



Tkáňové inženýrství a tkáňové náhrady

Ing. Roman Matějka, Ph.D.

Metodologie výzkumu v Biomedicínském inženýrství



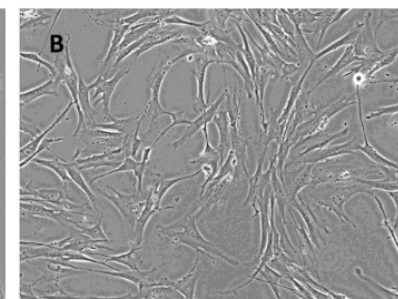
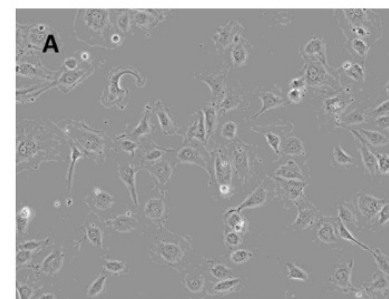
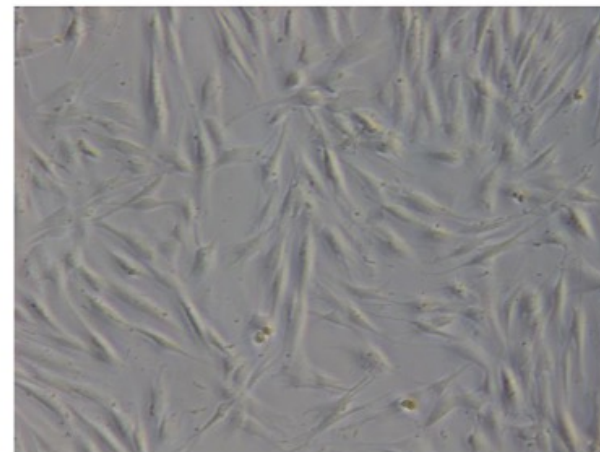
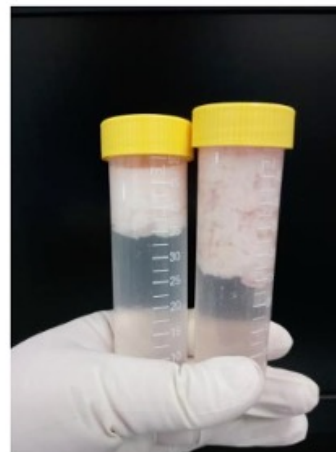
EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání





Buněčné kultury

- Minimalizace animálních pokusů
- Buněčná kultura vytváří modelový – izolovaný - systém
 - Planární podmínky růstu
 - Dediferenciace kultury – změna chování buněk
 - Potřeba zajištění komplexních podmínek in vivo systémů
- Rozdělení buněčných kultur
 - Fenotypizovaná vs. Kmenová buňka
 - Primokultura vs. Buněčná linie
- Požadavky
 - Kultivační médium
 - Zdroj růstových faktorů, hormonů a proteinů
 - Podpůrné látky
 - Inkubátor a aseptická práce

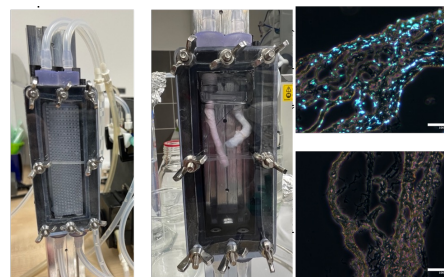




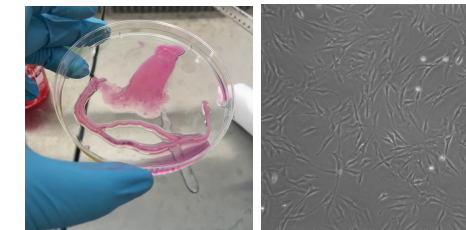
Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína – cévní náhrady

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

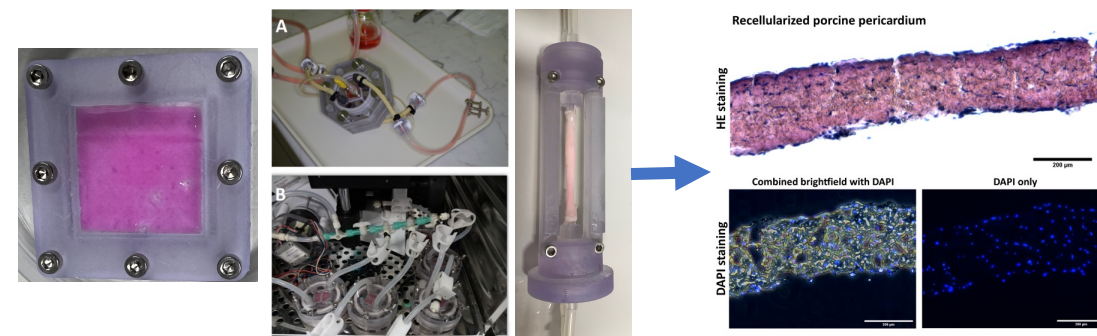
Decelularizace tkání



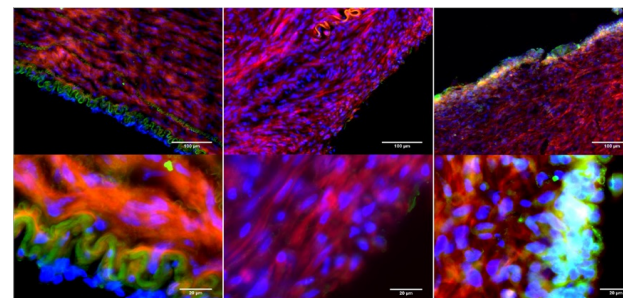
Kmenové a stromální buňky



Rekolonizace v bioreaktoru a příprava implantabilní záplaty



Hodnocení histologie

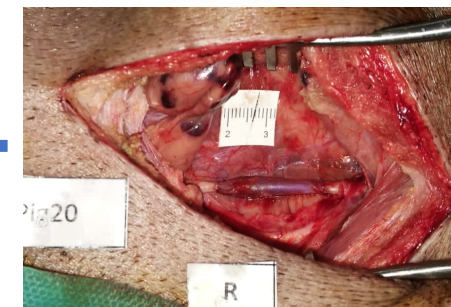


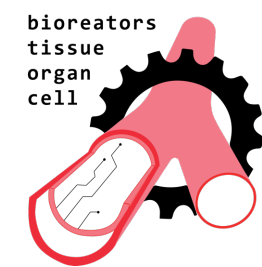
Nativní

Decel.

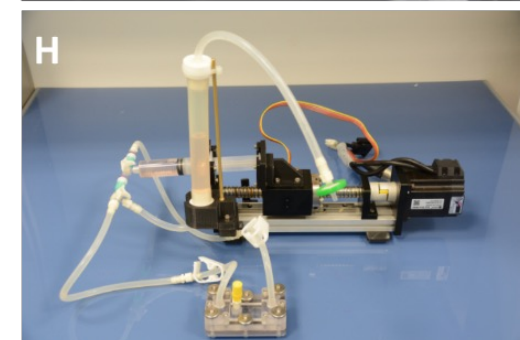
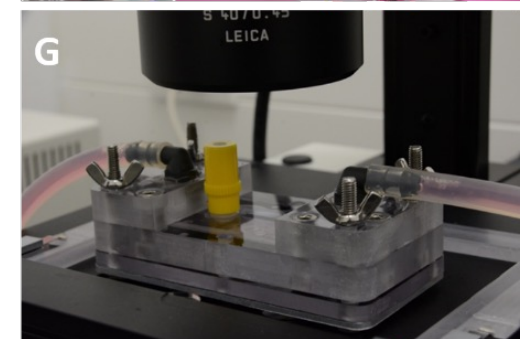
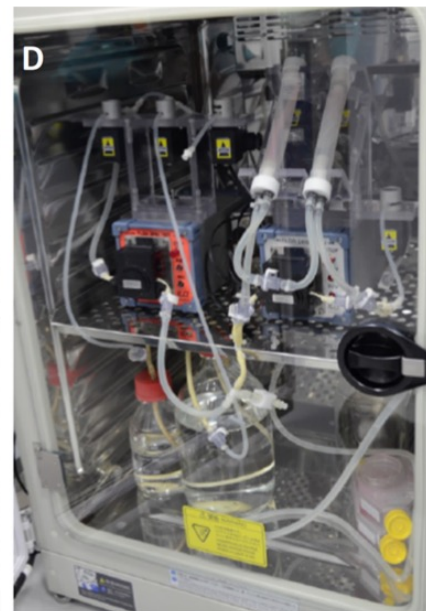
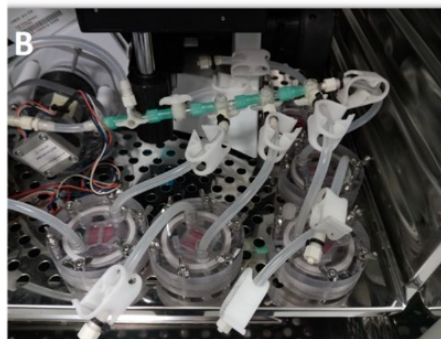
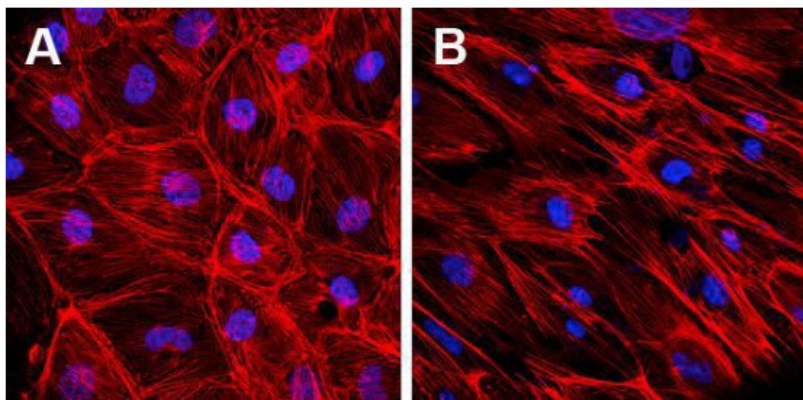
Rekolon.

Ověření v animálním modelu



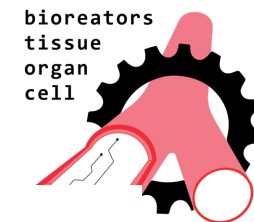


- Simulace fyziologických podmínek
 - Proliferace a diferenciaci
 - Genová exprese
 - Remodelace substrátu a příprava náhrad
- Automatizace procesu
 - Dlouhodobý běh
 - Vzdálený monitoring
 - Instalace v CO2 inkubátoru





Bioreaktory pro tkáňové a orgánové náhrady



ASC – 17H belly

2nd passage

DAPI

Calponin

α -actin

Dynamic conditions:

100/80 mmHg

1 Hz

Differentiation medium:

DMEM (HG) +

1 % ABAM

10 % FS +

2,5 ng/ml TGF- β +

2,5 ng/ml BMP4 +

50 ug/ul Ascorbic Acid

Proliferation medium:

DMEM (HG) +

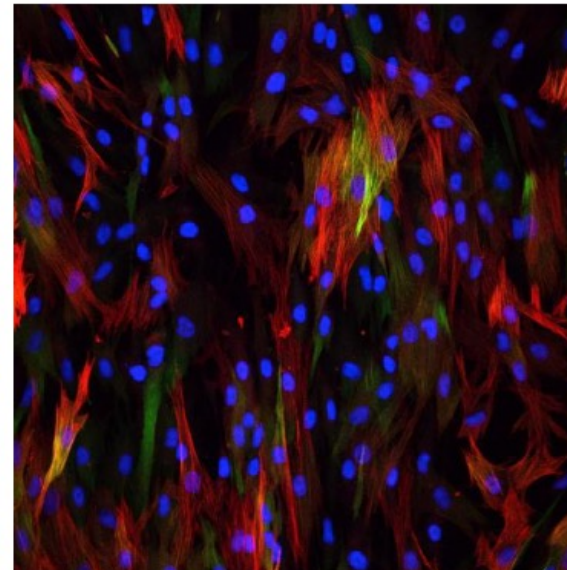
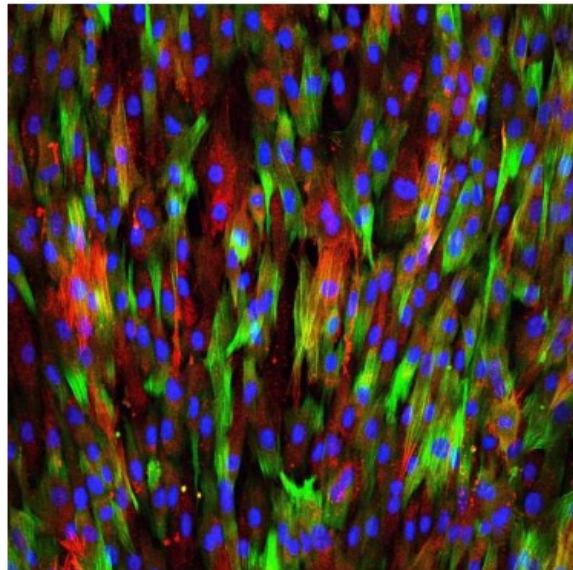
1 % ABAM

10 % FS +

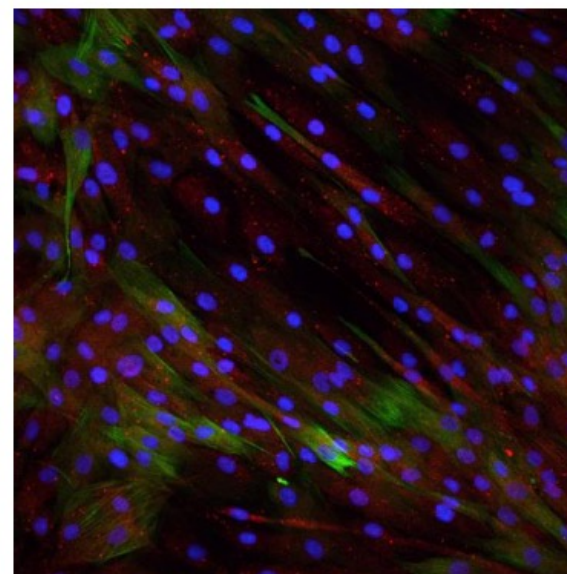
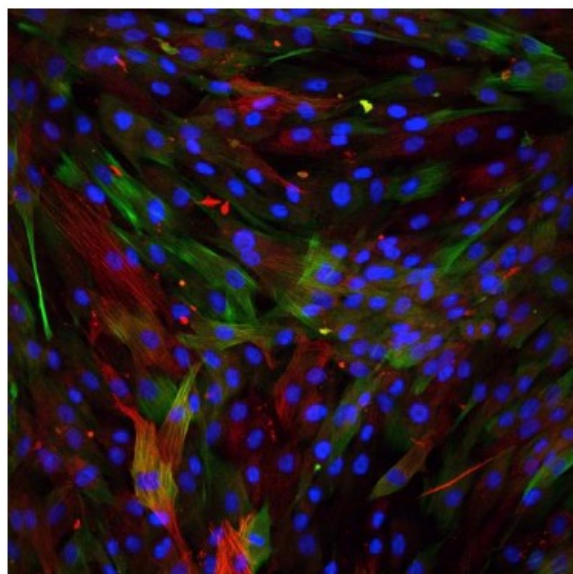
10 ng/ml FGF2

Dynamic – differentiation medium Static – differentiation medium

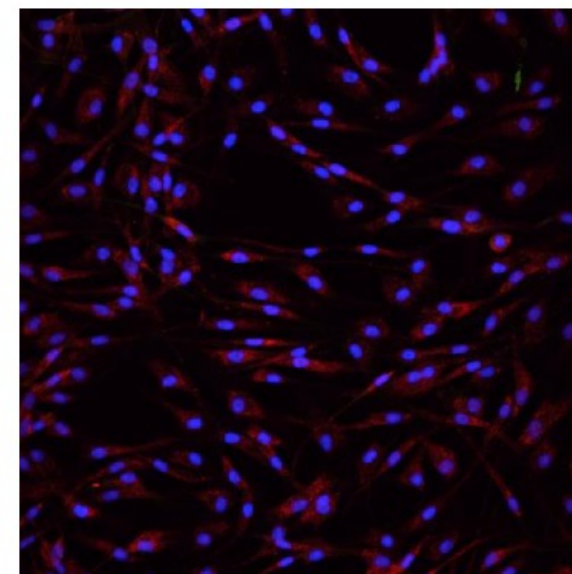
Fibrin



Glass (plasma treated)



Static – proliferation medium



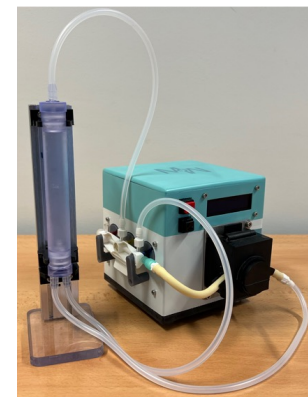
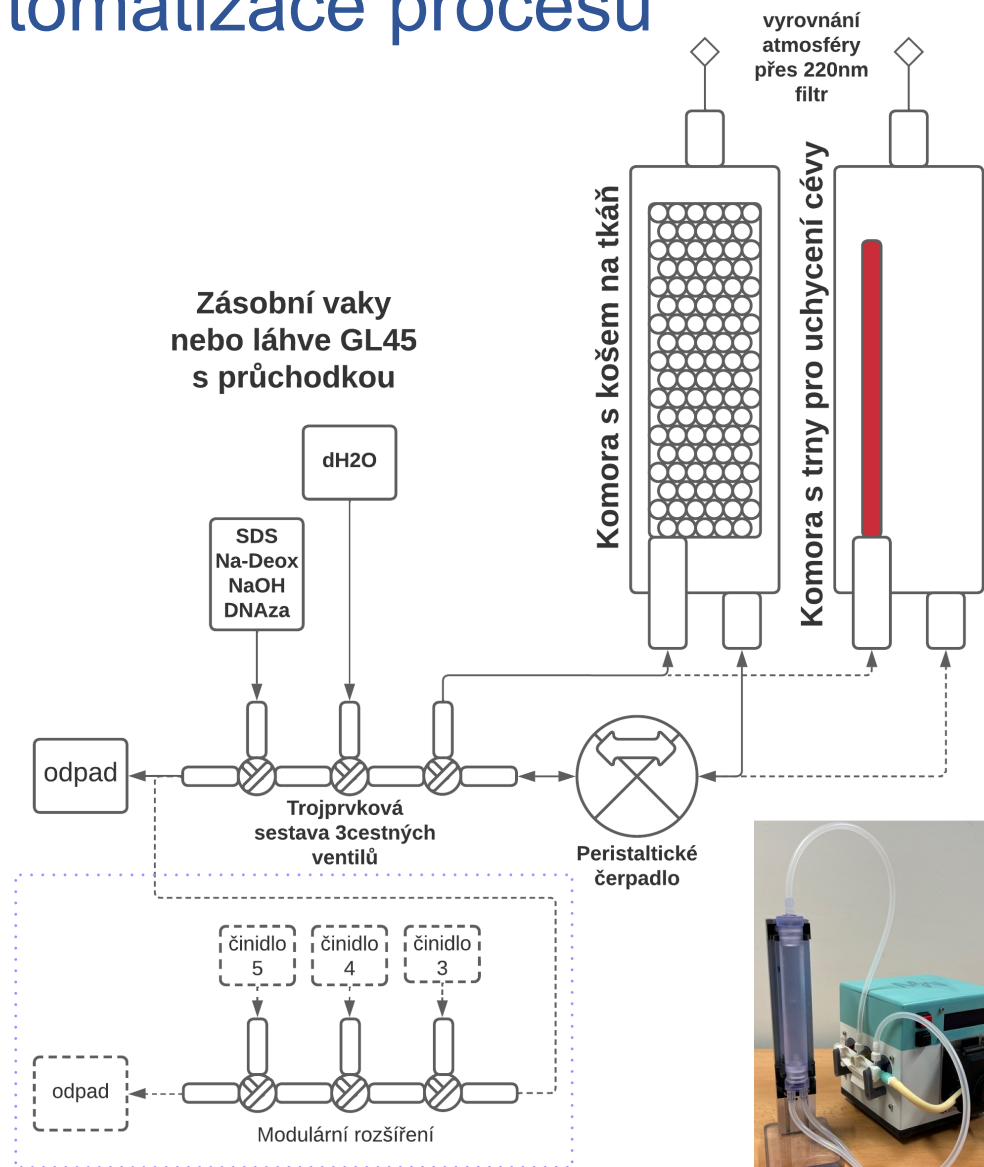


Decelularizace tkání a automatizace procesu

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

Srovnání množství DNA v nativní a decelularizované tkáni (analýza forezním kitem na lyofilizované tkáni, vztaženo na sušinu, n=10)

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





Decelularizace tkání - perikard

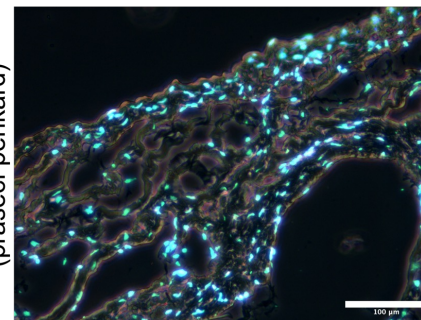
Komora s košem
pro tkáň



Komora s
průtočnými trny
pro cévy

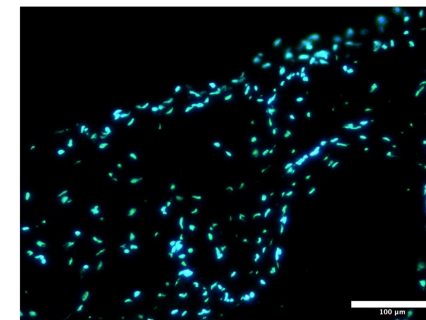


Snímek kombinující světlé pole a
fluorescenci DAPI

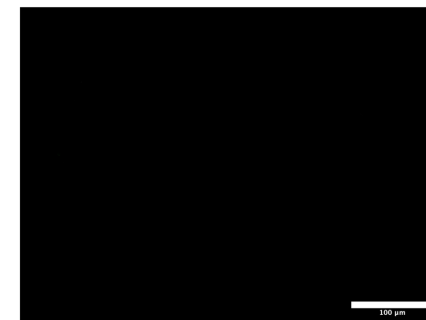
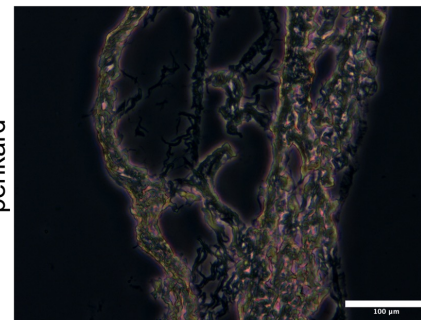


Nativní tkáň - kontrola
(prasečí perikard)

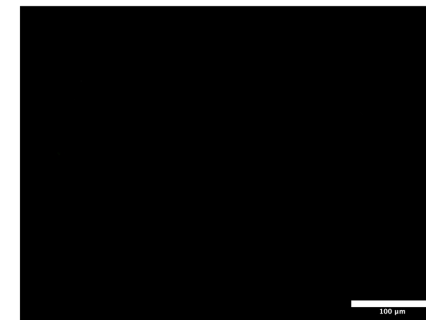
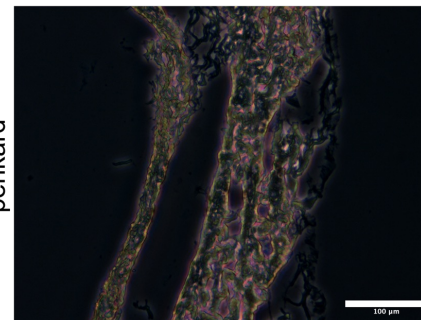
Fluorescenční snímek jader s DAPI



Decelularizovaný prasečí
perikard



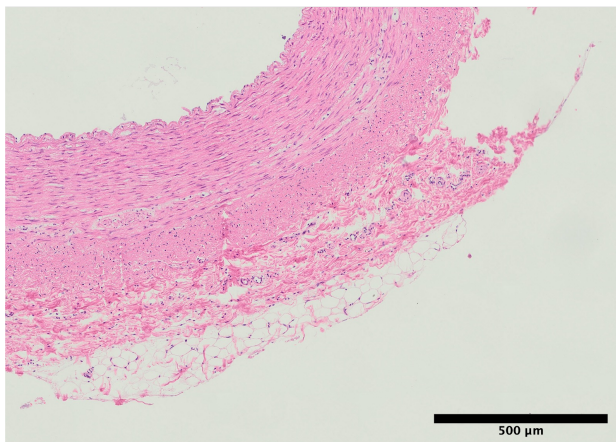
Decelularizovaný ovčí
perikard



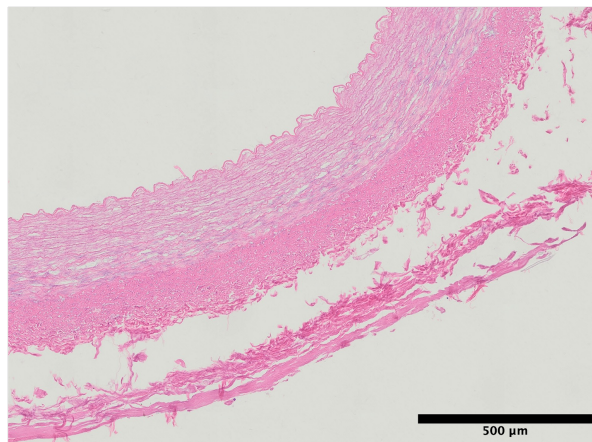


Decelularizace tkání - céva

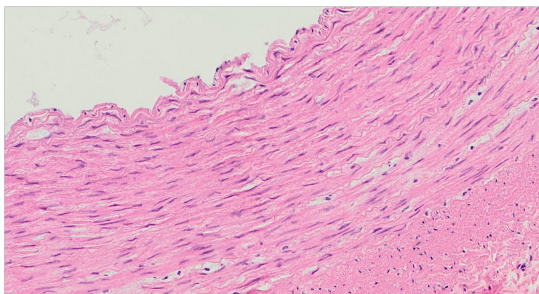
Prasečí *a. carotis* nativní



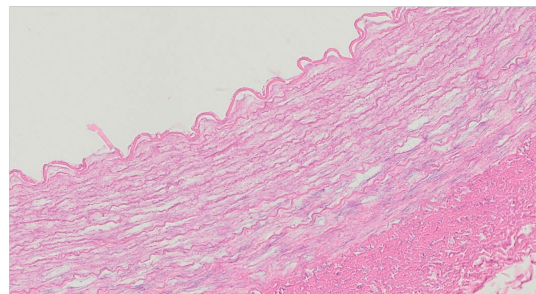
Prasečí *a. carotis* decelularizovaná



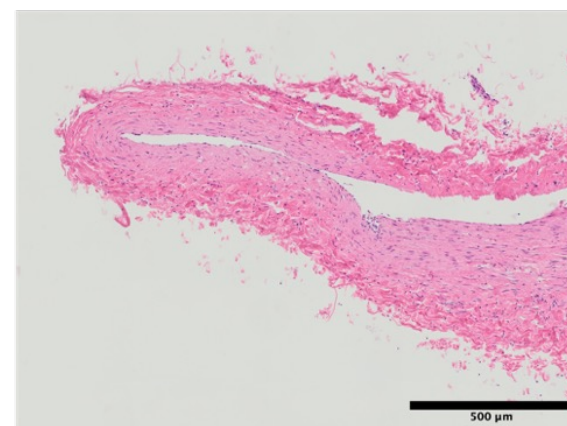
Detail stěny



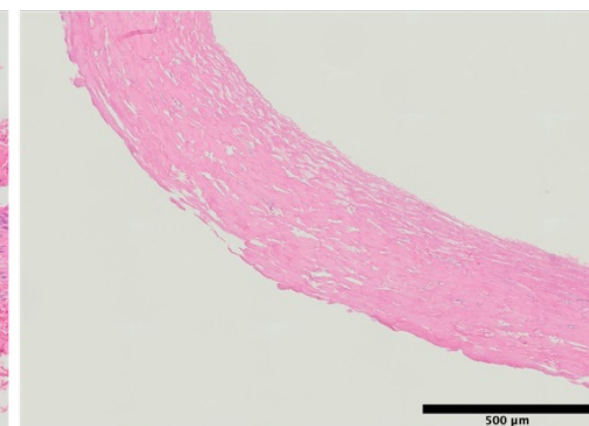
Detail stěny



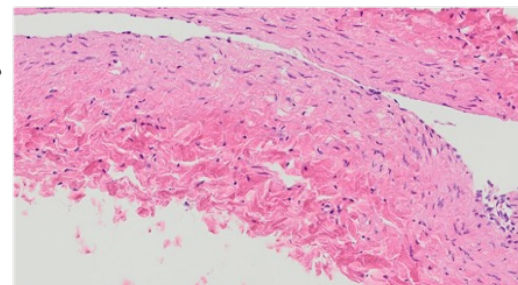
Prasečí *v. jugularis* nativní



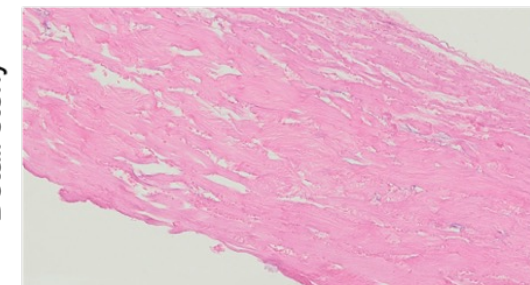
Prasečí *v. jugularis* decelularizovaná



Detail stěny



Detail stěny

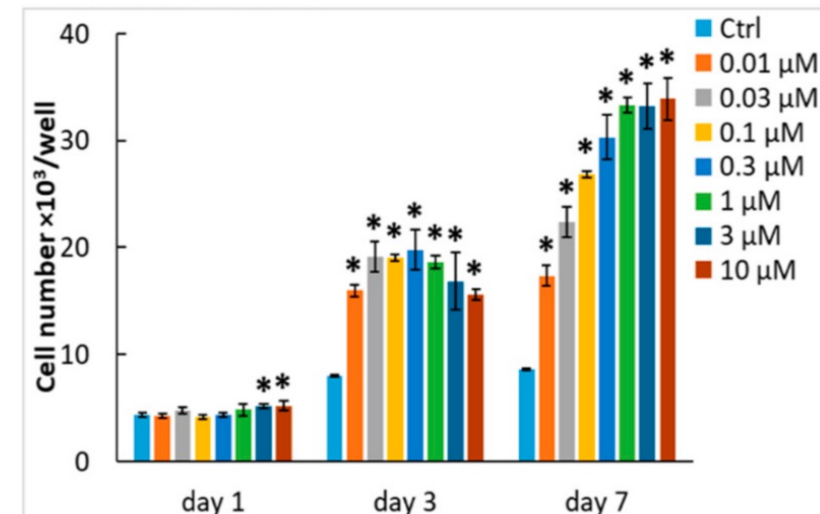




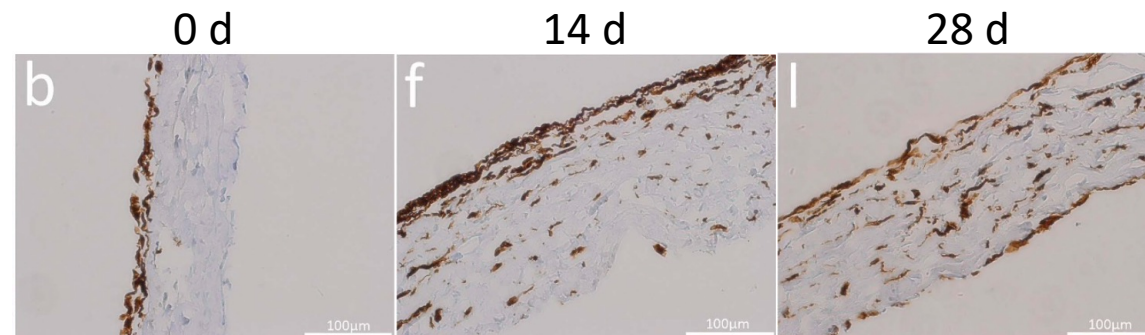
Modifikace a rekolonizace decelularizovaných tkání

- Chemická stabilizace (GA, Genipin) - vyšší cytotoxicita, náhrada decelularizace
- Modifikace povrchu fibrinovou sítí
 - Možnost navázání heparinu a růstových faktorů
 - Zvyšuje proliferaci a adhezi
- Růstové faktory FGF2 a VEGF
 - Podpora růstu je-li součástí kultivačního média
 - V případě vazby na povrch je rychlá metabolizace
 - Regulační podmínky použití růstových faktorů
- Plná rekolonizace tkáně (perikard 200 – 250 μm) více než 20 dní od nasazení

Vliv FGF-2 na buněčnou proliferaci prasečích stromálních buněk z tukové tkáně

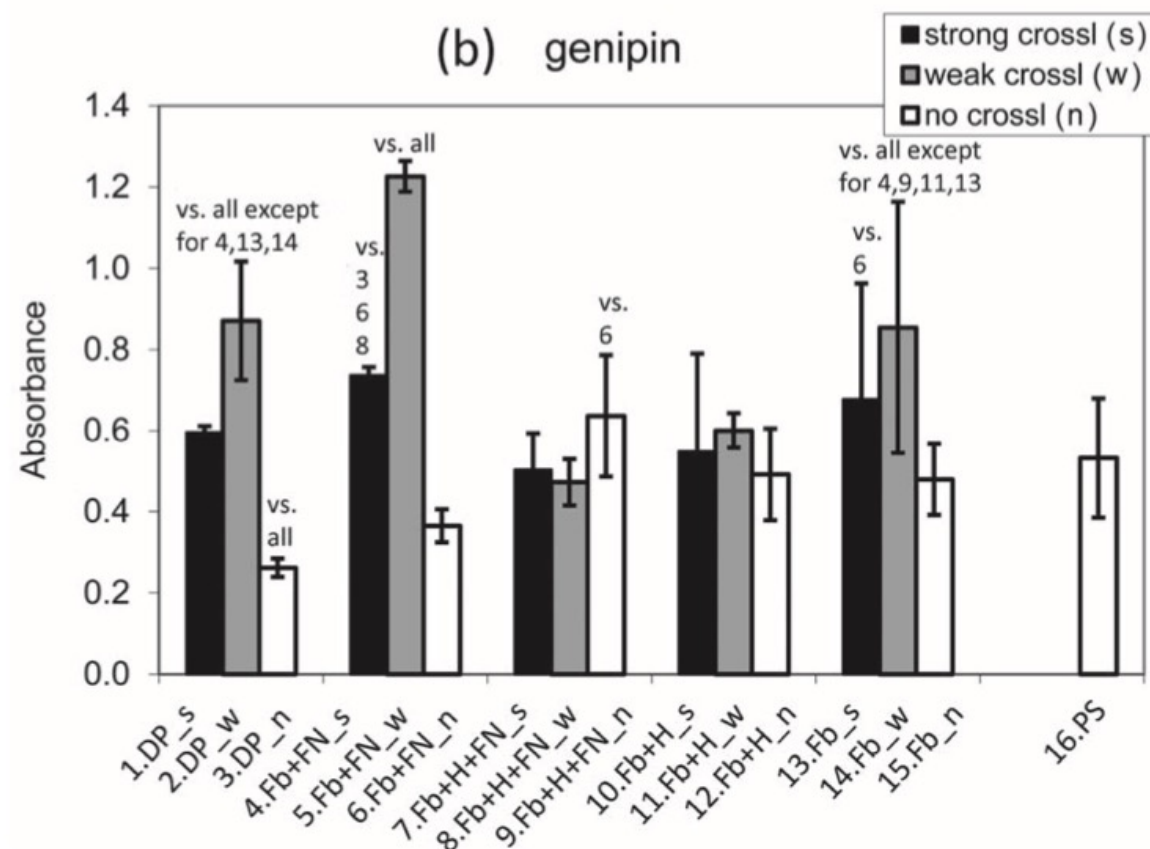
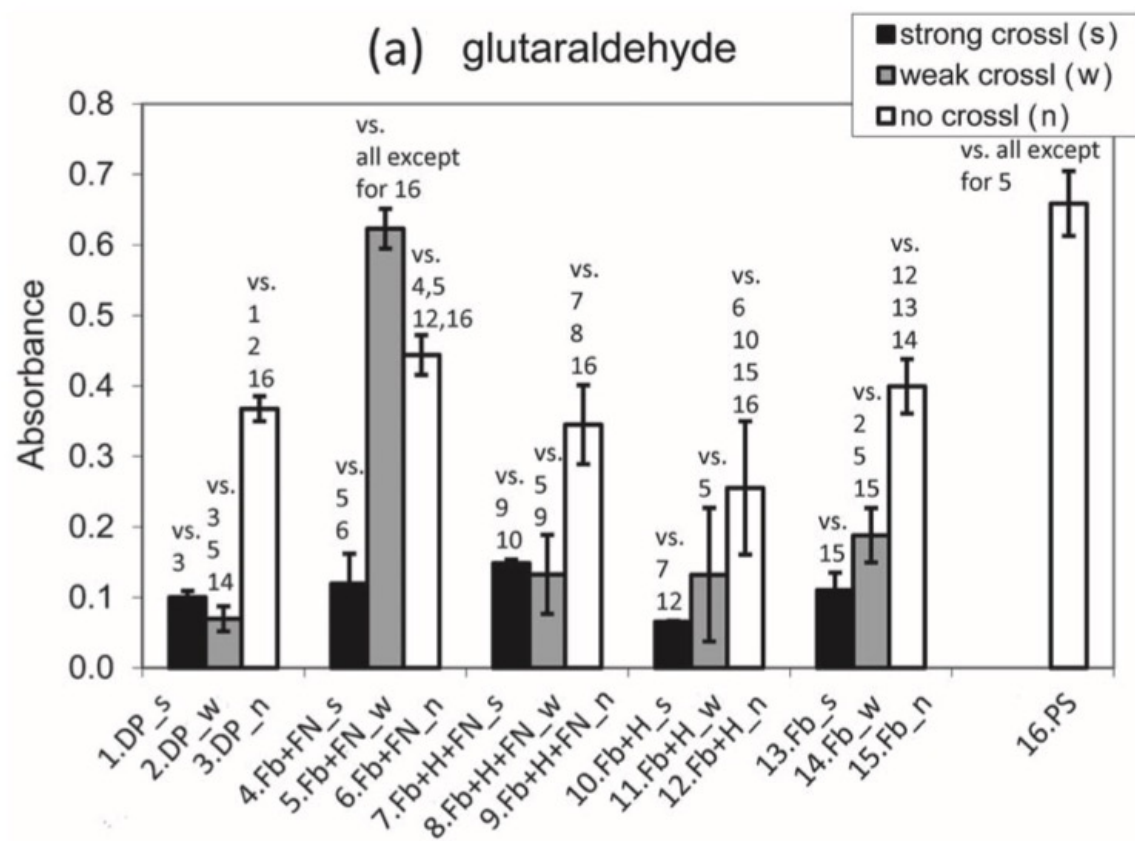


Modifikace decel. perikardu pomocí sítě Fibrin + heparin + FGF2 a penetrace buněk do tkáně





Kroslinkování GA a Genipinem, MTA



Růst buněk do perikardu modifikované fibrinem a RF

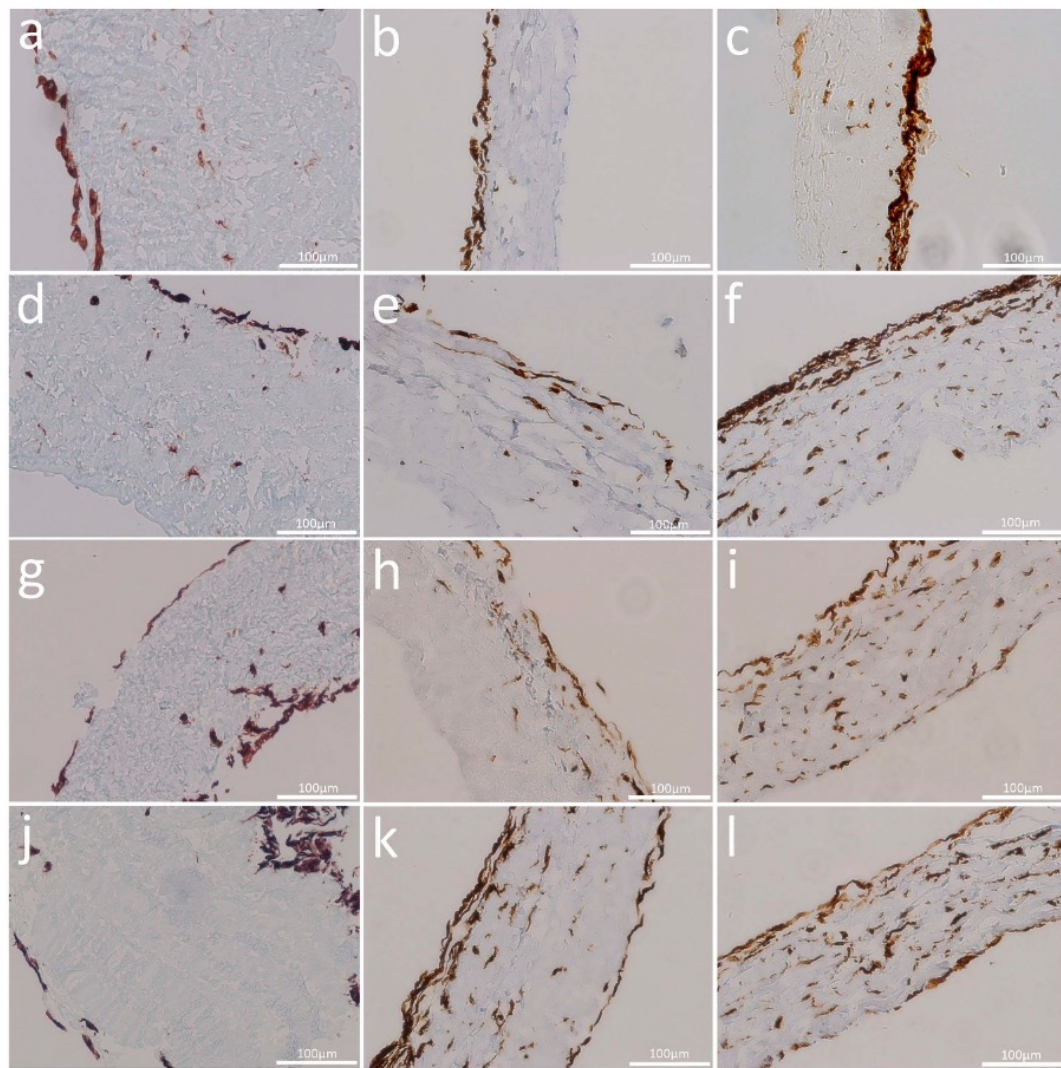


Figure 4. Immunohistological staining of vimentin in ASC cells seeded on to DP (a), (d), (g), (j), on to DP-Fb (b), (e), (h), (k), and on to DP-Fb+H+VEGF (c), (f), (i), (l) on day 6 (a)–(c), on day 14 (d)–(f), on day 21 (g)–(i), and on day 28 (j)–(l). Olympus IX51 microscope, DP70 digital camera, cross-sections, obj. $\times 20$, scale bar = 100 μm .

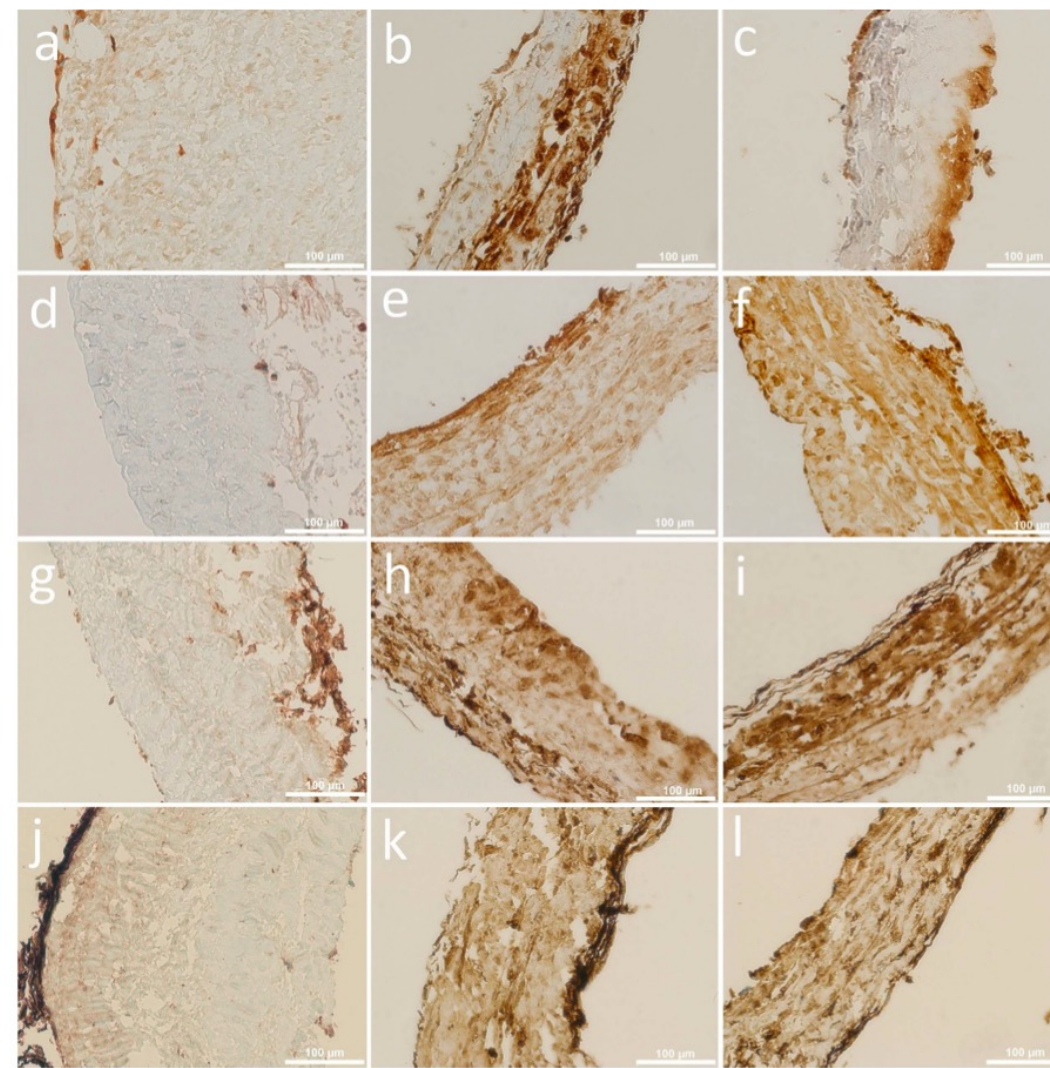
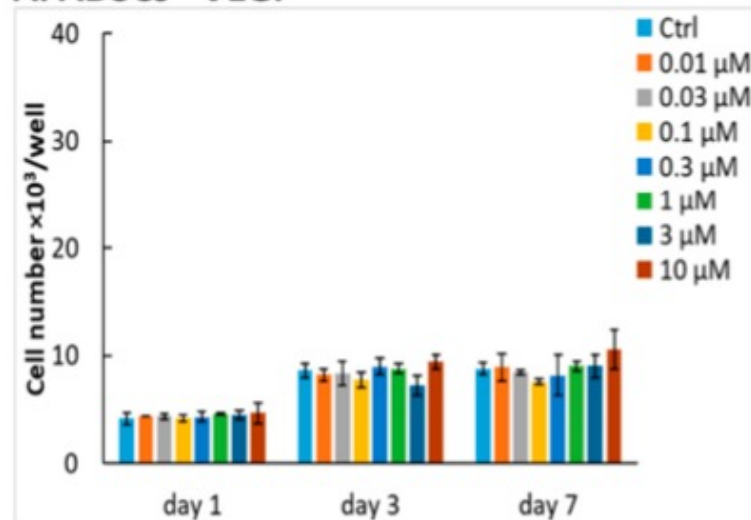


Figure 6. Immunohistological staining of fibronectin in ASC cells seeded on to DP (a), (d), (g), (j), on to DP-Fb (b, e, h, k), and on to DP-Fb+H+VEGF (c), (f), (i), (l) on day 6 (a)–(c), on day 14 (d)–(f), on day 21 (g)–(i), and on day 28 (j)–(l). Olympus IX51 microscope, DP70 digital camera, cross-sections, obj. $\times 20$, scale bar = 100 μm .

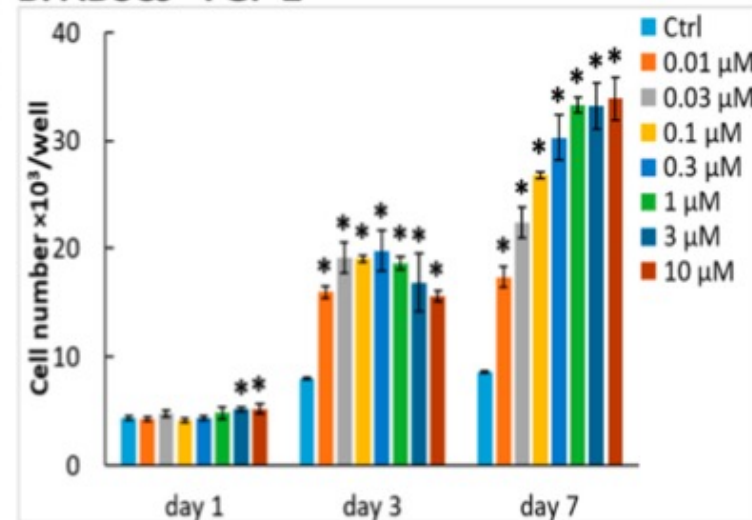


Vliv FGF a VEGF na proliferaci ASC a HUVEC

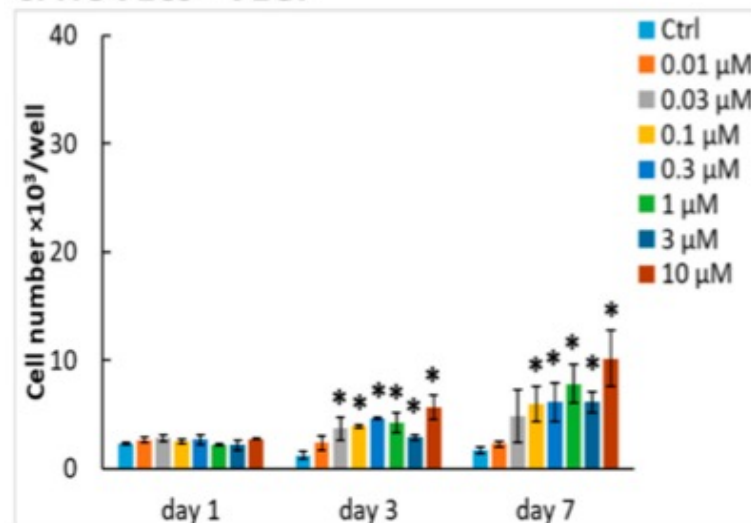
A. ADSCs - VEGF



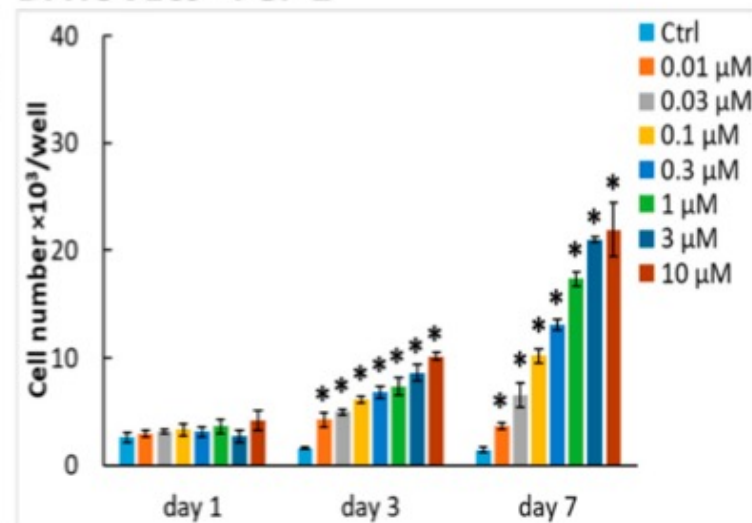
B. ADSCs - FGF-2



C. HUVECs - VEGF



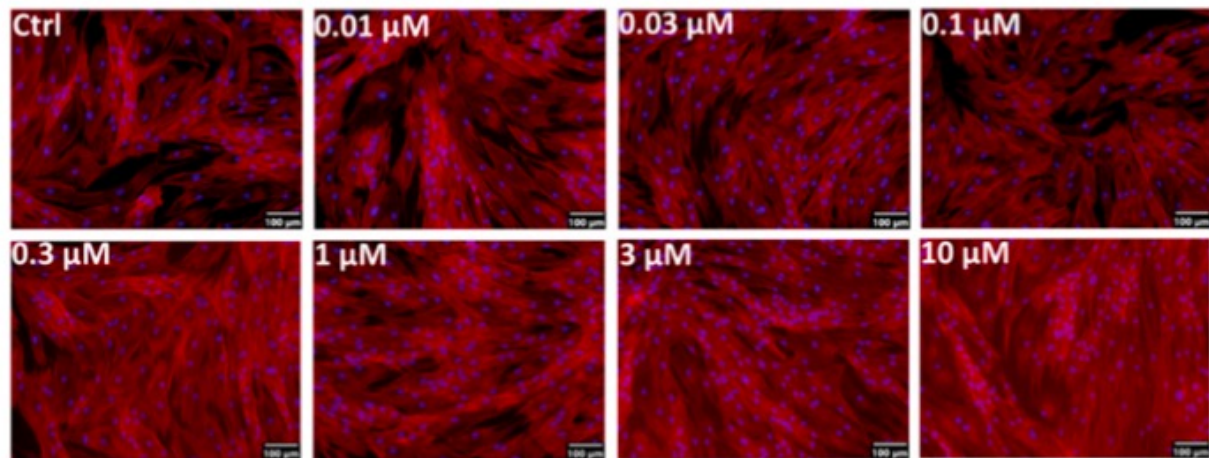
D. HUVECs - FGF-2



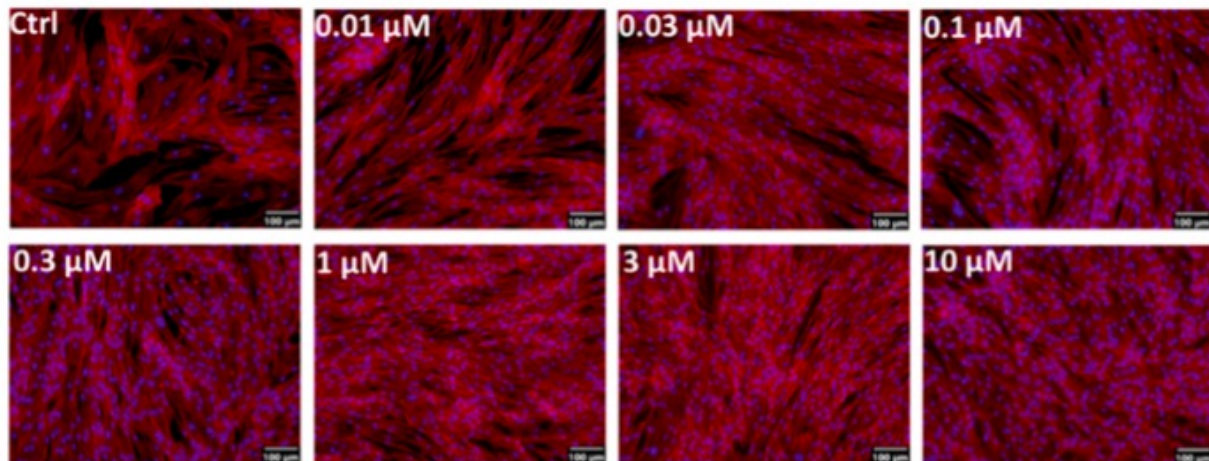


Vliv FGF a VEGF na proliferaci ASC a HUVEC

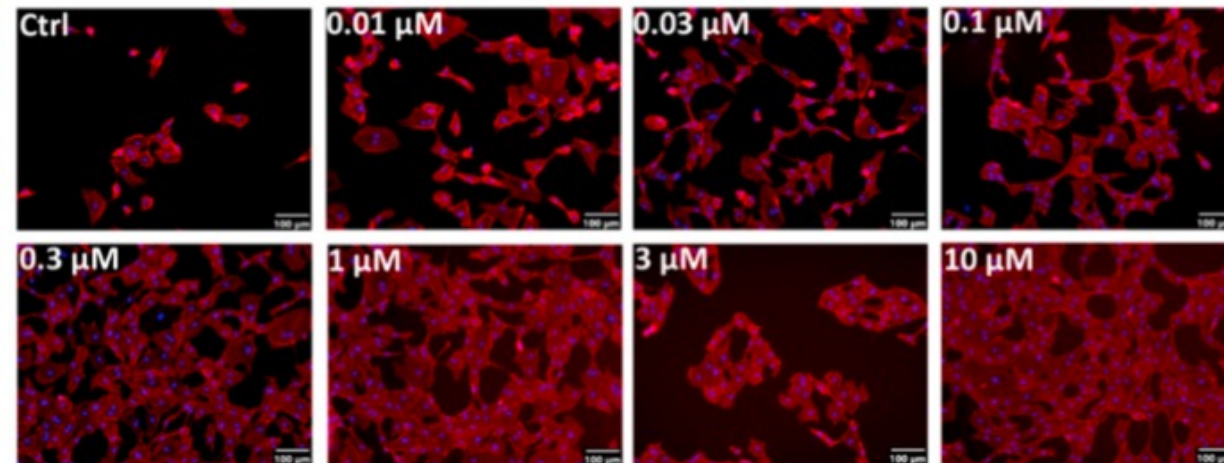
A. ADSCs - VEGF



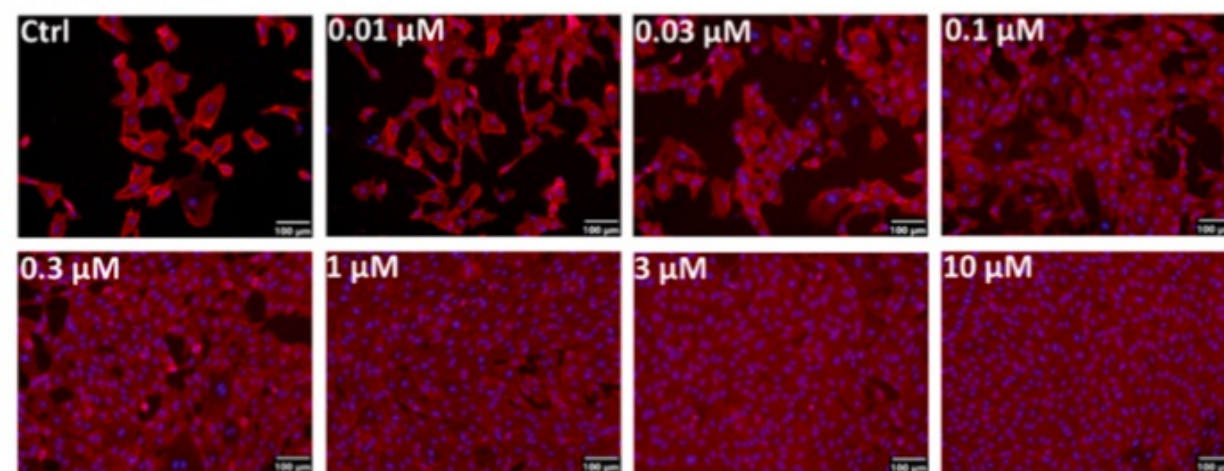
B. ADSCs - FGF-2M



C. HUVECs - VEGF



D. HUVECs - FGF-2M

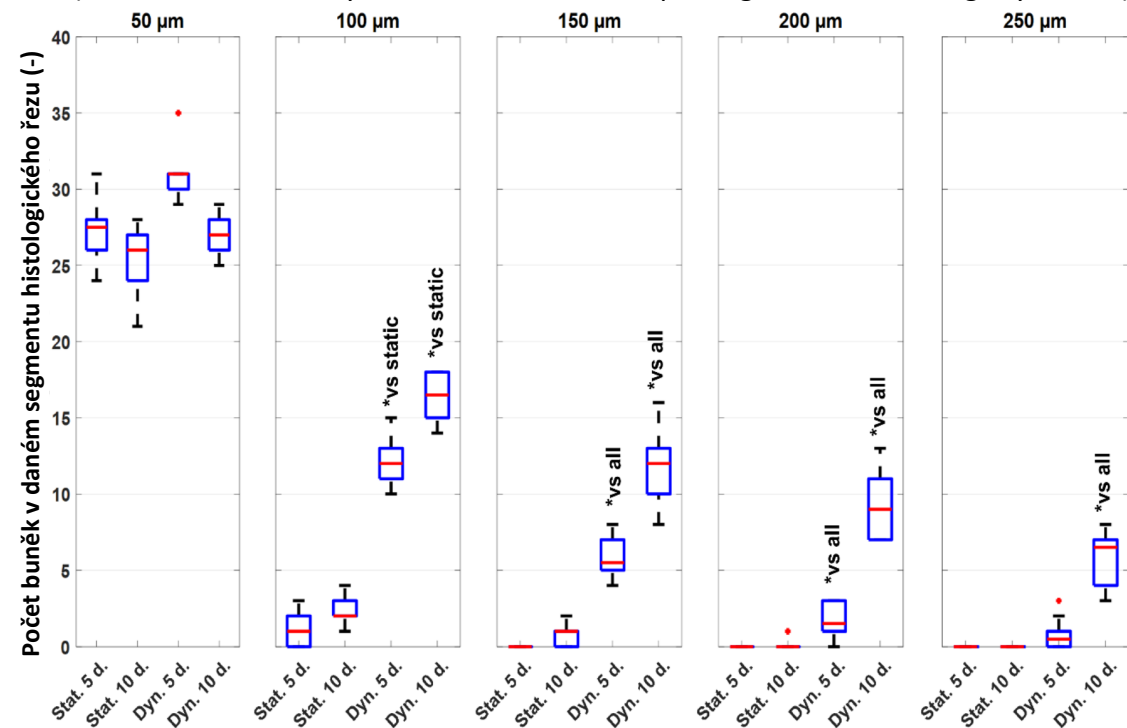


Rekolonizace decelularizovaných tkání v reaktoru

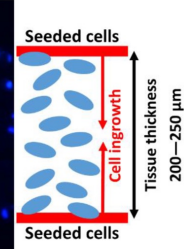
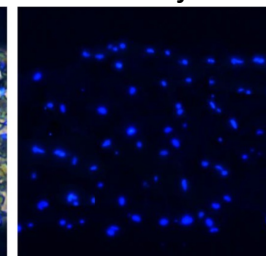
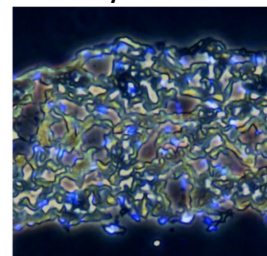
- Uchycení decelularizované tkáně v kultivační komoře
- Stimulační systém - mikroperfúze se zátěží 15.9/10 kPa (120/80 mmHg), při 1 Hz
- Prasečí stromální buňky z tukové tkáně pASC a z pupečníků (Wortonova rosolu) pWJC
- Podpora proliferace diferenciaci do fenotypu hladkého svalů
- Zrychlená penetrace a rekolonizace tkáně 5 – 7 dní
- Limitace pro větší substrát >25x25 mm
 - nehomogenita osazení

Optimalizace osazení a rekolonizace v reaktoru za 5 dní

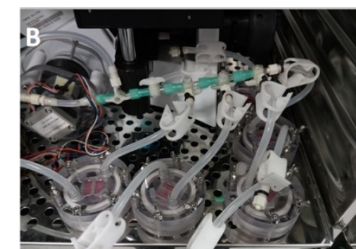
Schopnost penetrace buněk do decelularizované tkáně (srovnání statické a dynamické kultivace, v 50 μ m segmentech histologických řezů)



Kryořez tkáně a značená jádra

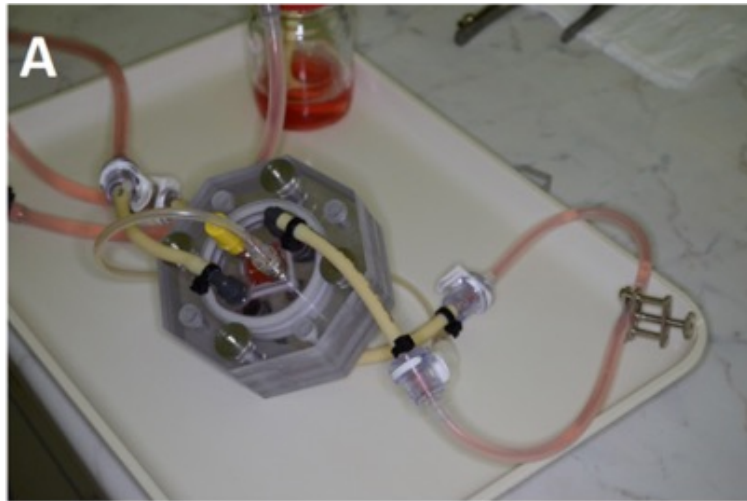


Sestava kultivačních komor



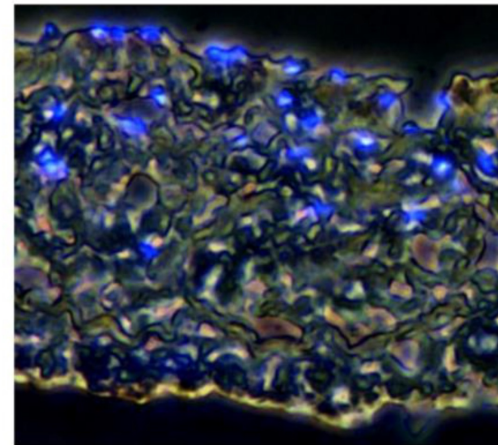


Rekolonizace v tlakovém reaktoru

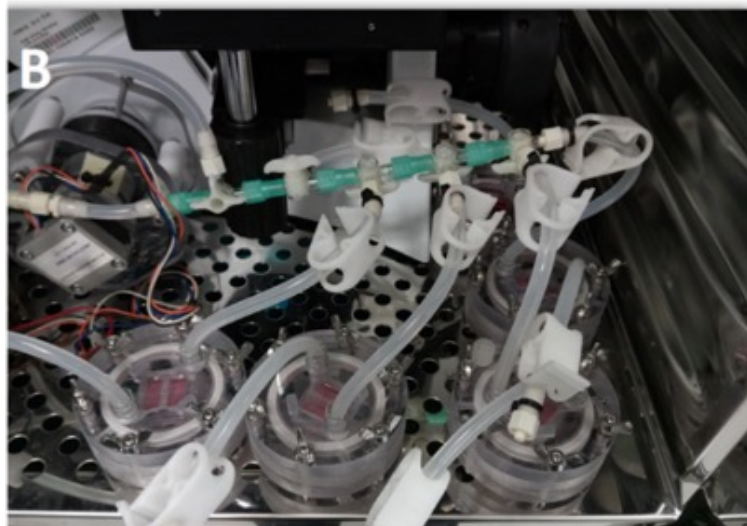
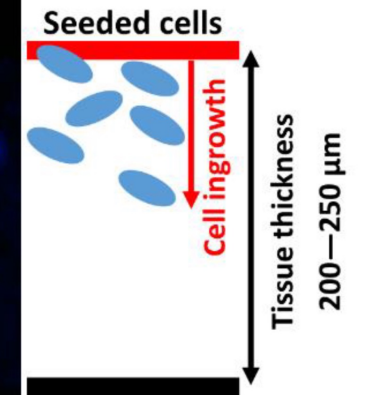
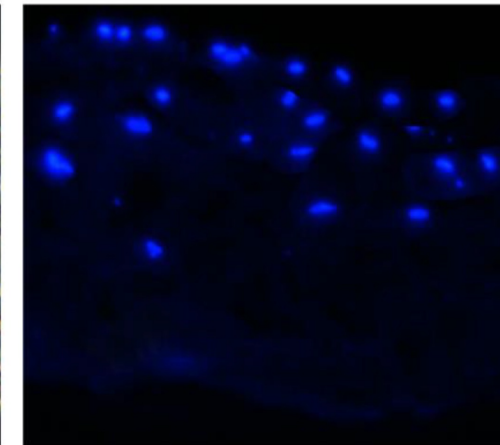


Single side cell seeding procedure

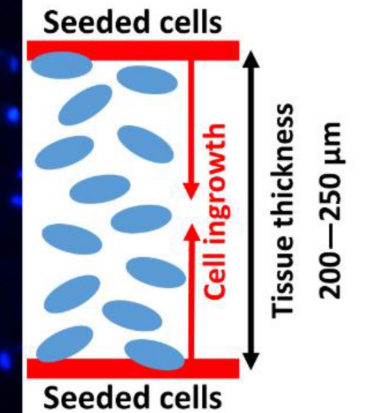
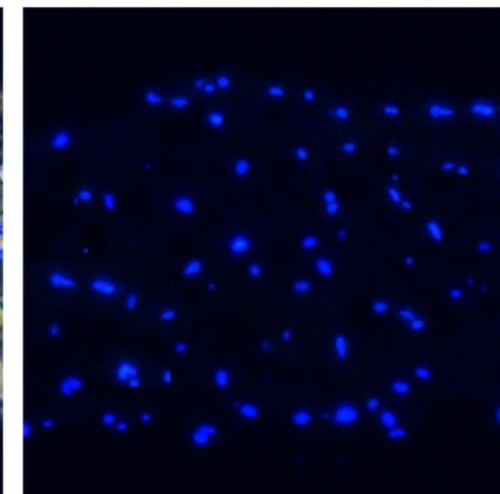
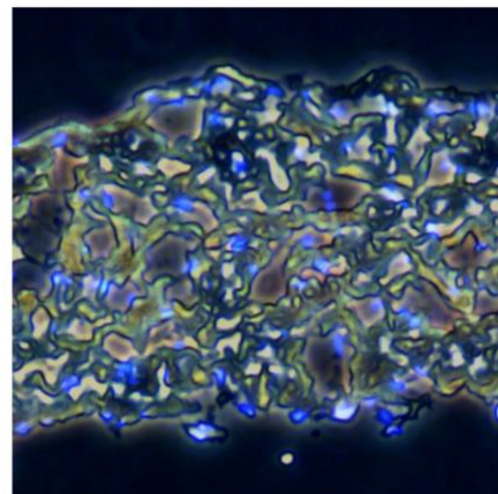
Combined brightfield with DAPI



DAPI only



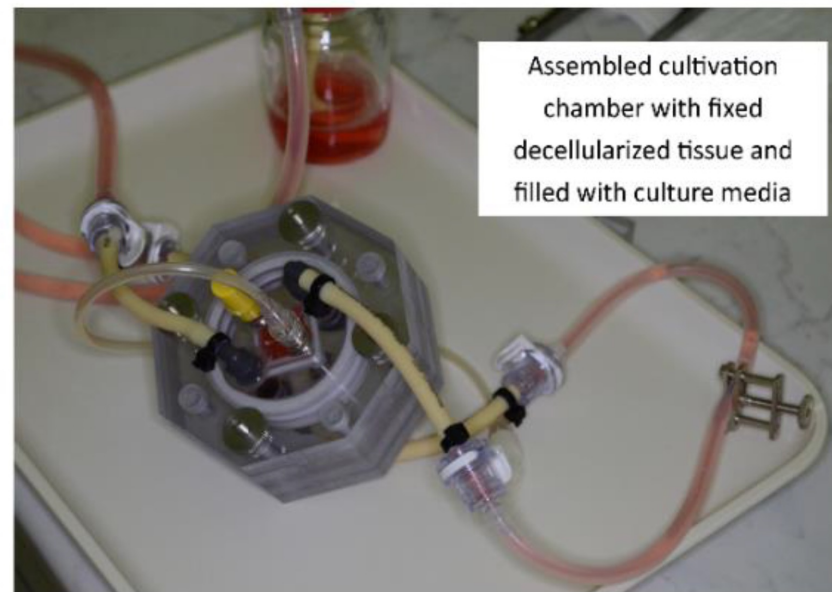
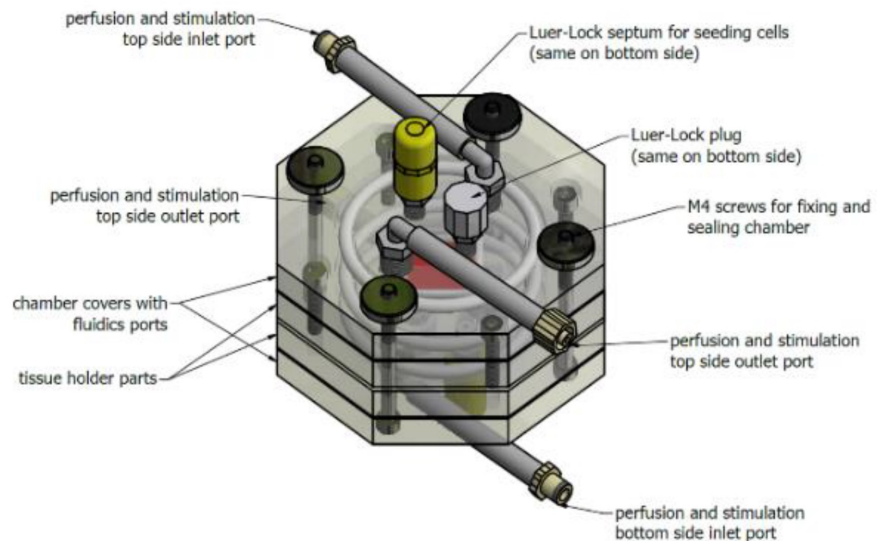
Both side cell seeding procedure



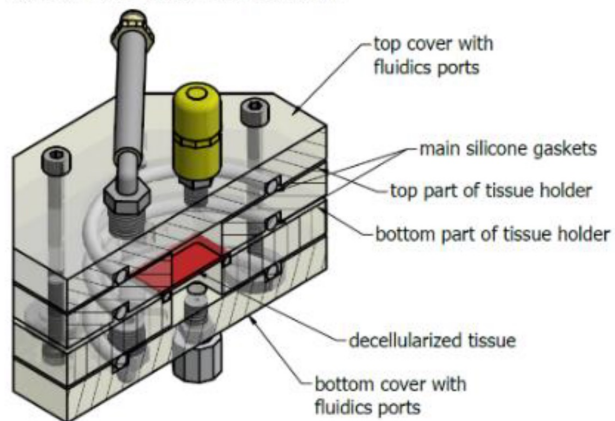


Rekolonizace v tlakovém reaktoru

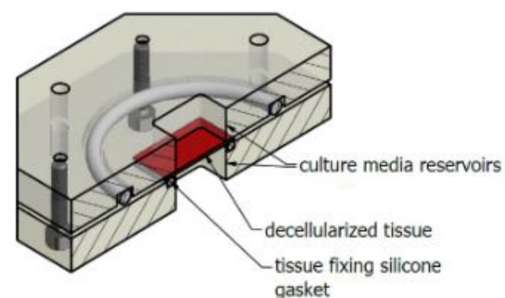
Assembled cultivation chamber



Assembled chamber section



Tissue holder section

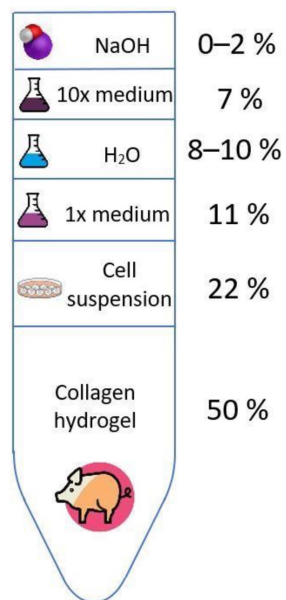


Decellularized tissue aligned in tissue holder part

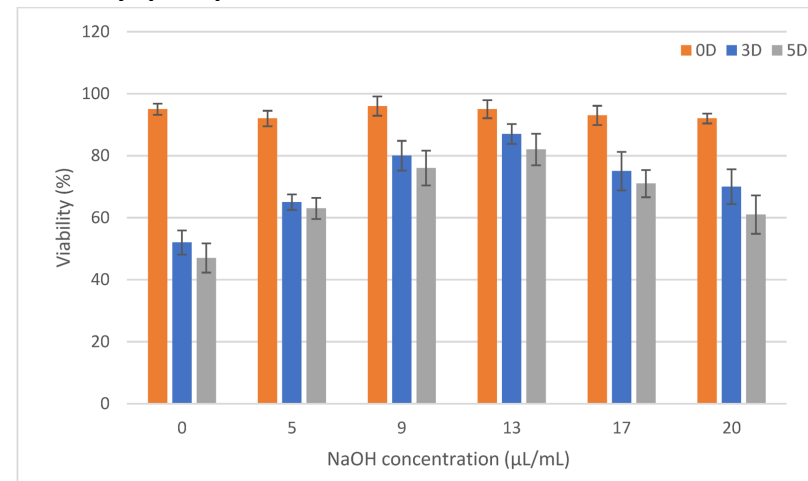
Modifikace 3D biotisku a vývoj inkoustů

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

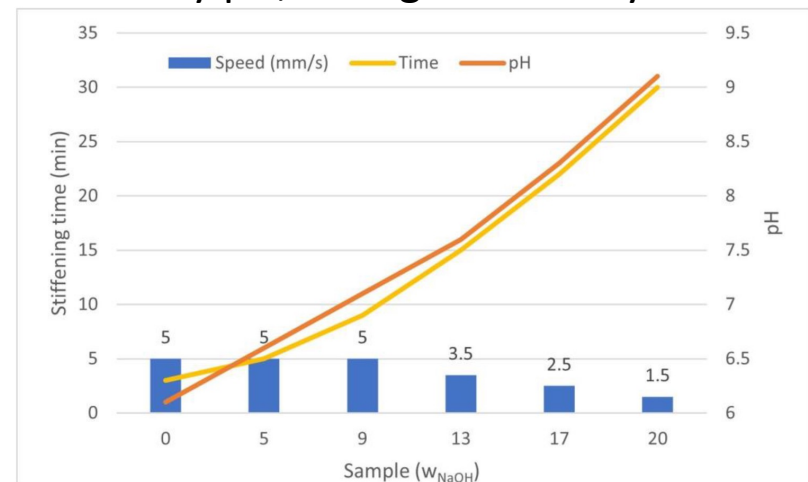
Optimalizované složení bioinkoustu



Vliv změny pH přidáním NaOH na viabilitu buněk

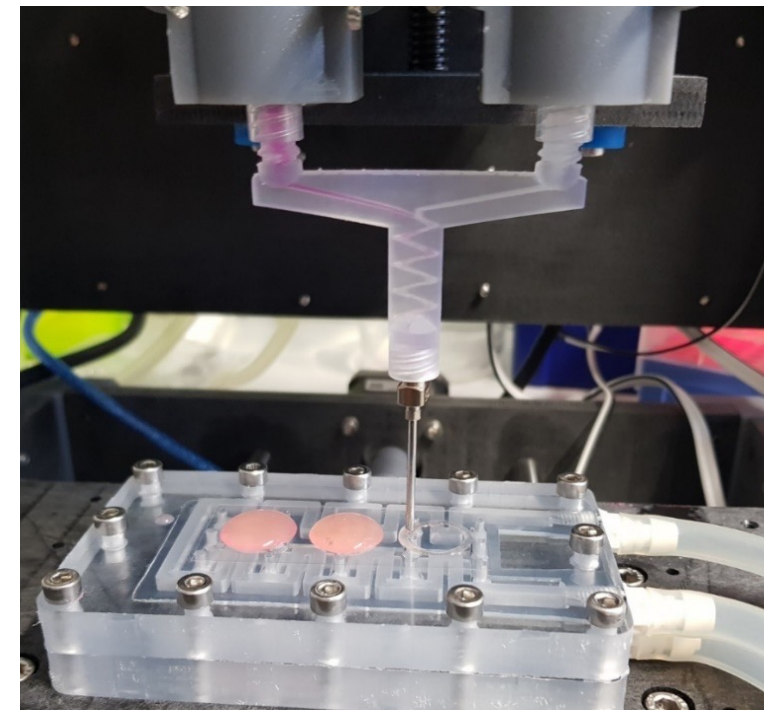
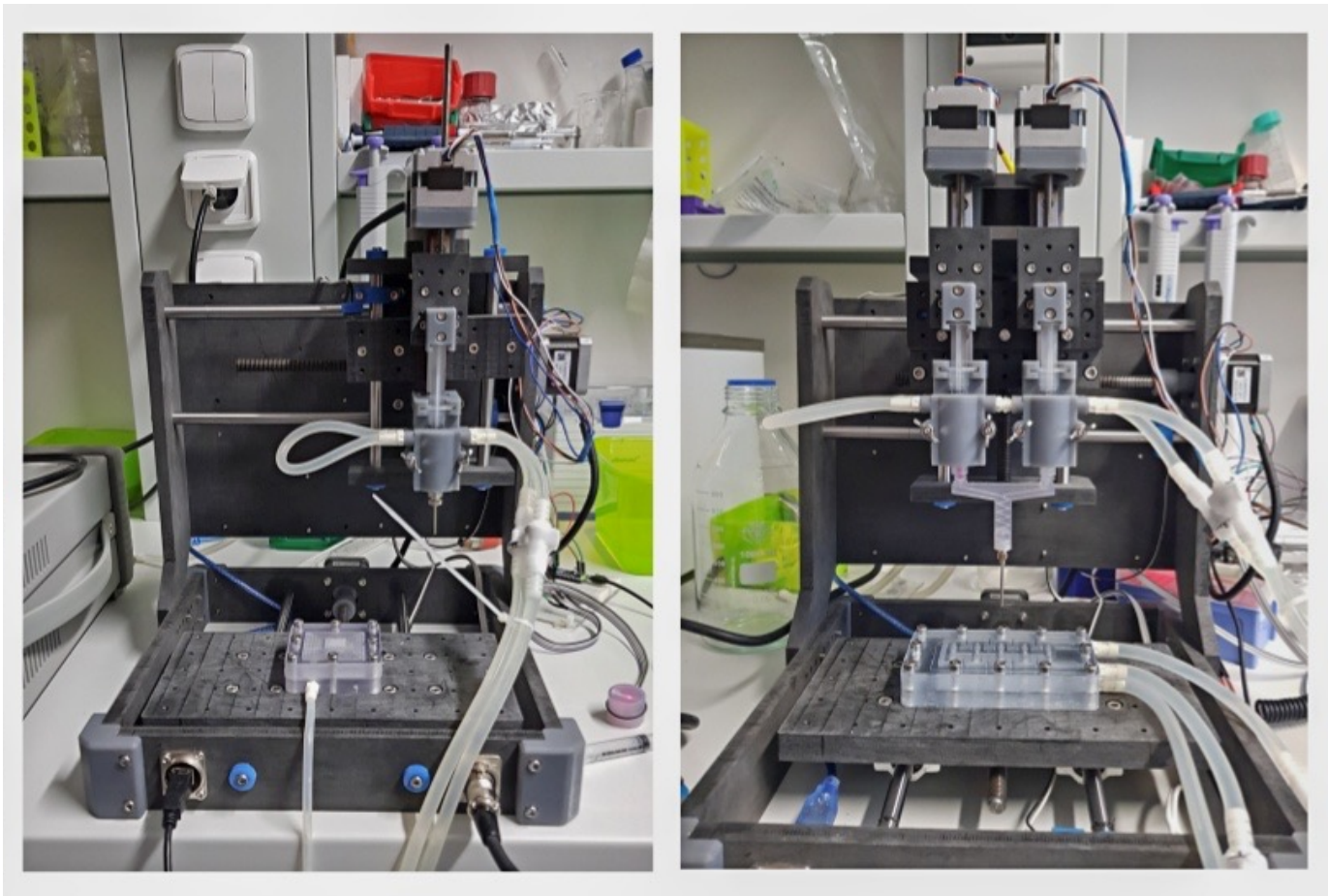


Vliv změny pH, času gelování a rychlosti tisku





3D biotisk s využitím kolagenu

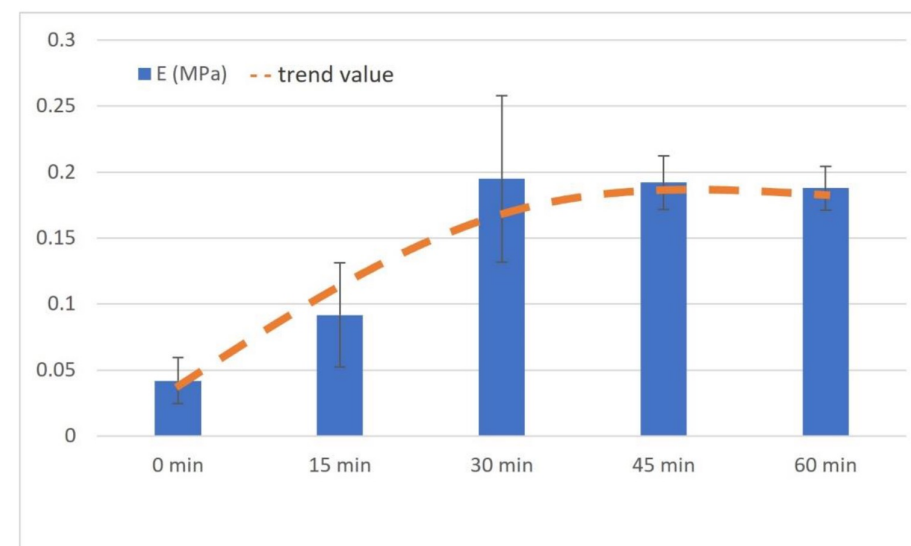
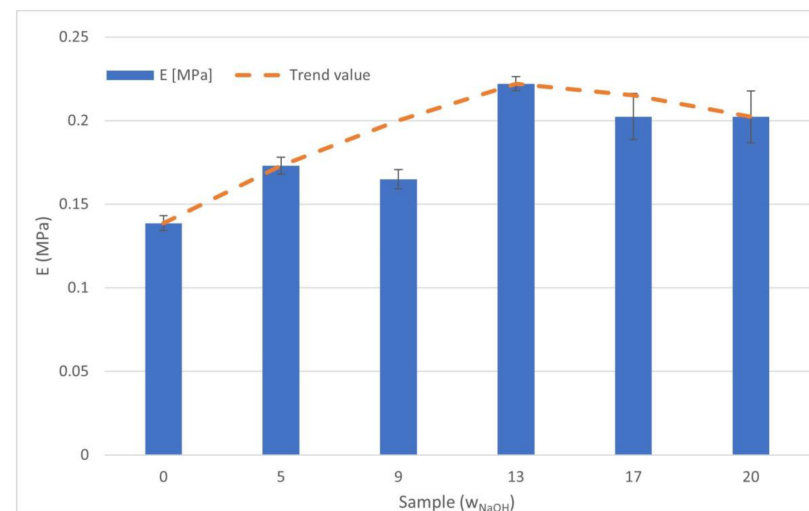
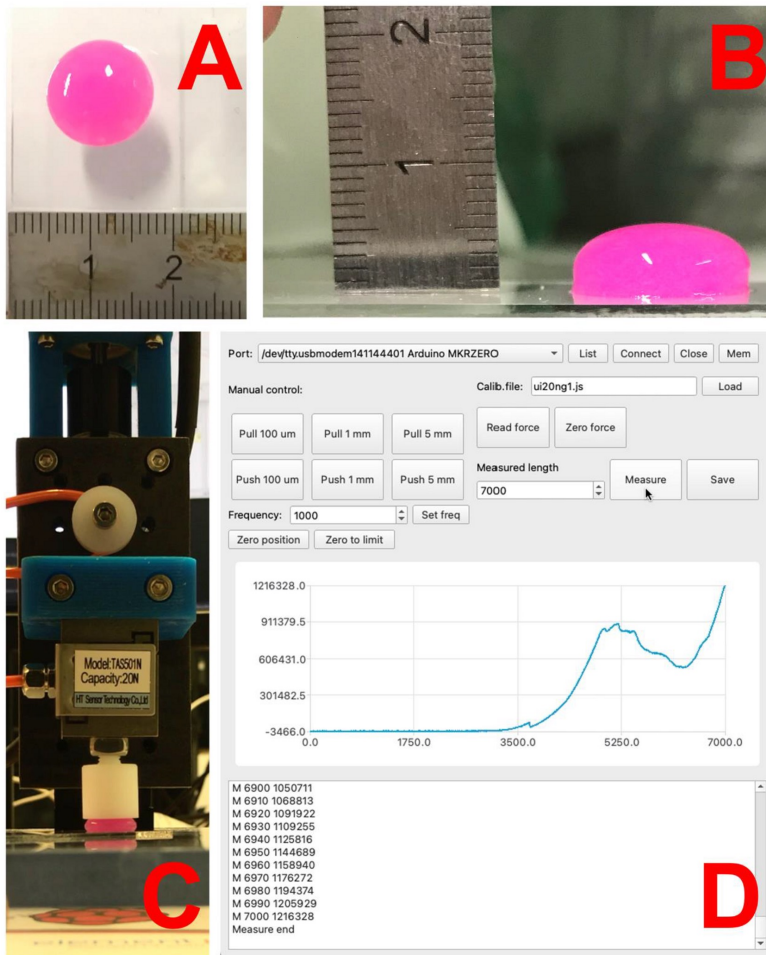


STEPANOVSKA, J., SUPOVA, M., HANZALEK, K., BROZ, A., **MATEJKA, R.** Collagen Bioinks for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogel Properties, Bioprinting Parameters, Protocols, and Bioprinted Structure Characteristics. *Biomedicines*, 2021, 9(9). **Q2, IF 4,757**

STEPANOVSKA, J., OTAHAL, M., HANZALEK, K., SUPOVA, M., **MATEJKA, R.** pH Modification of High-Concentrated Collagen Bioinks as a Factor Affecting Cell Viability, Mechanical Properties and Printability, 2021 *Gels*, 7(4), **Q1, IF 4,432**

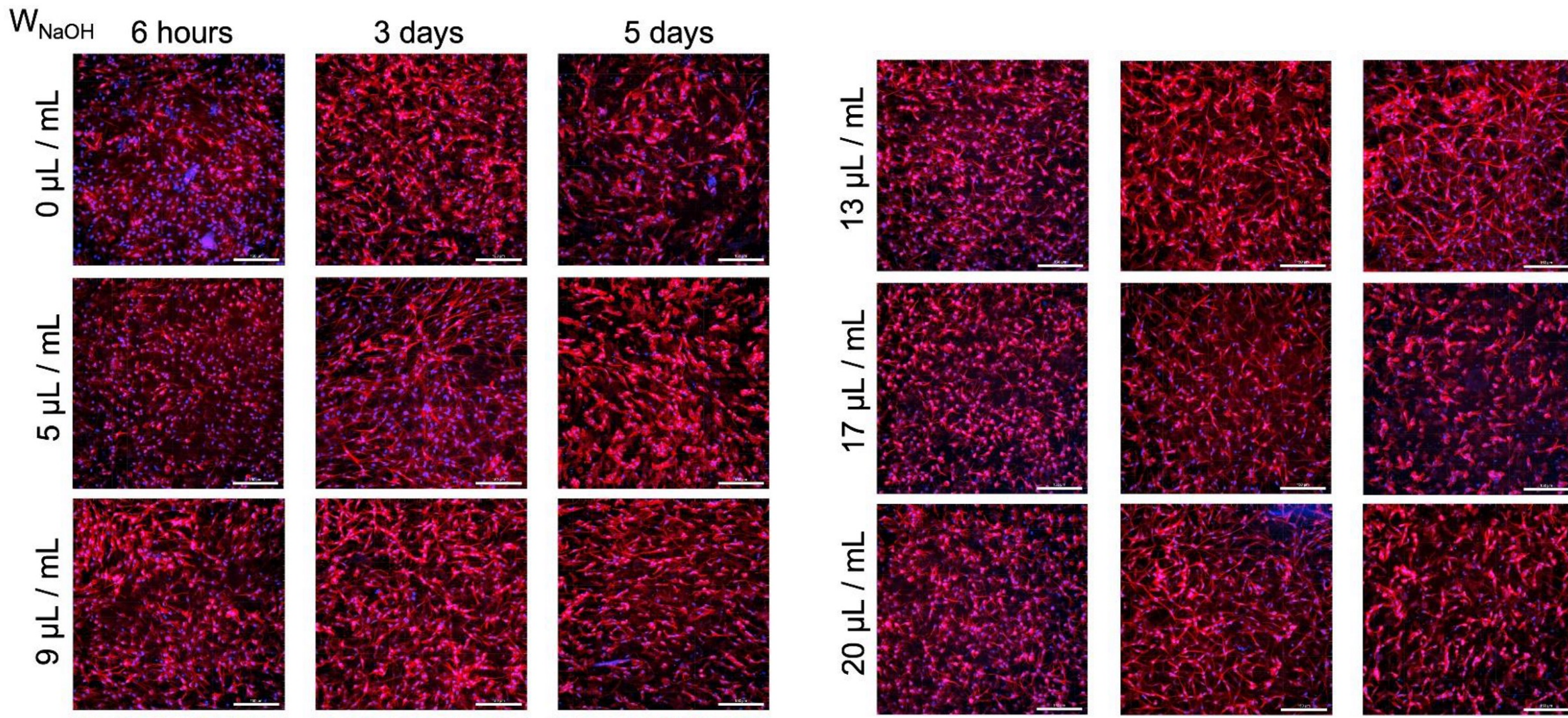


Hodnocení mechanické odezvy gelů



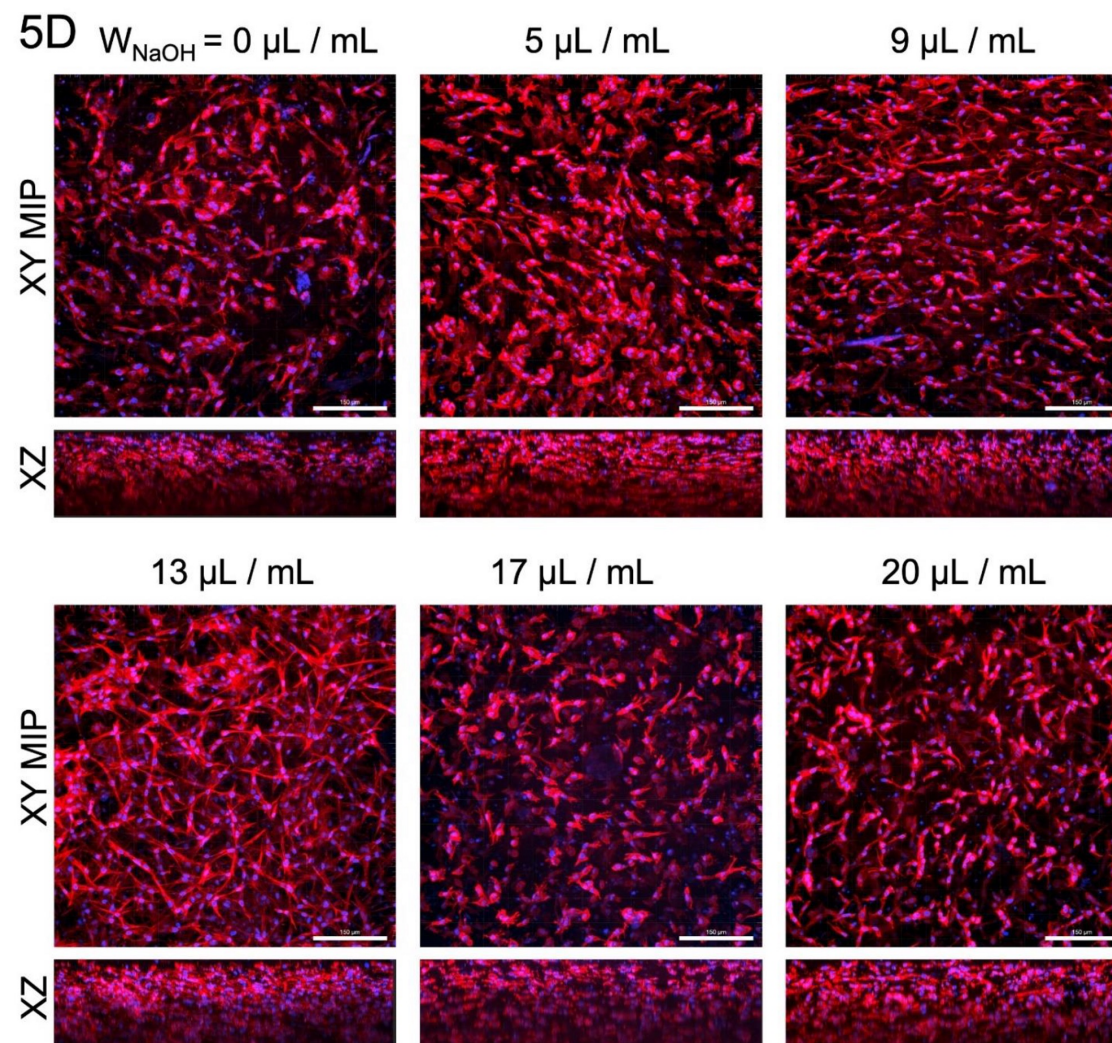


Konfokální snímky buněk optimalizovaného bioinku





Konfokální snímky buněk optimalizovaného bioinku

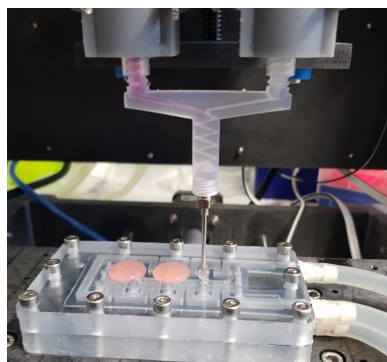
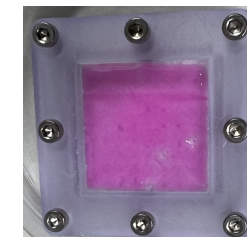




Využití 3D biotisku pro rekolonizaci tkání

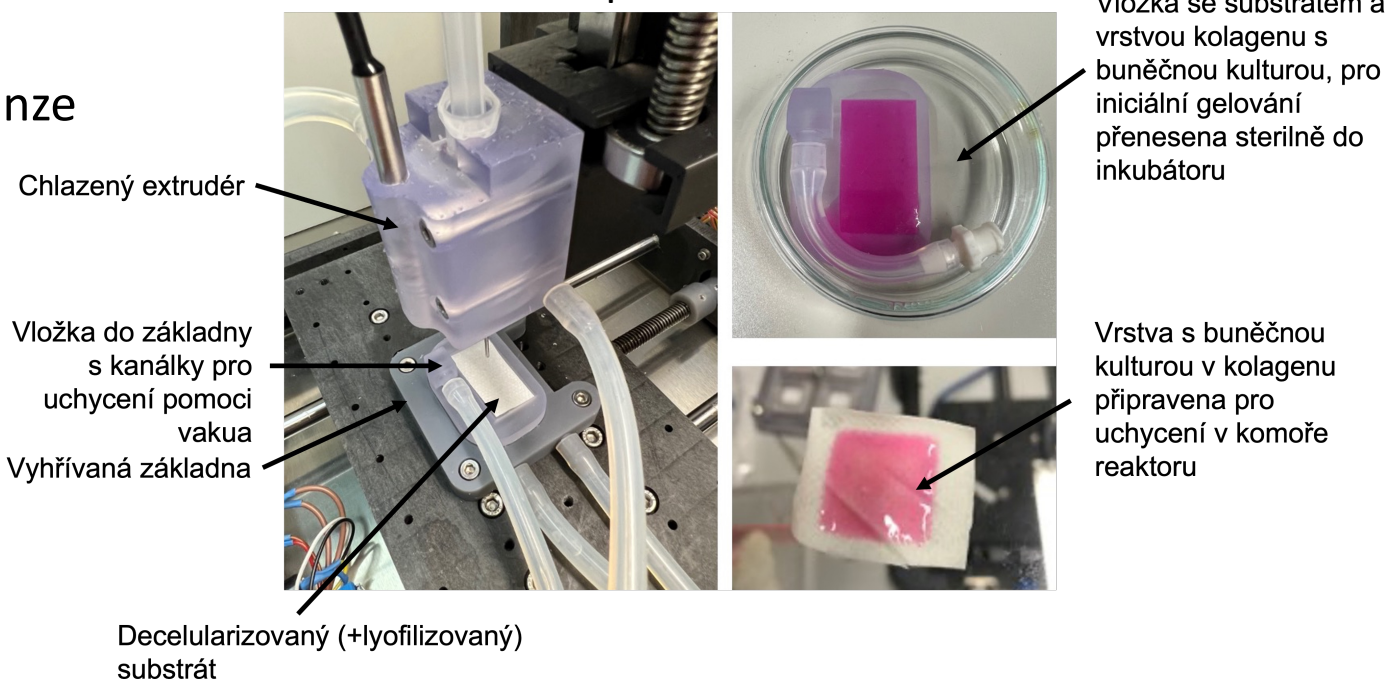
- Lyofilizace tkáně pro zvýšení schopnosti adheze gelu na substrát
- Vytvoření systému pro uchycení substrátu
 - Vakuová fixace vzorků – zajištění roviny při tisku
 - Vyhřívaná základna se sterilizovatelnou vložkou
 - Chlazený extruder s kartuší bioinkoustu
- Systém směšování kolagenu a buněčná suspenze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

50 x 50 mm²



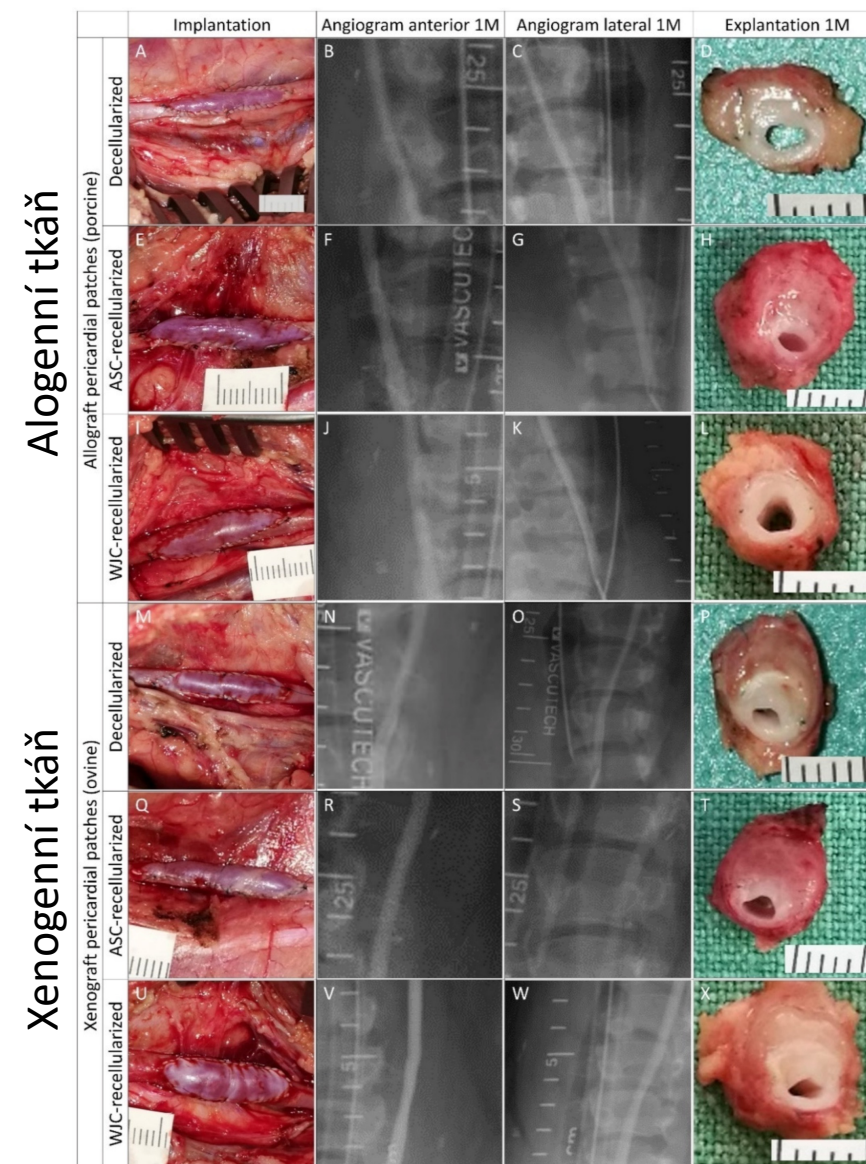
Směšovač kolagenu a buněčné suspenze

Příprava konstruktů



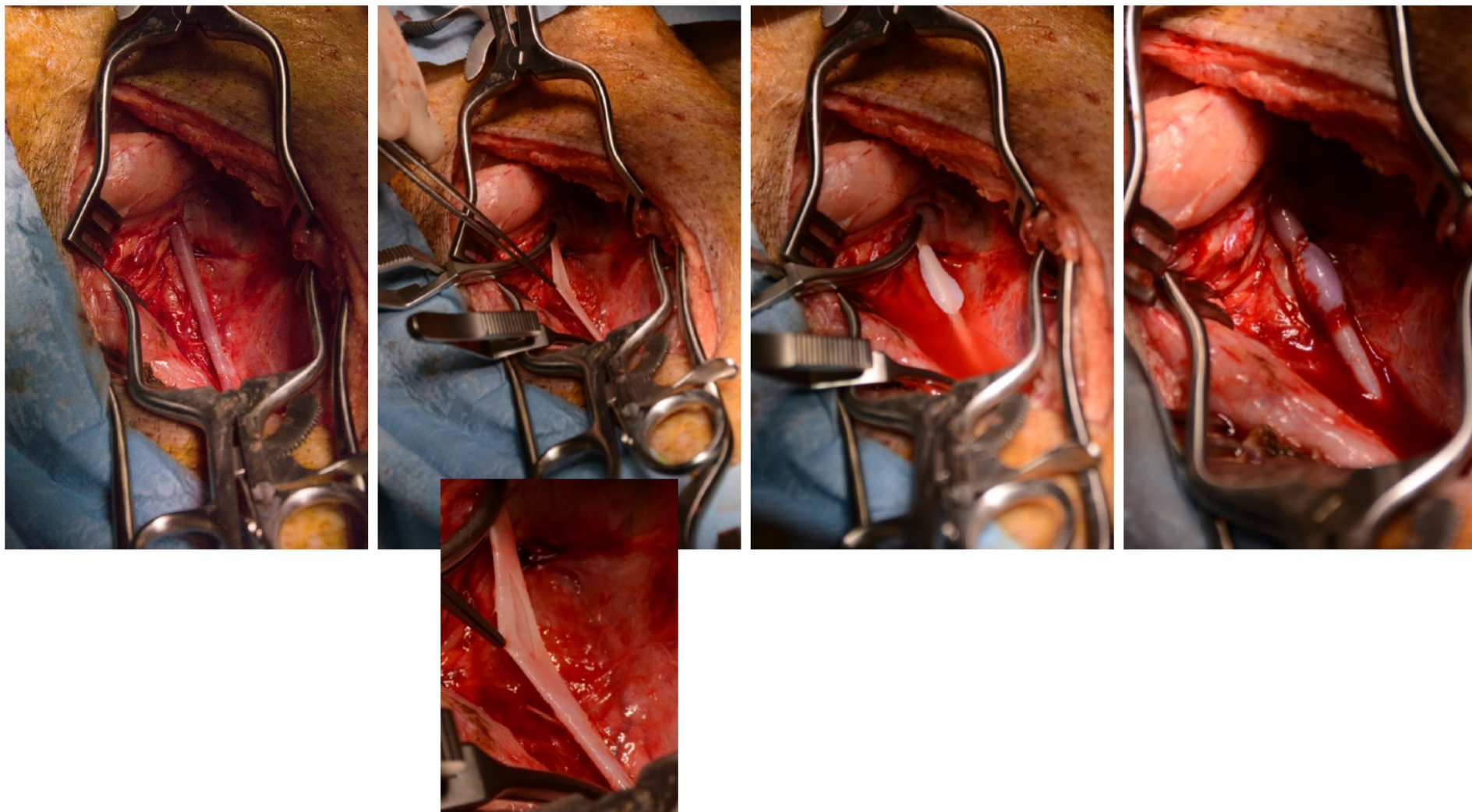
Kardiovaskulární záplaty v animálním modelu

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



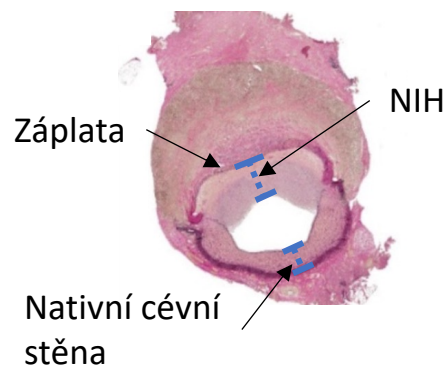


Kardiovaskulární záplaty v animálním modelu

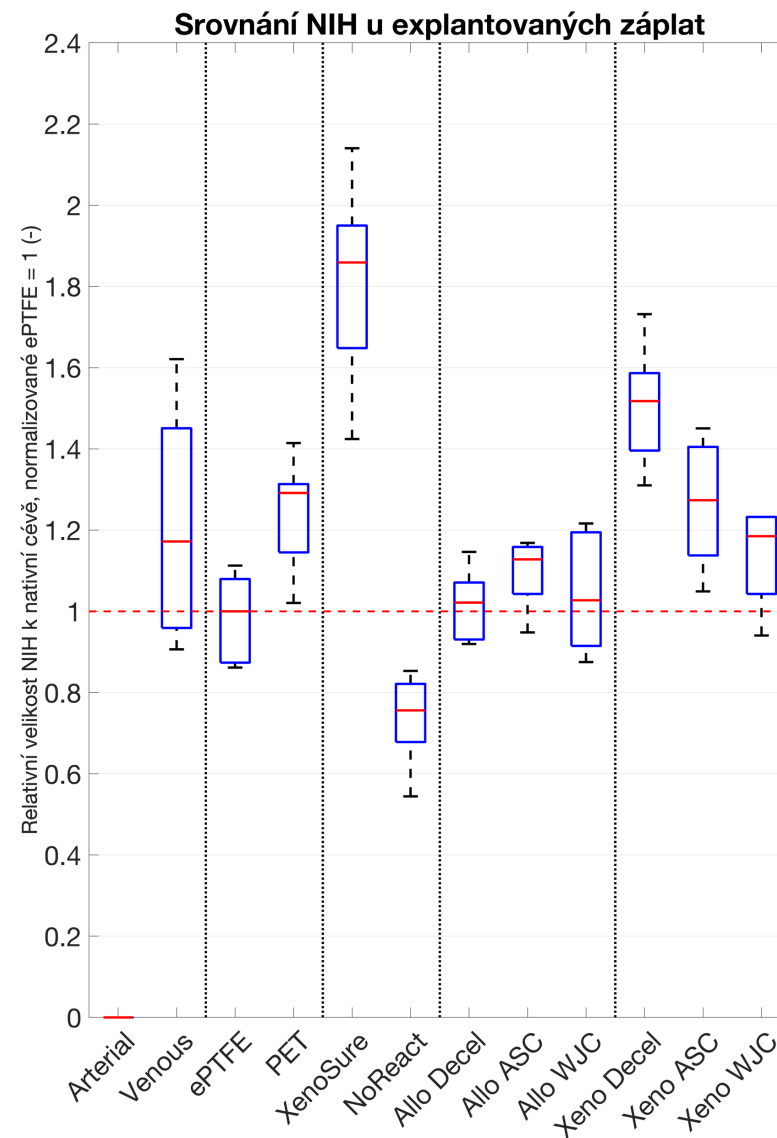
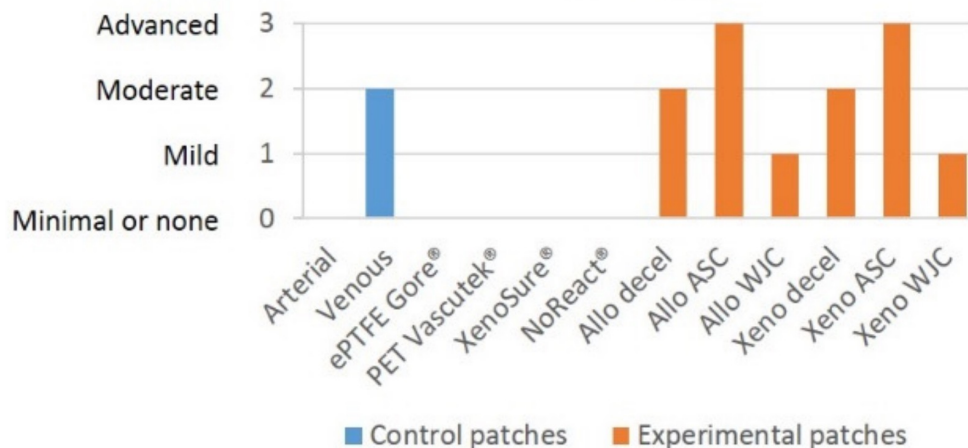


Kardiovaskulární záplaty – hodnocení explantátů

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

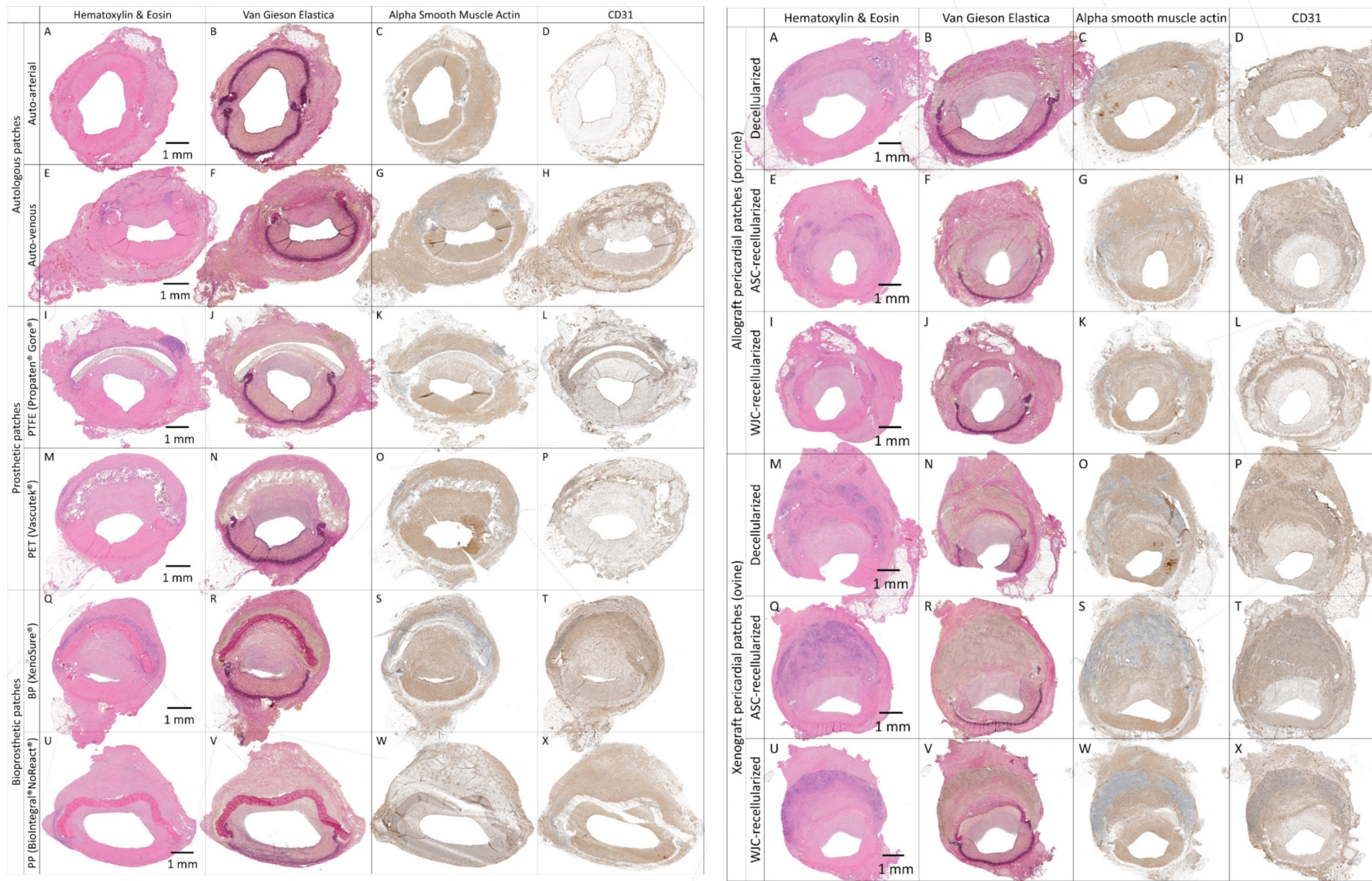


Hodnocení histologický řezů explantátů a jejich resorpce (škála 0 – 3)



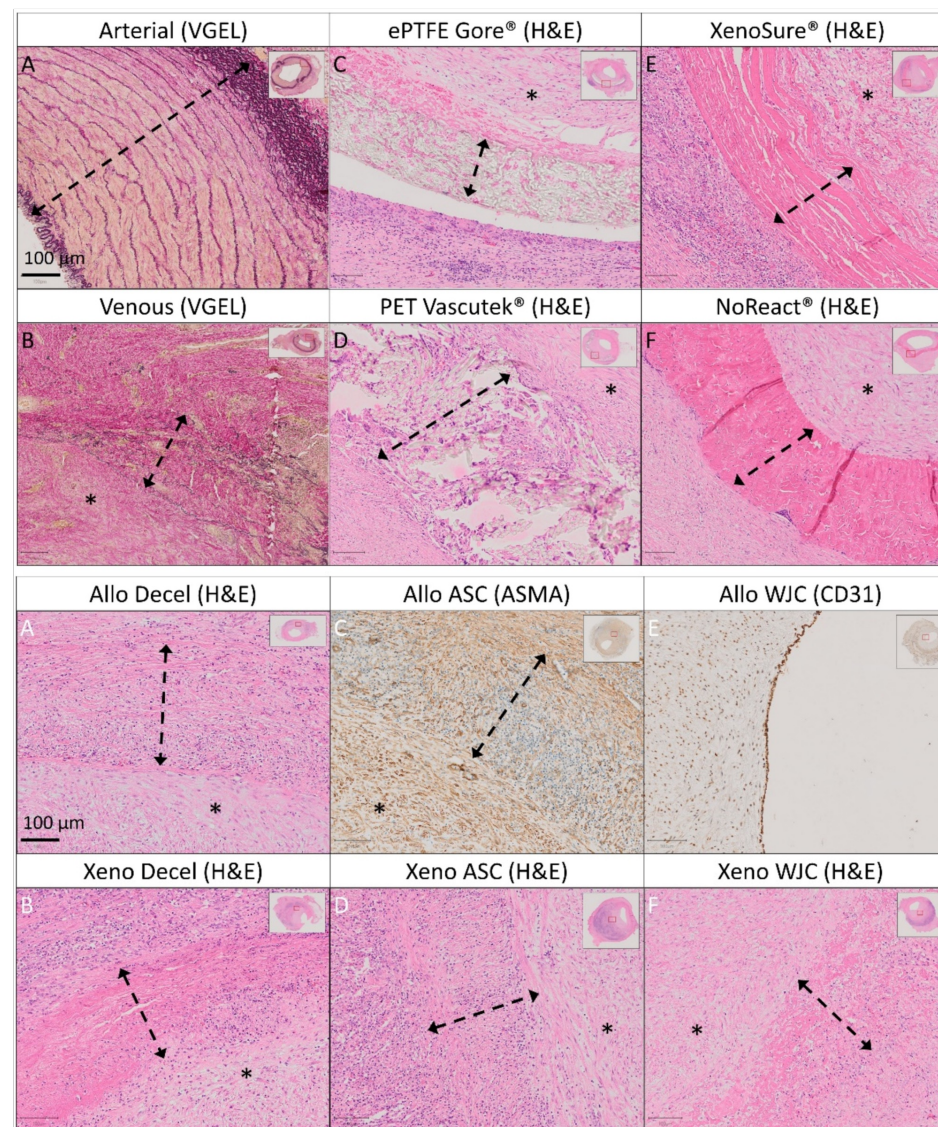


Histologie explantátů





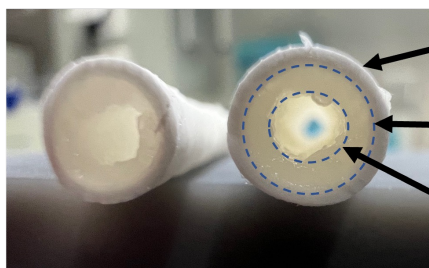
Detailní histologie explantátů





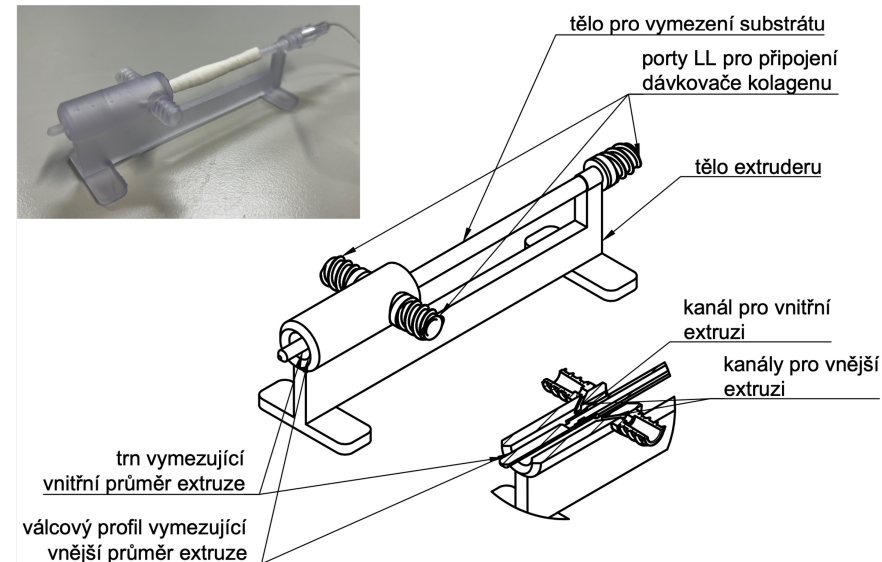
Příprava cévních náhrad

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



Decelularizovaný a lyofilizovaný substrát
Vnitřní stěna substrátu
Kolagen s heparinem

Sestava pro extruzi kolagenu do cévní náhrady



Tkáň osídlená buněčnou kulturou

Kultivační komora modulující proudění a tlakovou zátěž

Implantovaná náhrada do povodí *a. carotis*

