

# Jak si ochočit buňky

BUNĚČNÉ KULTURY, KMENOVÉ BUŇKY  
A TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

**Buňka je elementární částicí lidského těla, logicky tak tvoří i základ oboru tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny, které se snaží nahradit poškozené či nemocné tkáně a orgány.**

text a snímky **ROMAN MATĚJKA**

**V LIDSKÉM ORGANISMU** se nacházejí vysoce specializované buňky, například myocyty (svalové buňky), osteoblasty (kostní buňky), keratinocyty (pokožkové buňky), fibroblasty (buňky vazivové tkáně), neurony aj., které plní určitý účel. Nazýváme je buňky diferencované. Existují však také buněčné prekursor, jež se dovedou dále vyvíjet v různé typy buněk. A právě ony mají v tkáňovém inženýrství velké slovo. Jsou to kmenové buňky, jejichž původ ovlivňuje, jakou tkáň z nich lze připravit. V tomto směru jsou „supermany“ totipotentní embryonální kmenové buňky, které dokážou vytvořit jakoukoliv tkáň organismu, respektive celého jedince. Jejich získávání a následné použití však představuje etický problém.

Proto se pracuje na využití dalších typů buněk, které je možné získat z dospělého jedince. Jsou to buňky pluripotentní, které již nabírají určitý směr diferenciaci, ale stále mohou dát základ všem tkáním, jen nemohou sloužit k vytvoření nového organismu. Tento typ buněk by mohl být univerzálním zdrojem pro obnovu poškozených tkání, ale jejich získání je relativně komplikované.

Jednou z možností je přeprogramování genetické informace obyčejné dospělé buňky, například kožní (Vesmír 93, 139, 2014/3). Stále se však řeší bezpečnost jejich použití, existují obavy z nekontrolovaného růstu vedoucího ke vzniku nádorových tkání.

Jistou alternativou je využití buněk získaných po porodu z pupečnicků, konkrétně z jeho části zvané Whartonův rosol. Aktuální studie popisují tyto buňky jako pluripotentní a zároveň i imunoprivilegované, to znamená, že by neměly vyvolávat imunitní odpověď a mohly by se tak použít univerzálně ve vztahu dárce-příjemce.

V omezené míře mají schopnost diferencovat i buňky multipotentní, které již jsou predisponované pro daný typ tkáně - krve tvorné buňky, měkké tkáně, kostní buňky ap. Tento typ buněk lze získat mnohem jednodušeji, například z kostní dřevě, tukové tkáně, kůže. Jejich použití jako buněk univerzálních je však omezeno na autologní použití. Dárce i příjemce může být jen tenýž jedinec (o typech kmenových buněk viz také [vesmir.cz/kmenove\\_bunky](http://vesmir.cz/kmenove_bunky)).

## KULTIVAČNÍ BIOREAKTORY

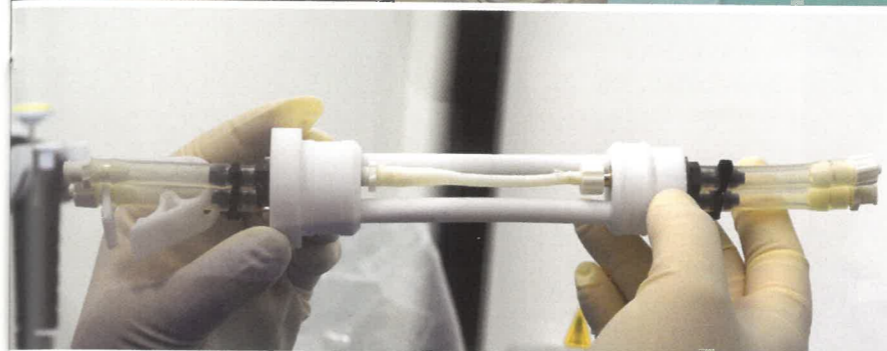
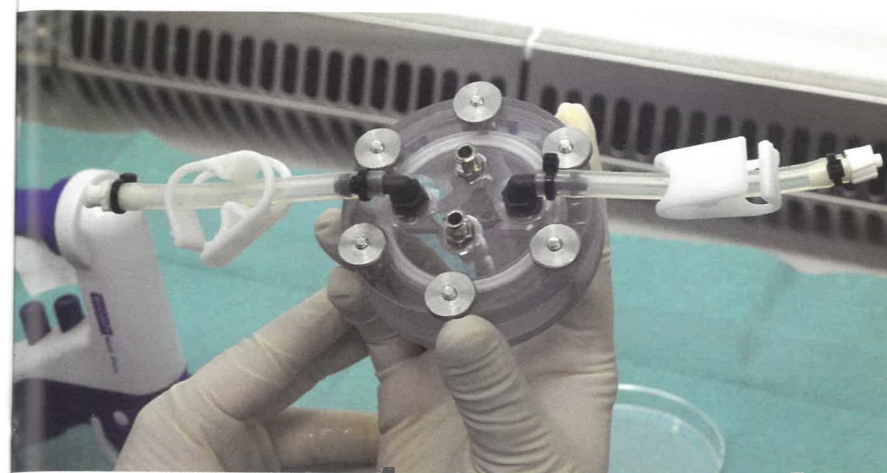
Na diferenciaci buňky do žádoucího typu má kromě původu kmenové buňky vliv i prostředí, ve kterém se buňka vyvíjí. Požadovaný typ tkáně proto můžeme získat úpravou okolních podmínek. Kmenové buňky lze v první řadě ovlivnit chemicky, nejjednodušeji kultivačním médiem a jeho složením. Kultivační médium je v zásadě výživný roztok a doplněním dalších látek (růstových faktorů, hormonů či vitaminů) lze podpořit buněčný růst nebo v případě kmenových buněk i jejich diferenciaci. Dále

můžeme působit fyzikálními vlivy. Například osteoblasty se vyvíjejí v prostředí kosti, v níž působí relativně velké tlaky a zároveň nízké proudění živného roztoku. Buňky endotelu potřebují pro svůj vývoj neustálé okolní proudění. Svalové buňky, myocyty, zase reagují na mechanické podněty, jako je natažení a tlak. Takových podmínek lze dosáhnout ve specializovaných bioreaktorech. Za nejdokonalejší bioreaktor by se pochopitelně dal označit živý organismus, v laboratorních podmínkách se mu snažíme alespoň přiblížit (obr. 1). Bioreaktory proto obsahují speciální kultivační komory, ve kterých je uchycen vhodný nosič a buněčná kultura. Komora je připojena k systému, který generuje definované proudění s možností vytvořit tlakové pulzy. Průběžně také dodává do kultivačního média růstové faktory nebo jiné chemické látky podporující růst buněk a jejich diferenciaci. Kultivace v těchto bioreaktorech probíhá bez přerušení po několik dnů až týdnů a po celou dobu musí tyto systémy buňkám zajišťovat vhodné životní podmínky bez vnější zásahu. Nutné je též zamezit vnější kontaminaci. [1, 2]

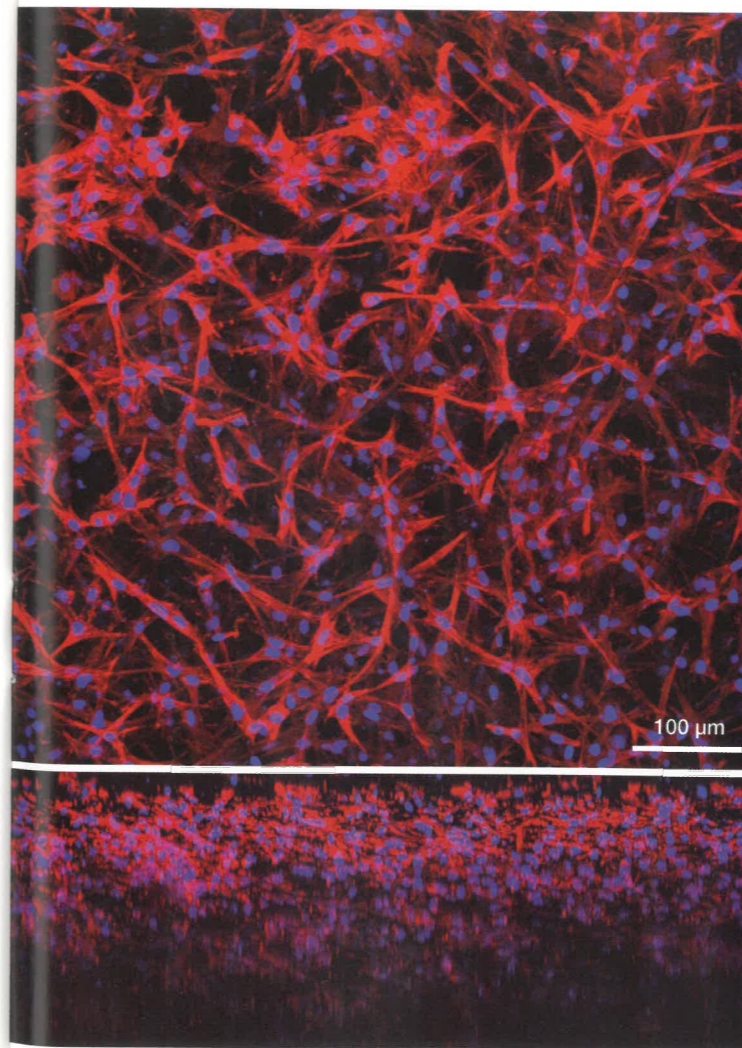
Tyto systémy jsou pro vývoj tkáňových a orgánových náhrad zásadní. Zmíňme blíže nový směr - cévní náhrady. Na cévu můžeme pohlížet jako na elastickou trubici, jejíž stěna je však tvořena z několika vrstev. Vnitřní část lumenu cévy (tunica intima) tvoří jedna vrstva endotelového epitelu, střední část (tunica media) vrstvy hladkého svalu a nechybí ani vnější vazivový obal (tunica adventitia). Cévu proudí krev - viskózní kapalina. Vnitřní endotelová vrstva je v přímém kontaktu s krví a mimo jiné vytváří kluznou plochu zabraňující koagulaci krve. Střední vrstva z hladkých svalů dodává elastické vlastnosti a umožňuje mimo jiné vazokonstrikci a vazodilataci stěn pro regulaci průtoku.

Z hlediska mechaniky však proudění krve vytváří smykové napětí na vnitřní stěně a systémový tlak cyklicky ovlivňuje celou elastickou stěnu. Tyto mechanické děje, které jsou v živém organismu běžné, jsou klíčové

**Doc. Ing. ROMAN MATĚJKA, Ph.D., (\*1986)** vystudoval Fakultu biomedicínského inženýrství ČVUT. Zaměřuje se především na vývoj specializovaných automatizovaných kultivačních systémů pro dynamickou kultivaci buněk, decelularizaci tkání a 3D biotisk. Na FBMI ČVUT vede výzkumnou skupinu Bioreaktory pro tkáňové a orgánové náhrady.



**1. RŮZNÉ KULTIVAČNÍ KOMORY BIOREAKTORŮ.** Vlevo nahoře je komora pro kombinovanou perfuzi a tlakovou stimulaci planární tkáně. Pod ní je komora s uchycenou decelularizovanou cévní tkání a vpravo průtočná sestava umístěná v mikroskopu umožňující živé snímání vývoje buněk.



**2. SNÍMKY z konfokální mikroskopie tisknutého kolagenového bioinkoustu s kulturou prasečích stromálních buněk.** Nahoře plošná projekce v rovině XY, dole projekce v řezu XZ (do hloubky vzorku). Červenou barvou je znázorněn aktinový cytoskelet, modrou jádra buněk [4].

i pro správný vývoj buněčného fenotypu, a v případě kmenových buněk jsou důležitým faktorem k jejich diferenciaci. Proto kultivační systémy musejí umět nastavit podmínky jako laminární proudění s daným smykovým napětím, toto proudění doplnit o proměnlivý tlak ap. Zároveň je nutné tyto parametry v průběhu procesu měnit s ohledem na vývoj buněčných kultur nebo jejich uchycení na substrát. Dalo by se říct, že buňky musíme učit na nové prostředí. Pokud bychom třeba hned po nasazení kmenových buněk vytvořili proudění jako ve velké tepně, jediným výsledkem by bylo odtržení buněk ze substrátu nebo buněčná smrt.

## SUBSTRÁT PRO BUNĚČNÝ RŮST

Aby buňky mohly růst, ať už staticky nebo v bioreaktorech, musíme jim zajistit vhodný substrát - oporu, na níž budou růst, a až se dostatečně namnoží, osídlí ji a vytvoří primitivní základ tkáně. Nosiče bývají z anorganických i organických materiálů (či z jejich kombinace). Pro základní experimenty in vitro poslouží například sklo nebo syntetické polymery. Pro pokročilejší aplikace se používají materiály, které svou stavbou a porozitou simulují strukturu tkáně, jako jsou např. kolagenová mikrovlákna a nanovlákna, hydrogely aj. Specifickým případem jsou biodegradabilní materiály, které jsou buňkami nebo organismem postupně remodelovány a rozloženy. Po určitém čase je tak vzniklá tkáň čistě biologická, bez vnějších příměsí. Buňky mohou daný nosič pouze povrchově porůst a vytvořit rozhraní mezi biomateriálem a živou tkání - to je příklad kostních nebo zubních implantátů. Případně buňky rostou přímo uvnitř biomateriálu a vytvářejí trojrozměrnou strukturu