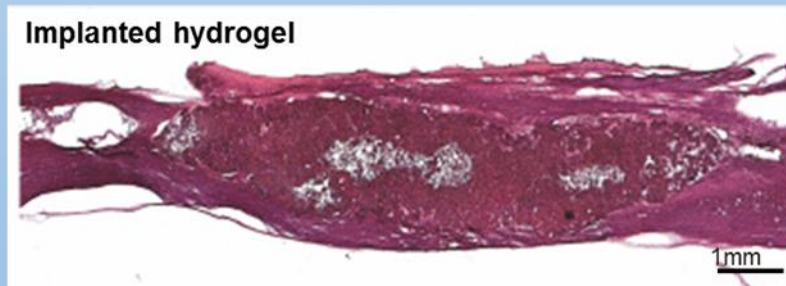
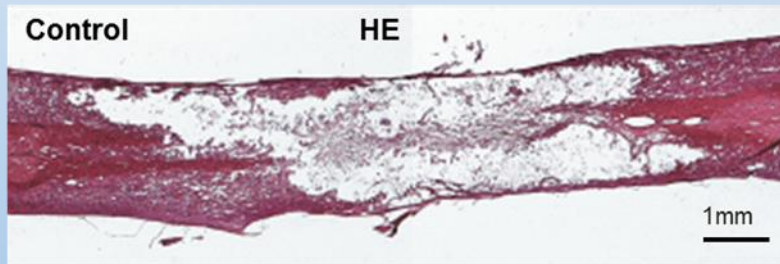
- stabilizace, rehabilitace, medikace (bolest, spasticita), moderní technologie (electronické stimulátory)

# Regenerace poškozené míchy pomocí hydrogelů a kmenových buněk

## Přemostění kavity pomocí biomateriálu

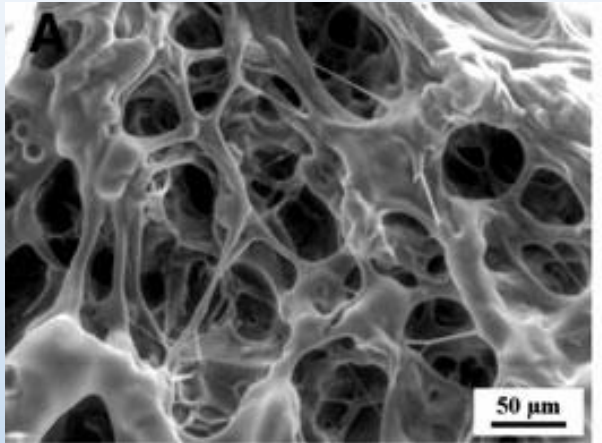


*Míšní poranění – chronická léze*

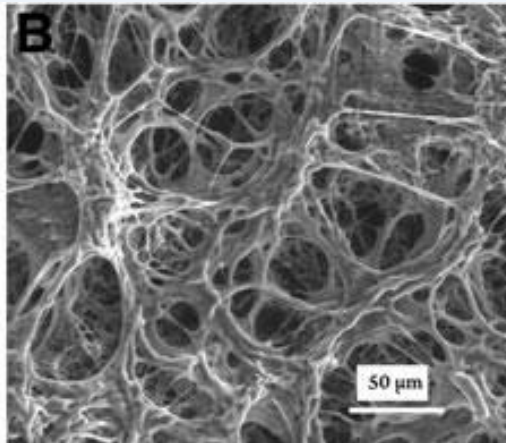


# Hydrogely v regeneraci míšního poškození

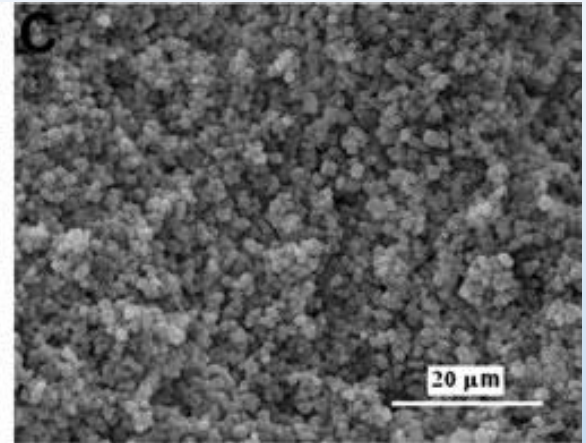
HEMA-MOETACI  
solid porogen



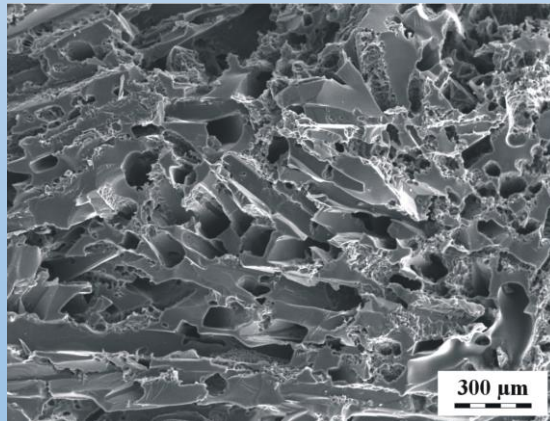
HPMA-RGD  
solid porogen



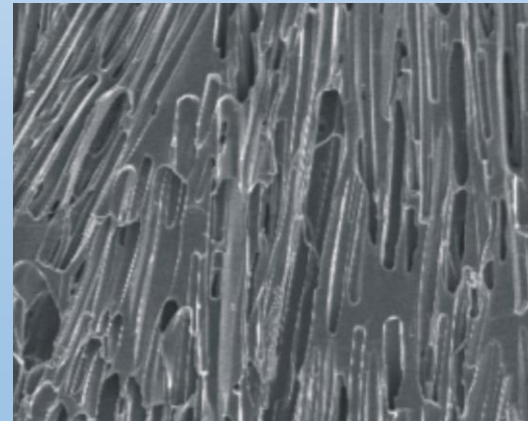
HPMA-RGD  
heterophase separation



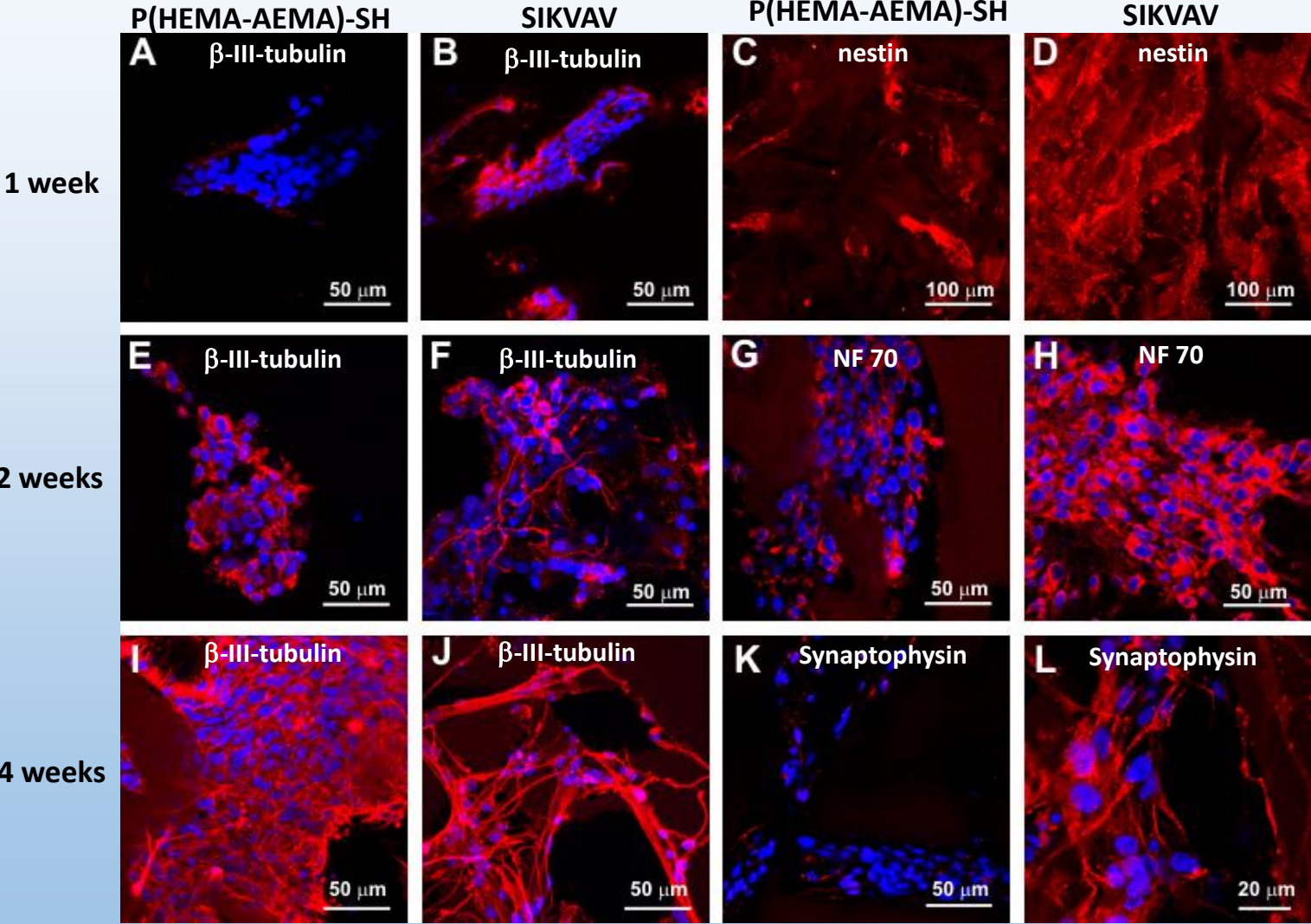
HEMA-SIKVAV  
solid porogen



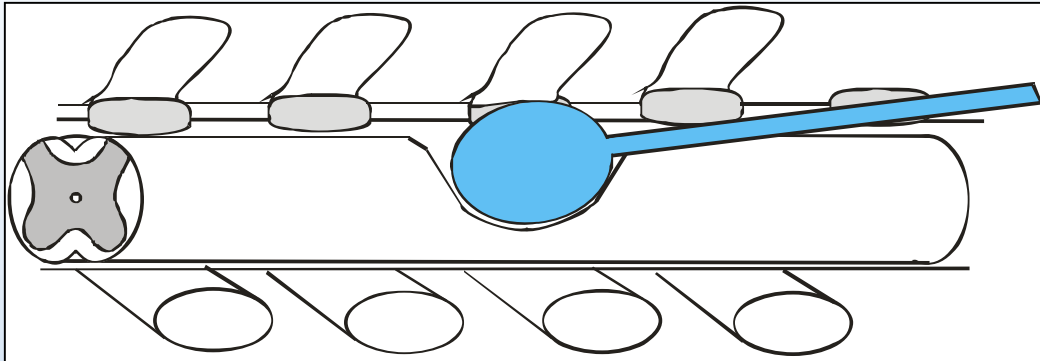
HEMA-SIKVAV  
oriented pores



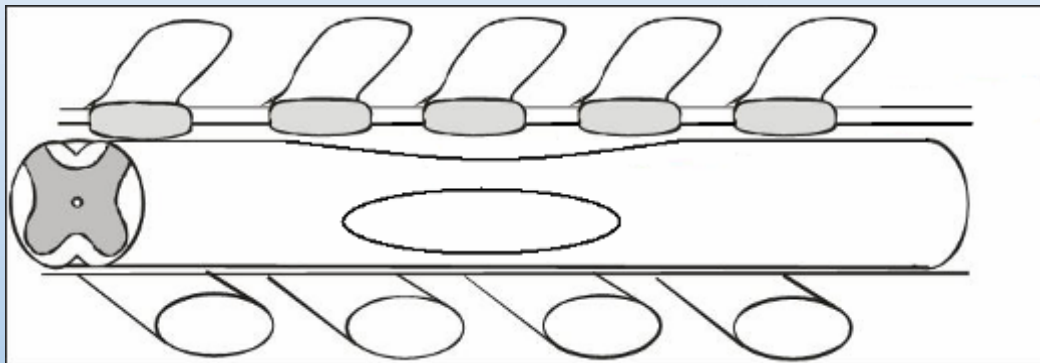
# Diferenciace neurálních prekursorů na SIKVAV- modifikovaném hydrogelu



# Experimentální model chronické míšňí léze

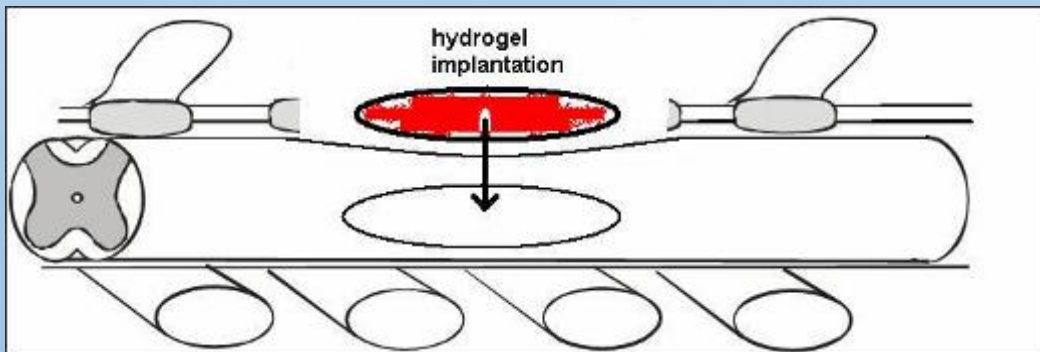


balónková kompresní léze



posttraumatická kavita

*5 neděl po indukci léze*

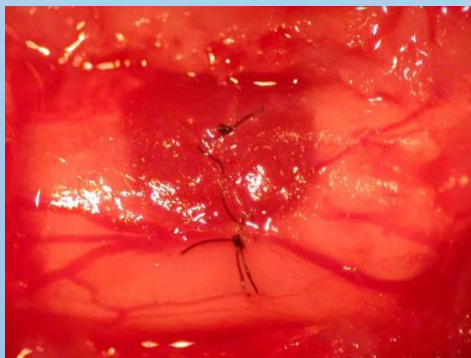
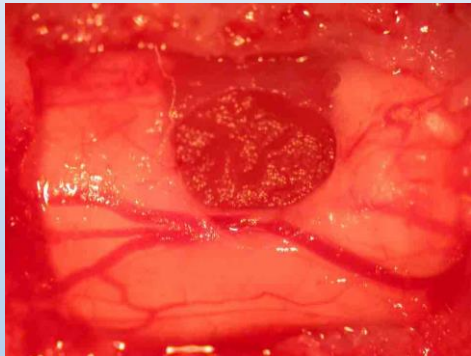
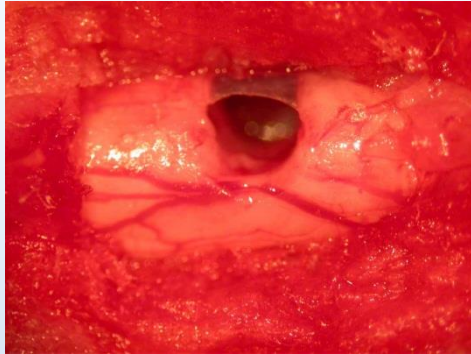


Implantace hydrogelu

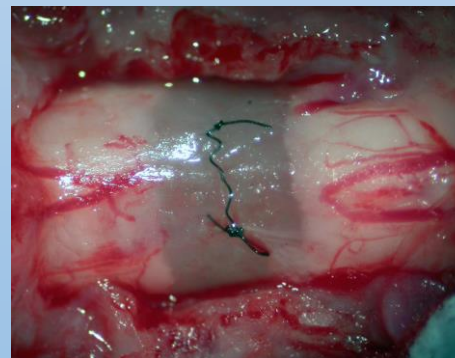
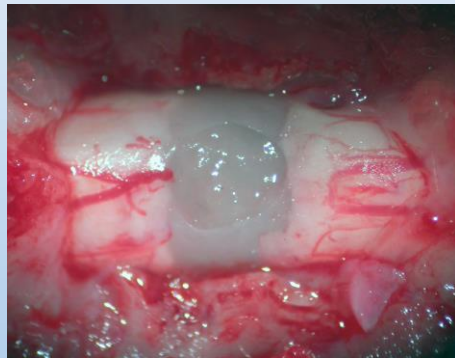
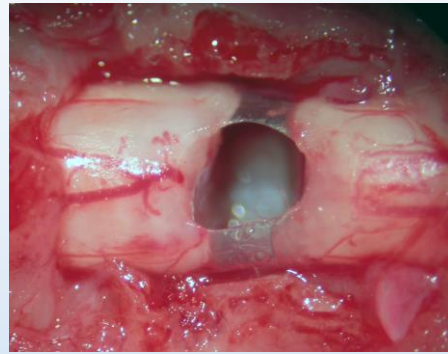
*Přemostění léze*

# Implantace hydrogelu do modelu míšního poranění

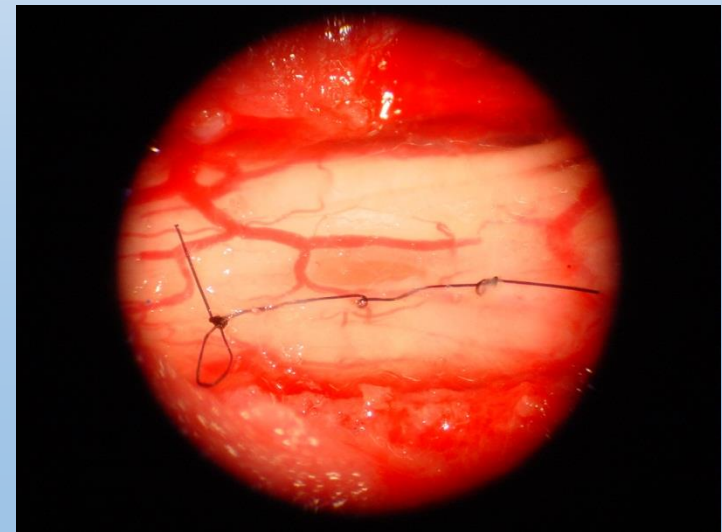
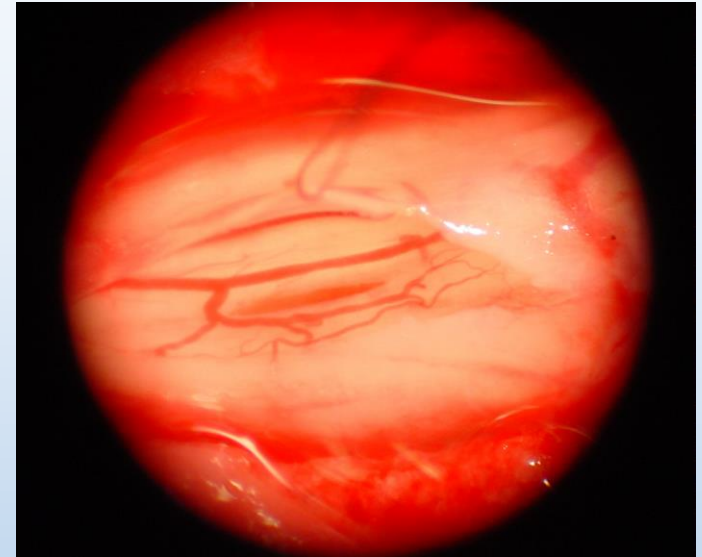
hemisekce



transekce

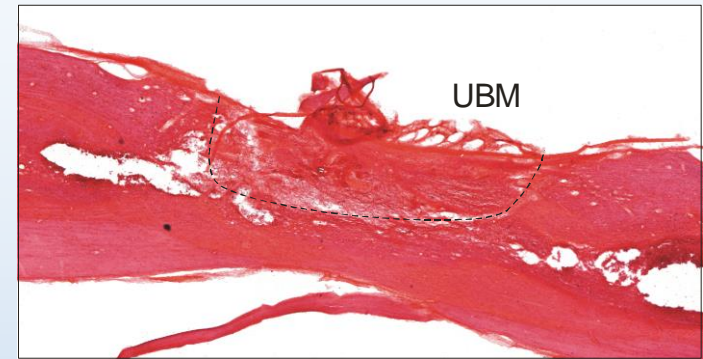


balónková kompresní léze

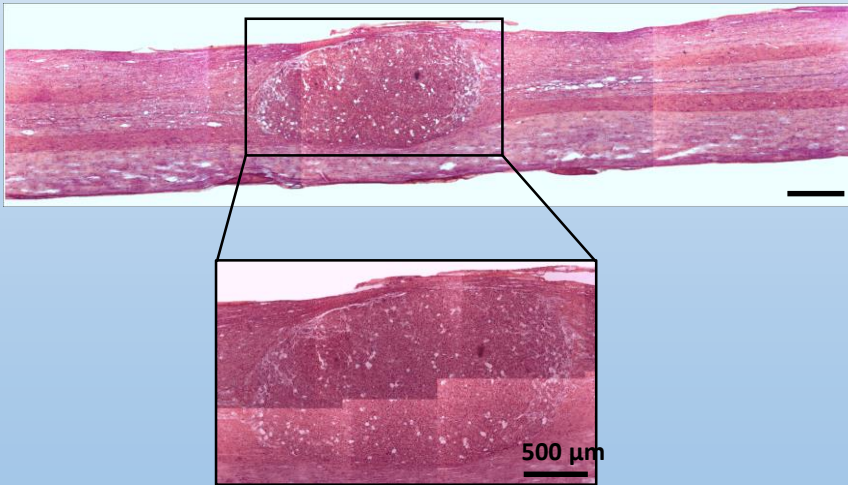


# Integrace hydrogelu do modelu míšního poranění

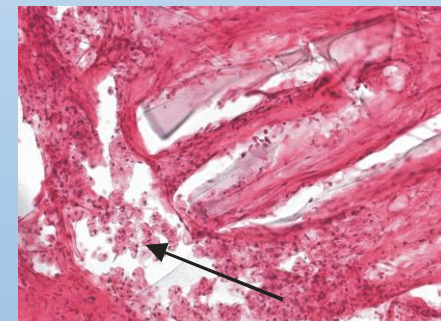
- **Hematoxylin-eosin staining**
- Tissue ingrowth
- Scaring - fibrosis
- Immune reaction – macrophages
- Scaffold degradation



*Urinary bladder matrix (UBM) hydrogel implanted into spinal cord hemisection - 2 weeks after the implantation*



*HPMA-RGD hydrogel implanted into spinal cord hemisection 2 months after transplantation*

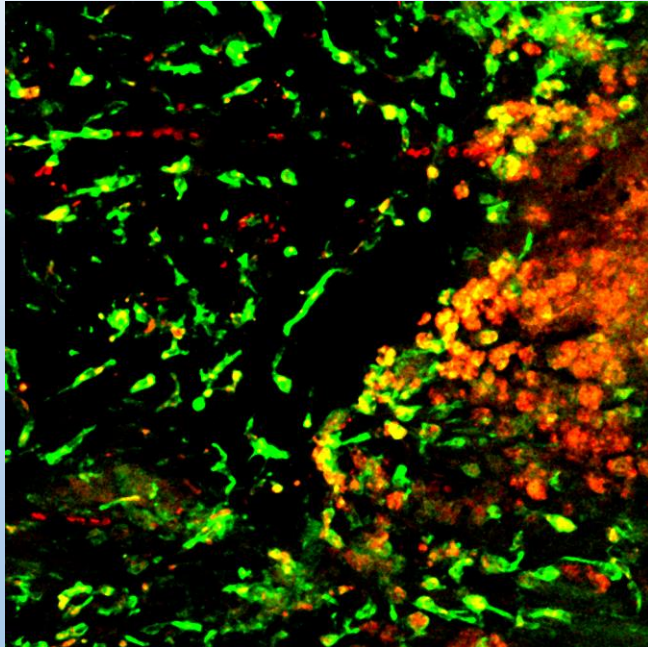


*Macrophage reaction to stiff hydrogel HEMA-SIKVAV*

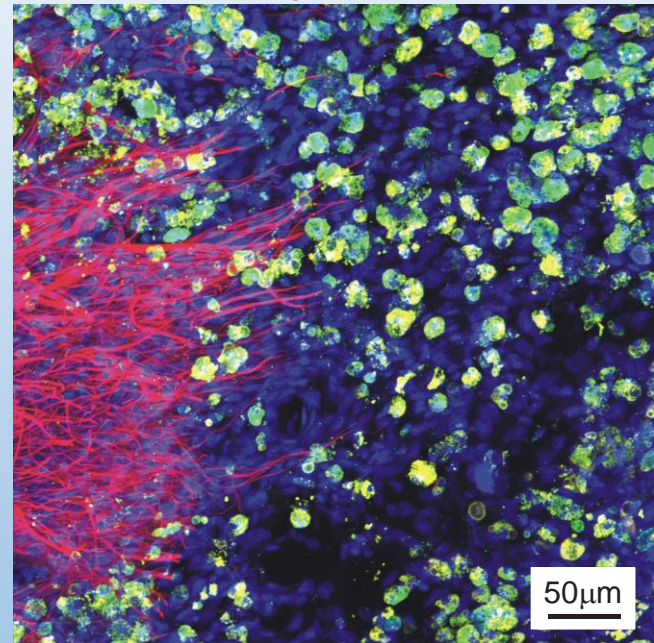
# Integrace hydrogelu do modelu míšního poranění

- Macrophages/microglia reaction – degradable vs. non-degradable material
- M1 (pro-inflammatory) vs. M2 (anti-inflammatory) macrophages

M1 (red) vs. M2 (green) macrophages



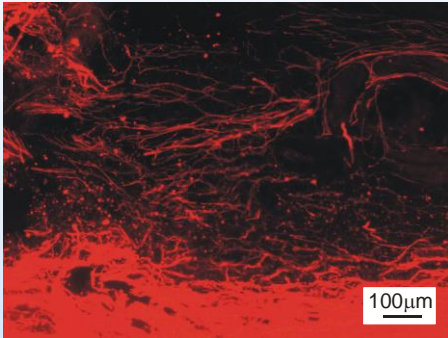
Astrocytes (GFAP)/  
Macrophages (Ed1)/DAPI



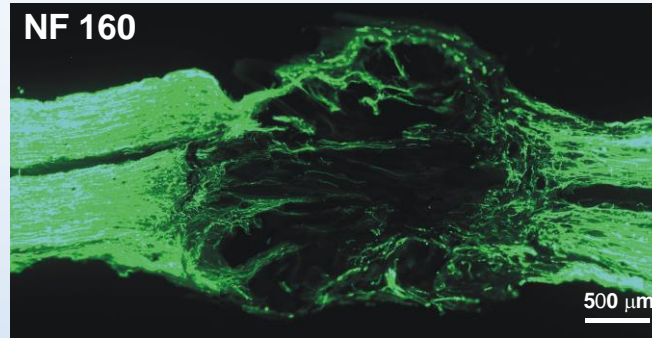
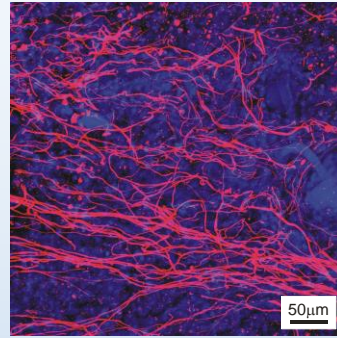
*Degradable biological scaffold*

# Integrace hydrogelu do modelu míšního poranění

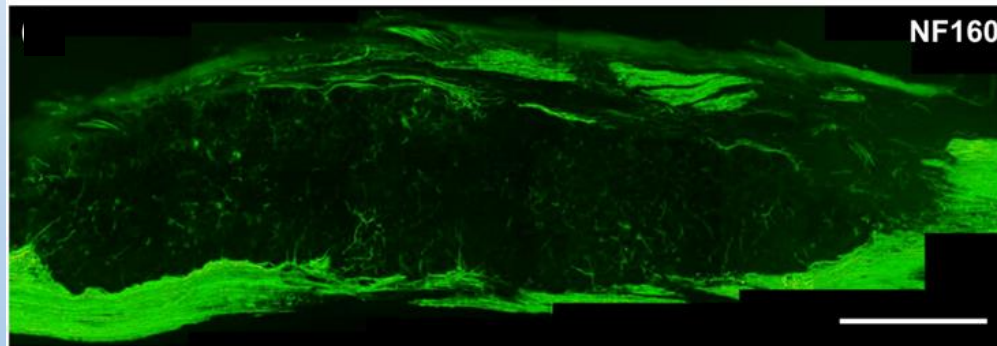
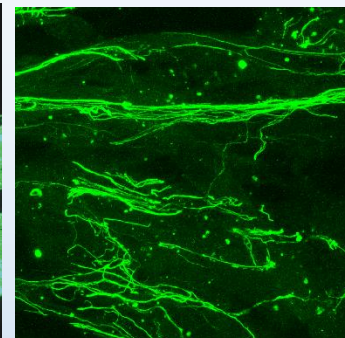
## Vrůstání axonů - neurofilameta



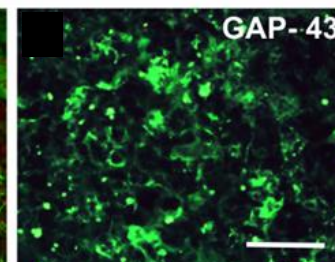
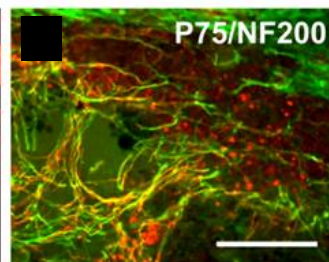
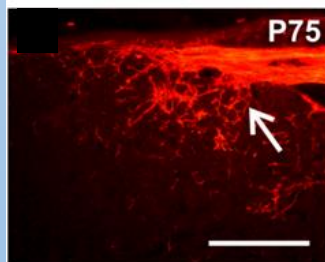
*Degradable biological scaffold – hemisection – 2 weeks*



*SIKVAV-HEMA with oriented porosity – transection – 2 months*



p75 – Schwann cells



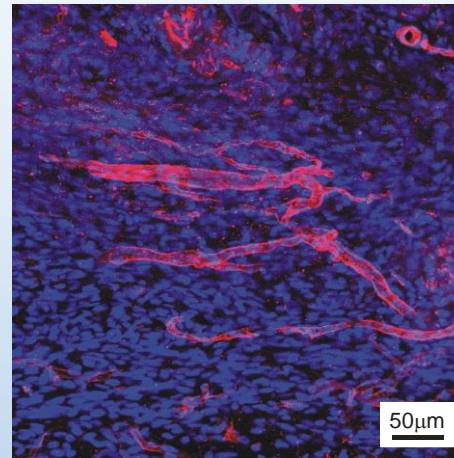
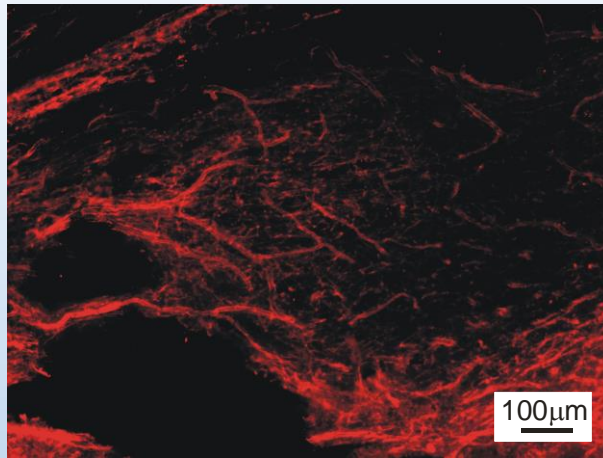
GAP43 – neuronal growth cone

*HPMA-RGD - chronic lesion 6 months after implantation*

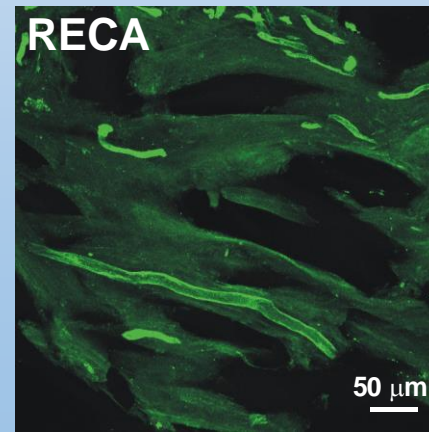
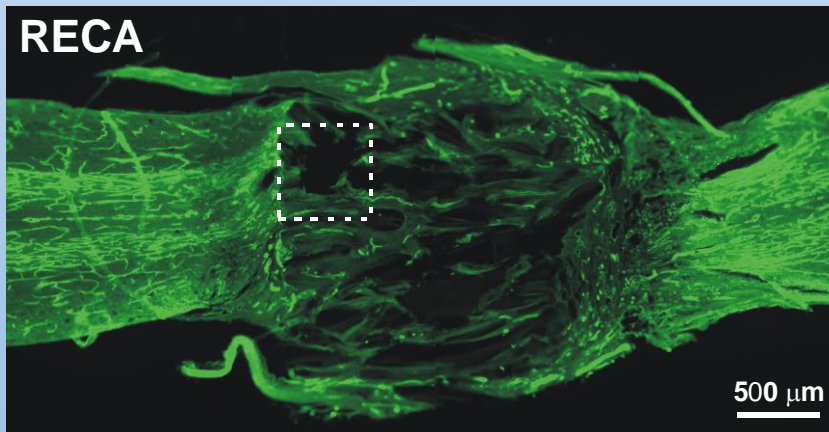
# Integrace hydrogelu do modelu míšního poranění

## Vaskularizace – prorůstání cév

Blood vessels (RECA)



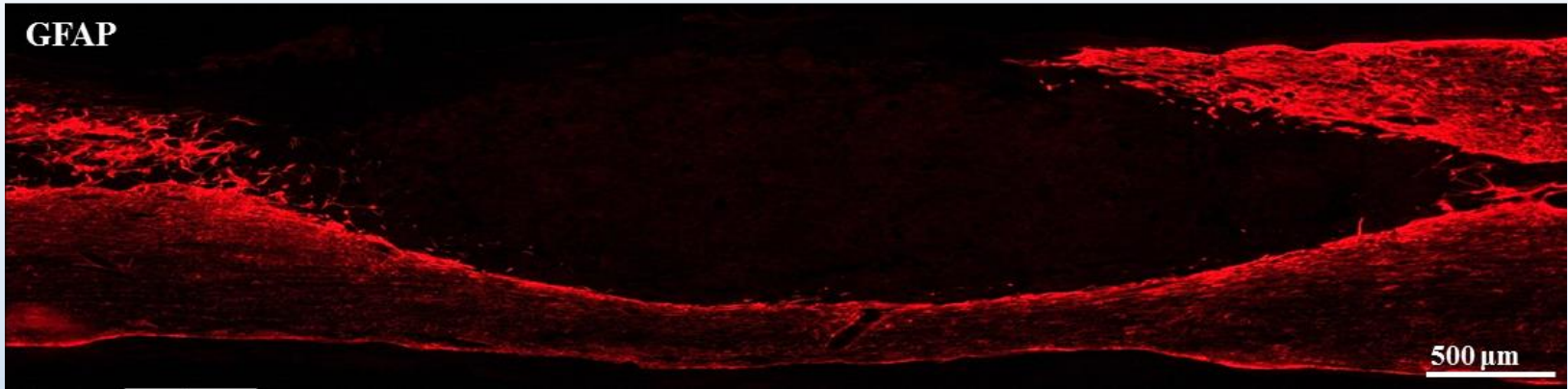
*Degradable biological scaffold*



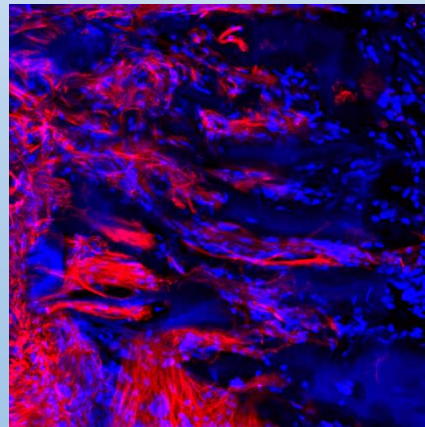
*SIKVAV-HEMA with oriented porosity - transection*

# Integrace hydrogelu do modelu míšního poranění

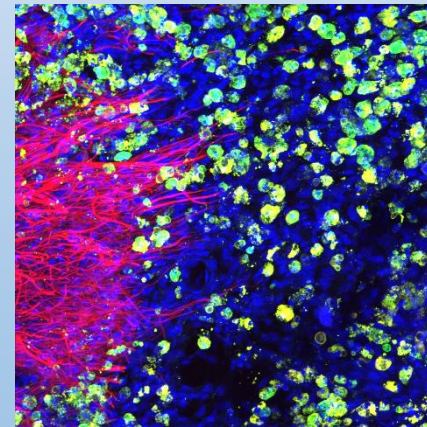
## Astrocyty - GFAP staining



*HPMA-RGD hemisection – 2 months*

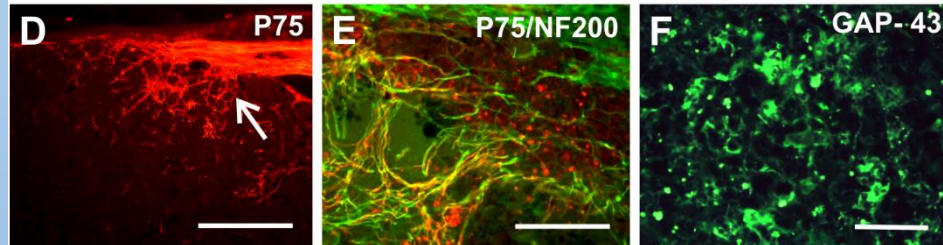
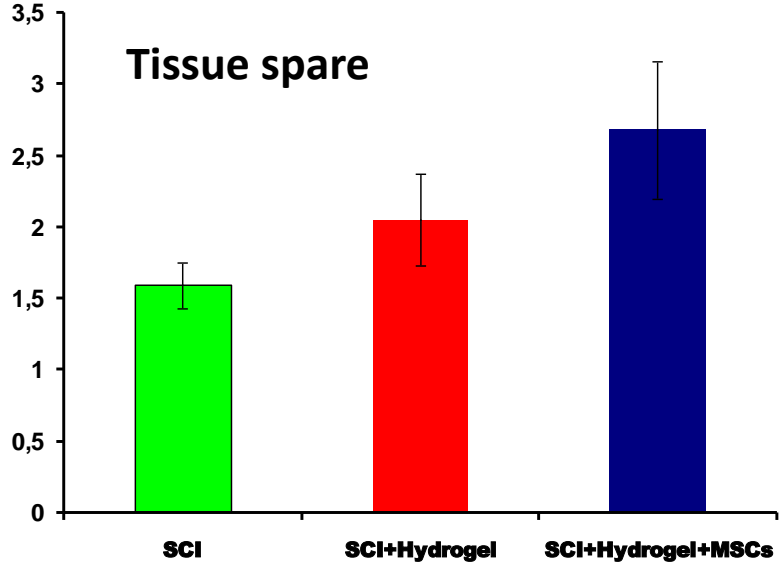
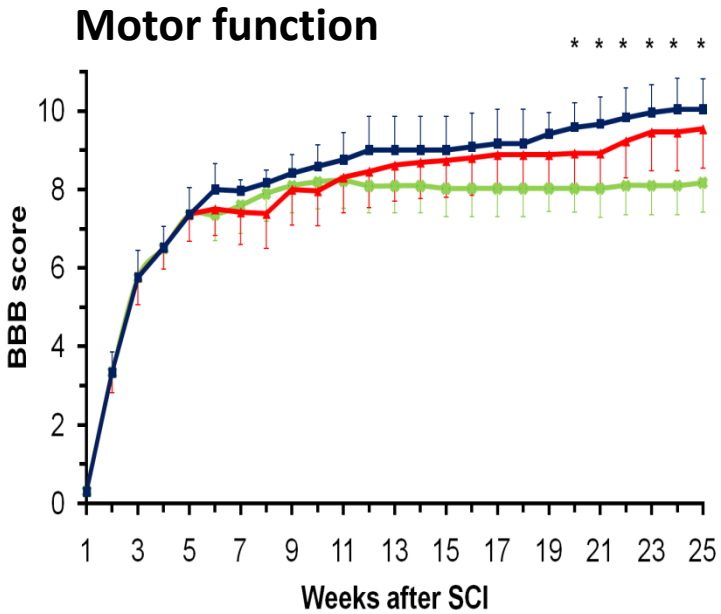


*SIKVAV-HEMA with  
oriented porosity –  
transection – 6 months*



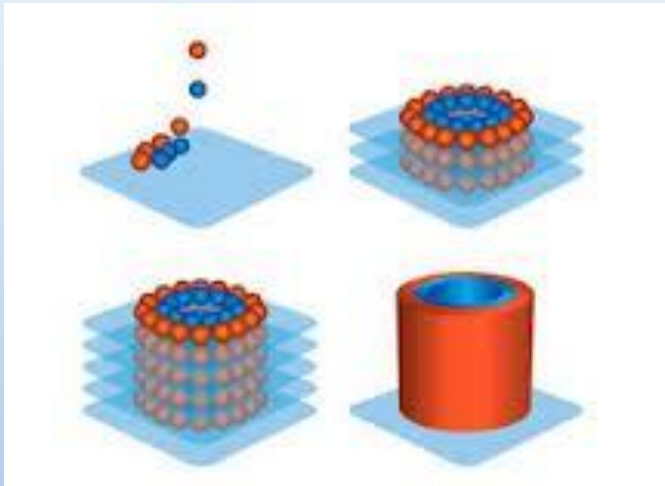
*Degradable biological  
scaffold – hemisection 2  
weeks*

# Léčba chronické míšňí léze HPMA-RGD hydrogelem a MSC



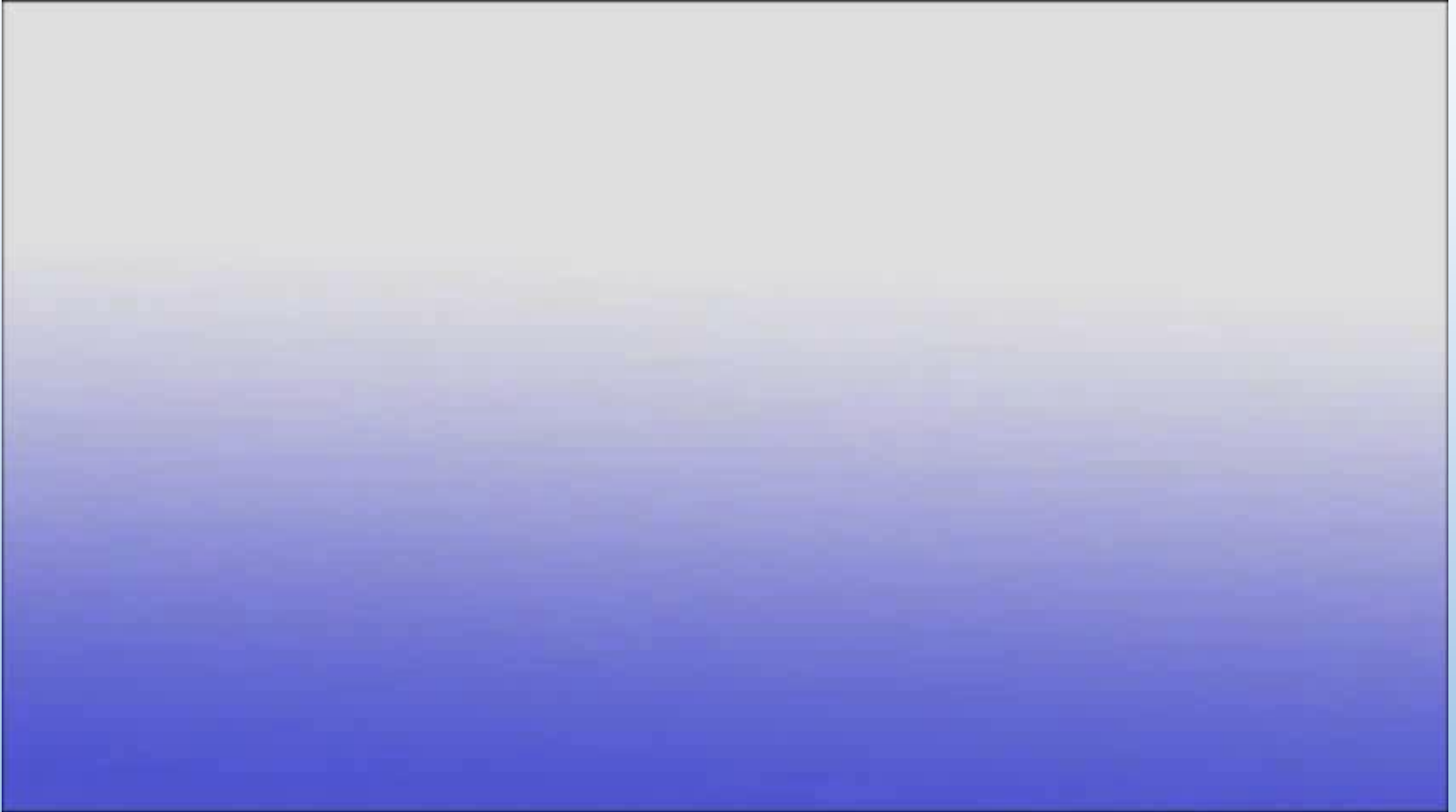
# Umělé náhrady tkání – bioprinting

- 3D tiskárny umělých tkání
- Kombinace biomateriálu (kolagen) s buňkami – vrstvení
- Výroba tkání a orgánů na míru pacienta



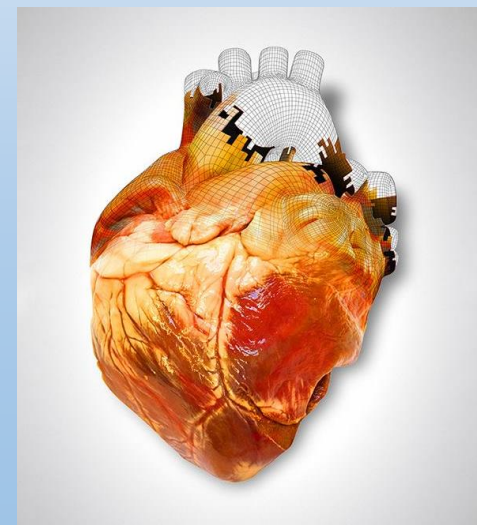
# Umělé orgány – bioprinting

YouTube



# Budoucnost regenerativní medicíny

- Léčba nemocí a poranění, které v současnosti nelze léčit – cukrovka, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza, svalová dystrofie, genetické poruchy ....
- Nové funkční tkáně a orgány vytvořené z vlastních buněk pacienta – srdce, srdeční chlopně, plíce, játra, ledviny, slinivka, cévy....
- Obnova poškozených tkání:
  - Pohybový aparát - chrupavky, šlachy, kosti, svaly
  - Srdeční tkáně po infarktu
  - Nervových tkání mozku a míchy
  - Kůže
  - Sítnice, rohovka



## ÚEM - Centrum základního biomedicínského výzkumu v ČR 10 vědeckých oddělení

Výzkum v oblasti buněčné biologie a patologie, neurobiologie, neurofyzologie, neuropatologie, vývojové toxikologie a teratologie, molekulární epidemiologie, molekulární farmakologie, imunofarmakologie, výzkumu rakoviny, kmenových buněk a tkáňových náhrad.

**Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad – transfer technologií buněčné terapie, tkáňového inženýrství a nanotechnologií do klinických studií**

**Inovační biotechnologické centrum:**

**Bioinova, s.r.o.** - příprava autologních mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně pro klinické aplikace

**EponaCell, s.r.o.** – příprava a kmenových buněk pro veterinární aplikace

**Aktuální klinické studie:**

- hodnocení bezpečnosti a účinnosti použití kmenových buněk z kostní dřeně pro léčbu amyotrofické laterální sklerózy (FN Motol, Praha)
- bezpečnost a účinnost kmenových buněk kostní dřeně při zpevnění operované rotátorové manžety (FN Motol, Praha)
- léčba posterolaterální spinální fúze (FN Motol, Praha)
- léčba defektu kyčelního kloubu (LF UK, Hradec Králové)



**Centrum buněčné terapie  
a tkáňových náhrad**





# Děkuji za pozornost



## Otázky?

