

Čtyři snímky krkavice ©. Fabian, IKEM

podobnou reálné tkáni - tak je tomu třeba u cévních náhrad.

DECELULARIZOVANÉ TKÁŇE

Další alternativou pro tkáňové inženýrství jsou decelularizované tkáně. Proces decelularizace je vlastně opakem pěstování buněk; buněčný materiál se z tkáně odstraní a zachováno zůstanou pouze stavební proteiny mezibuněčné hmoty. Odstranění původního buněčného materiálu má výhodu - na minimum se tím snižuje imunogenita nosiče. Zachovávala mikrostruktura extracelulární hmoty je vhodná pro osídlení novou buněčnou kulturou (obr. 3). Tento proces se řeší ve specializovaných systémech.¹ V komoře je uchycena původní tkáň a postupně na ni působí různá činidla. Činidla (detergenty, hyper- a hypotonické roztoky a enzymy) postupně rozruší buněčnou stěnu a vymyjí z tkáně původní buněčný materiál. Nutný je i účinný oplach takové tkáně, aby zbytky činidel neničily nové buňky. Specializované systémy rovněž umožňují automatizovanou výměnu činidel (nutnou vzhledem

4. PRVNÍ TŘI SNÍMKY zobrazují průběh tisku kolagenového bioinkoustu na nanovláknový substrát. Na posledním obrázku je buněčný konstrukt v komoře bioreaktoru.

1) Skupina Bioreaktory pro tkáňové a orgánové náhrady při FBMI dlouhodobě spolupracuje s IKEM, Fyziologickým ústavem a Ústavem struktury a mechaniky horní AV ČR, s BIOCEV a s komerčními partnery PrimeCell Bioscience, a. s., BioHealing, s. r. o.

3. NA ČTYŘECH RŮŽOVÝCH SNÍMKÁCH vlevo jsou řezy cévní stěnou prasečí krkavice (aorta carotis) barvené pomocí hematoxylinu (tmavé jádra) a eosinu (mezibuněčná hmota). NA DVOU tmavých snímcích vpravo jsou kryořezy perikardem s jádry barvenými pomocí DAPI. Horní řada představuje nativní tkáň, v dolní řadě je tkáň decelularizovaná.

k relativně dlouhému procesu - hodiny až dny podle typu tkáně).

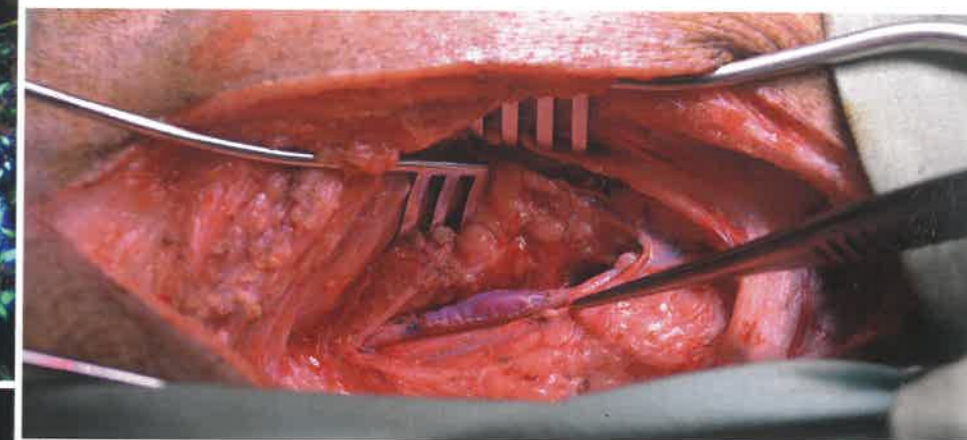
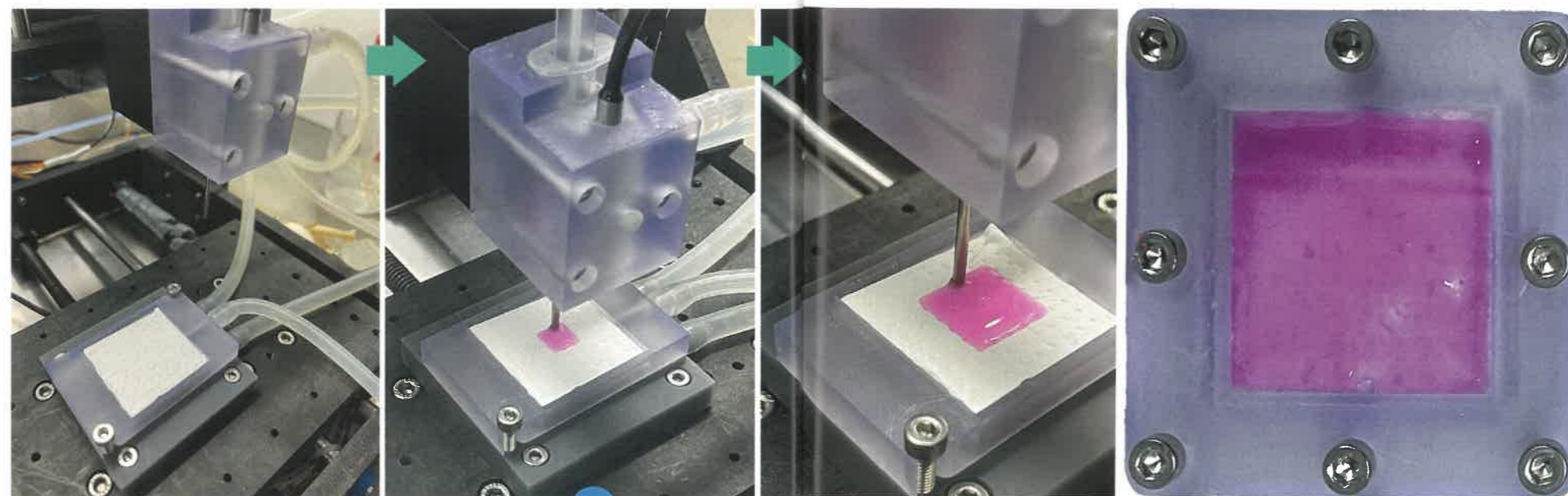
Tento postup je vhodný pro implantabilní náhrady, kdy je použita tkáň jiného dárce a je nutná imunopresivní léčba. Decelularizaci tkáně je imunitní odpověď minimalizována, i tak je ale vhodná další modifikace takto připravené tkáně. Decelularizaci cévy získáme mechanickou strukturou, přijdeme ale o buněčný materiál, včetně zmíněné kluzné

endotelové vrstvy. Pokud bychom však použili decelularizovaný materiál pro náhradu poškozené cévy, koagulace krve v kontaktu s materiálem by rychle vedla k trombóze. Proto je nutné decelularizované materiály dále upravit, například chemickým potahem s obsahem heparinu nebo využitím diferencovaných kmenových buněk. Vytvoří se tím dočasné podmínky pro osídlení tkáně vlastními buňkami příjemce a následnou

remodelaci v těle. Decelularizované nosiče v omezené míře umožňují využít tkáň i z jiného živočišného druhu.

3D BIOTISK

Aktuálním trendem v přípravě nosičů je 3D biotisk, při němž se využívají materiály napodobující strukturu extracelulární hmoty, tzv. bioinkousty. Nejběžnějším způsobem tisku je vytlačování hydrogelových struktur na vhodný substrát. Tiskárna nanáší materiál o daném tvaru v jednotlivých vrstvách. Výhodou biotisku je možnost jednak variabilně tvarovat výsledný konstrukt, jednak přímo včlenit buněčnou kulturu do bioinkoustu (obr. 4). Přímou po tisku tak vzniká trojrozměrná struktura a minimalizuje se



5. IMPLANTOVANÁ CÉVNÍ ZÁPLATA na defekt ve stěně krkavice (aorta carotis) ve zvířecím modelu (prase domácí).

dobu, během níž kultura musí vrůst do substrátu. Zároveň tento trojrozměrný model více simuluje reálnou tkáň (obr. 2). [3, 4]

MOŽNOSTI VYUŽITÍ

V oblasti vývoje nových cévních záplat a náhrad nyní probíhá mezioborový výzkum [5] na zvířecím modelu (praseti domácí). Jako základ jsou použity prasečí, ovčí nebo lidské tkáně (perikardy pro cévní záplaty a samotné tepny a žíly jako cévní náhrady), které dále decelularizujeme, případně ještě lyofilizujeme. Když použijeme více zdrojů tkání, můžeme simulovat podmínky různých konstruktů (alogenických: prase jako dárce - jině prase jako příjemce, nebo xenogenických: ovce nebo člověk jako dárce - prase jako příjemce). Připravené nosiče se dále chemicky modifikují a osidlují buněčnou kulturou. K tomu testujeme různé typy buněčných kultur. Jednak jsou to vlastní buňky příjemce - z tuku odvozené kmenové buňky nebo výše zmíněné kmenové buňky získané z pupečnicků, které nevytvářejí imunitní odpověď.

Takto osazené konstrukty kultivujeme v bioreaktorech, v nichž je podpořen růst

buněk do decelularizovaných tkání a zároveň je navozena diferenciací směrem k hladkému svaly. Konstrukty ve formě cévních záplat nebo náhrad implantujeme do zvířecího modelu (obr. 5) a hodnotíme jejich průchodnost, schopnost hojení a celkové remodelace, tj. schopnosti začlenění v těle. Konstrukty osídlené buněčnou kulturou obecně podporují hojení a při použití xenogenní tkáni i imunomodulaci [2].

Moderní medicína se dosud neobejde bez pokusů a testování na laboratorních zvířatech, avšak testování na buněčné úrovni významně pomáhá počet těchto pokusů snižovat v rámci konceptu „tří R“, neboli nahrazuje pokusná zvířata jinými alternativami (replacing), zdokonaluje použití výzkumných metod (refining) a snižuje počet zvířat na minimum (reducing). Buněčné kultury v řadě případů umožňují tvorbu modelových systémů. Právě kombinace pokročilých metod přípravy substrátů, jako je zmíněný 3D biotisk, a kultivační bioreaktory posouvají možnosti tvorby těchto modelů blíže k reálným tkáním nebo živým systémům [3]. ●

K dalšímu čtení...

- [1] Matějka R. et al.: Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Appl. Sci.* 10, 5473, 2020, DOI: 10.3390/app10165473.
- [2] Chlupac J. et al.: Vascular Remodeling of Clinically Used Patches and Decellularized Pericardial Matrices Recellularized with Autologous or Allogeneic Cells in a Porcine Carotid Artery Model. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 3310, 2022, DOI: 10.3390/ijms23063310.
- [3] Stepanovska J. et al.: Collagen Bioinks for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogel Properties, Bioprinting Parameters, Protocols, and Bioprinted Structure Characteristics. *Biomedicines* 9, 1137, 2021, DOI: 10.3390/biomedicines9091137.
- [4] Stepanovska J. et al.: Modification of High-Concentrated Collagen Bioinks as a Factor Affecting Cell Viability, Mechanical Properties, and Printability. *Gels* 7, 252, 2021, DOI: 10.3390/gels7040252.