



VI. mezinárodní konference

BIO 2014 IMPLANTOLOGIE



29.–30. dubna 2014, Brno, hotel Myslivna

PROGRAM KONFERENCE / SBORNÍK ABSTRAKT



SYMMA

KONFERENCE/KONGRESY/SYMPOZIA

VÁŠ OSVĚDČENÝ PARTNER PŘI REALIZACI

♦ KONGRESŮ

♦ KONFERENCÍ

♦ SYMPOZIÍ

♦ FIREMNÍCH PREZENTACÍ

♦ SPOLEČENSKÝCH AKCÍ

♦ DOPROVODNÝCH PROGRAMŮ

♦ VZDĚLÁVACÍCH KURZŮ

♦ PR SLUŽEB

WWW.SYMMA.CZ

Fakulta chemická, ústav chemie materiálů VUT v Brně
Central European Institute of Technology (CEITEC)

a

Společnost pro bioimplantologii ČLS JEP

pořádají

VI. mezinárodní konferenci

BIOIMPLANTOLOGIE 2014

29.–30. dubna 2014,
Brno, hotel Myslivna

PROGRAM KONFERENCE

Partner konference



Vědecký výbor

prof. RNDr. Josef Jančář, CSc.

Fakulta chemická, ústav chemie materiálů VUT v Brně

prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.

Klinika hematonekologie Fakultní nemocnice Ostrava

MUDr. Barbara Kubešová

Společnost pro bioimplantologii ČLS JEP

MUDr. Petr Vališ, Ph.D.

Ortopedická klinika LF MU a Fakultní nemocnice Brno

doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.

Hematologicko-onkologické oddělení Fakultní nemocnice Plzeň

Organizační výbor

MUDr. Barbara Kubešová

Ing. Richard Klimovič

Drahomíra Procházková

Hlavní témata konference

- **Kmenové buňky**
- **Nové materiály pro bioimplantologii a tkáňové inženýrství**
- **Seeding buněk, jejich růst a transformace**
- **Klinická aplikace tkání a buněk**
- **Preklinická testování**
- **Legislativa a systém kvality**

Organizační garant konference

SYMMA, spol. s r.o.

Aleš Martinek

Kounicova 13, 602 00 Brno

Mobil: +420 607 650 654

E-mail: a.martinek@symma.cz

www.symma.cz

Partner a vystavovatel

Trigon Plus, spol. s r.o.,
Čestlice, Západní 93, Říčany u Prahy



Vystavovatelé

BARIA s.r.o.,
Videňská 104, Vestec



BIOMEDICA ČS, s.r.o.,
Sokolovská 100/94, Praha



BioTech a.s.,
Tymiánova 619/14, Praha



Dispolab, s.r.o.,
Jugoslávská 123, Brno



Eppendorf Czech & Slovakia, s.r.o.,
Kolovratská 1476, Říčany u Prahy



EXBIO Praha, a.s.,
Nad Safinou II 341, Vestec



Sarstedt spol. s r.o.,
Pod Pekárnami 338/12, Praha



SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.,
Sokolovská 100/94, Praha



Schoeller Pharma Praha, s.r.o.,
Jihočeská 514/8, Praha



Prezentující se firmy

SpinChem,
Těšínska 6, Plzeň



World Courier Czech Republic, s.r.o.,
Tlumačovská 18 / 1118, Praha



9.15 – 9.30 hod Zahájení konference

9.30 – 11.00 hod Přednáškový blok I.

Předsednictvo: M. Šlais, I. Šurová

Typy preklinických studií 40'

Šlais M.

MediTox s.r.o

Preklinická hodnocení – praktické zkušenosti 35'

Šurová I.

MediTox s.r.o

Diskuze

11.00 – 11.30 hod Coffee break

11.30 – 13.00 hod Přednáškový blok II.

Předsednictvo: D. Lysák, R. Pytlík

Legislativa týkající se neklinických dat pro LPMT 20'

Kolouchová E.

Státní ústav pro kontrolu léčiv

Preklinické testování buněčného přípravku a komunikace se SÚKL – praktické zkušenosti 12'

Pytlík R., Fales I., Rychtrmocová H., Stehlík D., Slanař O.

I. interní klinika I. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice Praha

Vývoj léčivého přípravku Moderní terapie a jeho zavedení do praxe v podmínkách zdravotnického zařízení 12'

Lysák D., Holubová M., Jindra P.

Fakultní nemocnice Plzeň, Hematologicko-onkologické oddělení

NK buňky proti relapsu hemato-onkologických onemocnění? Začátek cesty 12'

Holubová M., Lysák D., Jindra P.

Fakultní nemocnice Plzeň

Odběry speciálních typů buněk z periferní krve technikou aferézy: historie, současnost, moderní trendy 12'

Kořístek Z.

Klinika hematoonkologie, Fakultní nemocnice Ostrava

International Clinical Research Center, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Diskuze

13.00 – 14.00 hod Oběd

14.00 – 15.30 hod Přednáškový blok III.

Předsednictvo: M. Kuklík, J. Dragúňová

3D nanovláknenné kompozitní materiály s inkorporovanými aktivními látkami určené pro aplikaci v tkáňovém inženýrství 12'

Jenčová V., Procházková R., Chvojka J., Košťáková E., Mikeš P.

Technická Univerzita

Study of mechanobiological properties of human functional cardiomyocytes using Atomic Force Microscopy 12'

Příbyl J., Pešl M., Acimovic I., Vilotic A., Meli A.C., Rotrekl V., Dvořák P., Skládal P.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Biologický ústav

Materiálové vlastnosti pojivových tkání významné pro implantologii a transplantace 12'

Kuklík M.

Genetické pracoviště 3. LF UK, Oddělení molekulární endokrinologie, EÚ Praha

Vliv různých kultivačních substrátů na proliferaci, stratifikaci a diferenciaci buněk in vitro 12'

Matoušková E., Plíštil L., Mandys V., Krbec M.

Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Centrum aplikované bioimplantologie

Štúdium bioinkompatibility nanovláknovej matrice modifikovanej biologicky aktívnymi látkami 12'

Michlíková M.¹, Dragúňová J.², Bakoš D.¹, Hnátová M.¹

Slovenská Technická Univerzita v Bratislavě, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská republika¹

Klinika popálenín Lekárskej fakulty Univerzity Komenského Bratislava, Slovenská republika²

Diskuze

15.30 – 16.00 hod Coffee break

16.00 – 17.30 hod Přednáškový blok IV.

Předsednictvo: L. Vojtová, L. Zubal

Chitin/chitosan-glucan complex based scaffold for tissue engineering application 12'

Abdel-Mohsen

CEITEC

Charakterizace a in vitro testování kolagen/polysacharidových kompozitních skafoldů pro medicínské aplikace **12'**

Uhrová L., Mohsen A., Vojtová L., Jančář J.

VUT v Brně, Fakulta chemická

Separace a charakterizace atelokolagenu **12'**

Zubal L., Mohsen A., Vojtová L., Matoušková P., Konečná Z.

CEITEC

Významné baktericidní účinky želatinových nanovláken modifikovaných oxidovanou celulórou **12'**

Švachová V., Pavlíňák D., Alberti M., Vojtová L., Jančář J., Hyrší P.

VUT v Brně, Fakulta chemická

3D zobrazení skafoldů a buněk pomocí mikroCT **10'**

Vojtová L.¹, Židek J.¹, Zubal L.¹, Zikmund T.¹, Prosecká E.², Rampichová M.², Chmelík J.³, Jakubíček R.³, Walek P.³, Jan J.³, Kaiser J.¹

CEITEC VUT, Brno¹

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha²

Ústav biomedicínského inženýrství, FEKT VUT v Brně³

Diskuze

18.00 hod **Schůze Společnosti pro bioimplantologii ČLS JEP**

20.00 – 24.00 hod **SPOLEČENSKÝ VEČER**

9.00 – 10.30 hod Přednáškový blok V.

Předsednictvo: P. Vališ, J. Vojtaššák

Využitie autograftov na báze autolónnych MSC pri recidivujúcich rázštepov podnebia 12'

Vojtaššák J.^{1,2}, Mračna J.³, Ušaková V.⁴, Galbavý Š.⁵

Faculty of Health and Social Care, Trnava University, Trnava¹

Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava²

Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava³

Department of Hematology, Oncological Institute of St. Elisabeth, Bratislava⁴

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava⁵

Dlouhodobé výsledky operací TEP kyčle s využitím Burch-Schneiderovy dlahy 12'

Břízová P., Vališ P., Burda J.

Ortopedická klinika LF MU a Fakultní nemocnice Brno

Srovnání techniky implantace solidního chondrograftu a metody prostých návrtů při řešení defektů chrupavky nosných kloubů 12'

Vališ P., Rouchal M., Novák J., Otaševič T., Pavlovský Z.

Ortopedická klinika LF MU a Fakultní nemocnice Brno

Terapie osteochondrálního defektu králíka pomocí hydrogelu z kolagenu 1 a fibrinu obohaceného o trombocyty a PCL mikročástice 12'

Rampichová M., Filová E., Lukášová V., Bzugo M., Tonar Z., Litvinec A., Beznoska J., Plecner M., Míčková A., Benešová J., Soural M., Chvojka J., Ďoubal S., Kuchařová M., Kralíčková A., Kralíčková M., Amler E.

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Kolagen/Hydroxyapatitový nosič funkcionalizovaný nanovlákný z Polykaprolaktonu, trombocytárním koncentrátem a mesenchymálními kmenovými buňkami pro regeneraci kostních defektů in vivo 12'

Prosecká E., Rampichová M., Litvinec A., Vojtová I., Kochová P., Tonar Z., Plecner M., Bzugo M., Amler E.

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Use of human autologous MSC in treatment of rotator cuff rupture – a case report 12'

Stehlík D., Sevastanová O., Havlas V., Kotaška J., Konrádová Š., Jendelová P., Trč T., Syková E.

Ortopedie 2. LF UK Fakultní nemocnice v Motole

Diskuze

10.30 – 11.00 hod Coffee break

11.00 – 12.30 hod Přednáškový blok VI.

Předsednictvo: M. Benko, J. Kytka

Přínos histologie při posuzování in vivo hojení ran při aplikaci tkáňových nosičů 12'

Kubíková T.¹, Filová E.², Prosecká E.², Plecner M.², Tonar Z.¹

Ústav histologie a embryologie, Biotechnologické centrum LF UK v Plzni¹

Oddělení tkáňového inženýrství, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.²

Vývoj nové soupravy určené pro počítání CD 34+ hematopoetických buněk 12'

Benko M.¹, Jinoch P.¹, Šrámková M.¹, Sutherland R.², Suchánek M.¹

EXBIO Praha a.s., Oddělení vývoje produktů, Vestec u Prahy¹

Toronto General Hospital, Eaton, Toronto, Ontario, Kanada²

Imaging Flow Cytometry 12'

Korbel M.

BioTech a.s.

GxP v přepravě 12'

Kytka J.

World Courier Czech Republic, s.r.o.

Správné stanovení viability a potenciálu buněk před transplantací 12'

Držík O.

Baria

Diskuze

12.30 – 13.30 hod Oběd

Termination pattern of nanocrystalline diamond controls cell behavior

Brož A.¹, Ukraintsev E.², Babchenko O.², Verdánová M.^{1,3}, Kromka A.², Rezek B.², Hubálek Kalbáčová M.^{1,4}

Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague¹

Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i.²

Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences³

Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague⁴

Vliv biomimetické modifikace polylaktidu funkcionalizovanými blokovými kopolymeru na růstové vlastnosti osteosarkomových buněk

Janoušková O., Mázl Chánová E., Machová L., Kubies D., Cuchalová L., Rypáček F.

Ústav makromolekulární chemie v.v.i. AV ČR

Characterization of human adipose tissue-derived stromal cells from diabetic patients with critical limb ischemia

Kočí Z.^{1,2}, Turnovcová K.¹, Dubský M.³, Baranovičová L.¹, Holáň V.¹, Chudičková M.¹, Syková E.^{1,2}, Kubínová Š.¹

Department of Neuroscience, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science, Prague¹

Department of Neuroscience, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic²

Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic³

Testování biokompatibilitu nanostrukturovaného titanu pro použití v tkáňovém inženýrství

Ostrovská L.¹, Sauerová P.¹, Vištejnová L.¹, Džugan J.², Hubálek Kalbáčová M.¹

Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze¹

Comtes FHT a.s.²

Příprava pluripotentních kmenových buněk dediferenciací somatických buněk Pokorná D.

Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i.

Biocompatibility of polyanilines with neural progenitors and cardiomyocytes in vitro

Radaszkiewicz K. A., Lánová M., Vičárová H., Hanáčková M., Humpolíček P., Pacherník J.

Masarykova univerzita

Perspectives in the use of myoblasts in mitochondrial diagnostics and bioimplantology

Sládková J., Kostková O., Spáčilová J., Hansíková H., Zeman J.

Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

Histologická analýza rozhraní bionických implantátů na bázi kolagenu, poly(DL-laktidu) a kalcium fosfátu

Suchý t.^{1,3}, Staněk I.², Sucharda Z.¹, Šupová M.¹, Balík K.¹, Sedláček R.³

Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, Ústav struktury a mechaniky hornin, Akademie věd České republiky, v.v.i.¹

Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha²

Laboratoř biomechaniky, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Fakulta strojní, ČVUT v Praze³

Nové možnosti využití mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v chirurgii spánkové kosti

Školoudík L., Chrobok V., Filip S., Laco J., Dědková J., Kočí Z.

Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Klinika onkologie a radioterapie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Radiologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Ústav experimentální medicíny Akademie věd České republiky, v.v.i.

Místo konání

Hotel Myslivna, Nad Pisárkami 276/1, 623 00 Brno

Registrační poplatky

Lékaři	do 18. dubna 2014	Kč 1 400,-	na místě	Kč 1 600,-
NLZP	do 18. dubna 2014	Kč 900,-	na místě	Kč 1 100,-
Komerční sektor		Kč 6 000,-		

V registračním poplatku je zahrnuto vstupné na konferenci, občerstvení v průběhu akce, vstupenka na společenský večer, sborník přednášek, konferenční materiály a DPH.

Registrace účastníků

29. dubna 2014 08.00 – 14.00 hod

30. dubna 2014 08.30 – 10.00 hod

Registrující osoby Vám rádi sdělí Vaše event. dotazy.

Konferenční materiály

Program konference vč. sborníku abstrakt a jmenovka.

Oběd

Obědy formou menu zajistí zájemcům organizátor akce v hotelové restauraci, cena a' Kč 130,-. Zájemce o bezmasé jídlo žádáme, aby svůj požadavek sdělili registrujícím osobám.

Společenský večer

Společenský večer formou rautu se koná dne 29. dubna 2014 v hotelu Myslivna. Vstupenka na společenský večer je zahrnuta v registračním poplatku.

Doprovodná výstava firem

Doprovodná výstava firem bude probíhat po celou dobu konání konference. V prostorách doprovodné výstavy bude umístěno občerstvení pro účastníky a posterová sekce.

INFORMACE PRO PŘEDNÁŠEJÍCÍ

Konferenční technika

- Dataprojektor
- PC
- Bezdrátová myš vč. laserpointu
- Náhledový monitor

Techniku je možné si vyzkoušet před zahájením konference nebo v průběhu přestávek. Technická obsluha bude k dispozici v přednáškovém sále po celou dobu konání konference.

Prezentace

Prezentace, které od Vás převezme technická obsluha v přednáškovém sále, prosíme dodat na CD/DVD nebo USB Flash disku.

SBORNÍK ABSTRAKT
BIOIMPLANTOLOGIE 2014
29.–30. dubna 2014

Abstrakta neprošla jazykovou úpravou.

Obsah:

Typy preklinických studií	18
Preklinické hodnocení - praktické zkušenosti.....	19
Legislativa týkající se neklinických dat pro LPMT	20
Preklinické testování buněčného přípravku a komunikace se SÚKL - praktické zkušenosti	21
Vývoj léčivého přípravku moderní terapie a jeho zavedení do praxe v podmínkách zdravotnického zařízení	22
NK buňky proti relapsu hemato-onkologických onemocnění - začátek cesty	23
Odběry speciálních typů buněk z periferní krve technikou aferézy: historie, současnost, moderní trendy	24
3D nanovláknenné kompozitní materiály s inkorporovanými aktivními látkami určené pro aplikaci v tkáňovém inženýrství	25
Study of mechanobiological properties of human functional cardiomyocytes using Atomic Force Microscopy	26
Materiálové vlastnosti pojivových tkání významné pro implantologii a transplantace	27
Vliv různých kulturačních substrátů na proliferaci, stratifikaci a diferenciaci buněk in vitro	30
Štúdium biokompatibility nanovláknovej matrice modifikovanej biologicky aktívnymi látkami.....	31
Chitin/chitosan-glucan complex based scaffold for tissue engineering application	32
Charakterizace a in vitro testování kolagen/polysacharidových kompozitních scaffoldů pro medicínské aplikace	33
Separace a charakterizace atelokolagenu	34
Významné baktericidní účinky želatinových nanovláken modifikovaných oxidovanou celulózu.....	35
3D zobrazení scaffoldů a buněk pomocí mikroCT	36
The use of auto grafts based on Mesenchymal stem cells for recidivate cleft palate treatment	37
Dlouhodobé výsledky operací TEP kyčle s využitím Burch- Schneiderovy dlahy	38
Srovnání techniky implantace solidního chondrograftu a metody prostých návrťů při řešení defektů chrupavky nosných kloubů.....	39
Terapie osteochondrálního defektu králíka pomocí hydrogelu z kolagenu I a fibrinu obohaceného o trombocyty a PCL mikročástice	40
Kolagen/Hydroxyapatitový nosič funkcionalizovaný nanovláknky z Polykaprolaktonu, trombocytárním koncentrátem a mesenchymálními kmenovými buňkami pro regeneraci kostních defektů in vivo	41
Use of human autologous MSC in treatment of rotator cuff rupture - a case report	42
Přínos histologie při posuzování in vivo hojení ran při aplikaci tkáňových nosičů.....	43

Vývoj soupravy určené pro počítání CD34+ hematopoetických buněk pomocí průtokové cytometrie.....	44
Imaging Flow Cytometry	45
GxP v přepravě	46
Správné stanovení viability a potenciálu buněk před transplantací	46

Posterová sekce

Termination pattern of nanocrystalline diamond controls cell behavior	47
Vliv biomimetické modifikace polylaktidu funkcionalizovanými blokovými kopolymery na růstové vlastnosti osteosarkomových buněk	48
Characterization of human adipose tissue-derived stromal cells from diabetic patients with critical limb ischemia	49
Testování biokompatibility nanostrukturovaného titanu pro použití v tkáňovém inženýrství	50
Příprava pluripotentních kmenových buněk dediferenciací somatických buněk	51
Biocompatibility of polyanilines with neural progenitors and cardiomyocytes in vitro	52
Perspectives in the use of myoblasts in mitochondrial diagnostics and bioimplantology	53
Histologická analýza rozhraní bionických implantátů na bázi kolagenu, poly(DL-laktidu) a kalcium fosfátu	54
Nové možnosti využití mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v chirurgii spánkové kosti ...	55

Typy preklinických studií**Šlais M.***MediTox s.r.o.*

Development of new pharmaceuticals includes regulatory based preclinical testing of potential compounds in biological models. Differences in testing strategies between all substances coming into contact with human body and potentially affecting human health, including pharmaceuticals, biopharmaceuticals, medical devices and food additives will be briefly presented. Using of relevant test system for preclinical testing is the most important issue. Effects of new pharmaceuticals are evaluated using in silico, in vitro, ex vivo and in vivo models.

The standard preclinical testing package includes studies of genotoxicity, immunotoxicity, safety pharmacology, acute toxicity, sub/chronic toxicity, ADME, PK/TK, reproductive and developmental toxicity, neurotoxicity and carcinogenicity, however not all of them are required for approval of following clinical phase in humans.

Due to ethical reasons related to using of experimental animals, new alternative methods were developed to assess safety of pharmaceuticals and chemicals, however list of validated methods is still very limited.

Preklinické hodnocení - praktické zkušenosti**Šurová I.***MediTox s.r.o.*

Fáze vývoje léčiv (vyhledávací, raná a pokročilá preklinická), účel preklinického hodnocení, požadavky na kvalitu preklinického hodnocení (GLP), požadavky na prekliniku z hlediska kategorií „produktů“ (malé molekuly, biologické látky, zdravotnické prostředky) a regulačních autorit (EMA, FDA), fáze klinického zkoušení (I - III) a preklinická podpora klinického zkoušení, role smluvně-výzkumné organizace (Contract Research Organization) v procesu farmaceutického/biotechnologického vývoje, ideální způsob komunikace mezi zadavatelem a smluvně výzkumnou organizací.

Legislativa týkající se neklinických dat pro LPMT*Kolouchová E.**Státní ústav pro kontrolu léčiv*

Z důvodu jedinečných a rozmanitých strukturálních a biologických vlastností léčivých přípravků pro moderní terapii (LPMT) jsou Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1394/2007 o léčivých přípravcích pro moderní terapii a Směrnicí komise 2009/120/ES definovány požadavky ohledně farmakologických a toxikologických zkoušek těchto léčivých přípravků, specificky pro LP pro genovou terapii, pro LP pro somatobuněčnou terapii a přípravky tkáňového inženýrství. V neklinickém přehledu musí být zohledněno a opodstatněno odůvodnění neklinického vývoje a kritéria použitá pro výběr příslušných druhů a modelů (in vitro a in vivo). Zvolený zvířecí model/modely může zahrnovat zvířata se sníženou imunitou, zvířata s cíleně inaktivovaným (knock-out) genem, či zvířata humanizovaná nebo transgenní. Zvaží se použití homologních modelů (např. buňky myši analyzované u myši) nebo modely napodobující onemocnění, zejména pro studie imunogenity a imunotoxicity. Kromě těchto požadavků se musí prokázat bezpečnost, vhodnost a biokompatibilita všech strukturálních složek (jako jsou matrice, nosné struktury a zdravotnické prostředky) a případných dalších látek (jako jsou buněčné přípravky, biomolekuly, biomateriály a chemické látky), které jsou přítomny v konečném přípravku. Je nutné zohlednit jejich fyzikální, mechanické, chemické a biologické vlastnosti. Při analýze rizik mohou být rovněž využity relevantní dostupné neklinické a klinické údaje nebo zkušenosti s jinými souvisejícími léčivými přípravky pro moderní terapii.

Vodítkem k dodržení legislativních požadavků jsou právně nezávazná doporučení „guidelines“ odborných pracovních skupin evropské lékové agentury uveřejněné na webových stránkách www.ema.europa.eu – Human regulatory – Scientific guidelines – Multidisciplinary.

Preklinické testování buněčného přípravku a komunikace se SÚKL - praktické zkušenosti*Pytlík R., Fales I., Rychtrmocová H., Stehlík D., Slanař O.**1. interní klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice Praha*

V rámci preklinického testování buněčného přípravku má velký význam spolupráce se Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). Požadovaná dokumentace pro SÚKL v CTD formátu musí obsahovat informace o funkčnosti přípravku na preklinickém modelu (proof of the principle), údaje o farmakodynamice přípravku – charakterizaci pomocí průtokové cytometrie, růstových vlastností, molekulární biologie – a dále o farmakokinetice, toleranci a toxicitě přípravku. Dále je nutno dodat dokumentaci o způsobu získávání biologického materiálu, dokumentaci o komponentách použitých ve výrobním postupu, standardní operační postupy a údaje o způsobu propouštění léčebného přípravku. Uvedené postupy je nutno dokumentovat na vzorových šaržích výrobku. Probíhající jednání se SÚKL budeme prezentovat na konkrétním příkladu našeho přípravku MarrowTHERA.

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT 13531/4

Vývoj léčivého přípravku moderní terapie a jeho zavedení do praxe v podmínkách zdravotnického zařízení

Lysák D., Holubová M., Jindra P.

Fakultní nemocnice Plzeň, Hematologicko-onkologické oddělení

Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) je závažnou komplikací u pacientů po alogenní transplantaci hemopoetických kmenových buněk. Může nepříznivě ovlivnit kvalitu života transplantovaných nemocných a celkový výsledek transplantační léčby. Jednou z moderních metod léčby resistantních forem GVHD by mohla být aplikace mesenchymálních stromálních buněk (MSC) a využití jejich imunomodulačních vlastností.

Mesenchymální stromální buňky spadají jako léčivý přípravek moderní terapie do oblasti zákona o léčivech. I pro pracoviště, která jsou zvyklá rutinně transplantovat a zacházet s kmenovými (krvetočnými) buňkami, je zavedení takovéto léčebné metody výzvou, která si vyžaduje mobilizovat personální i materiální zdroje.

Celý proces probíhal v našich podmínkách ve čtyřech fázích. Po teoretické přípravě bylo nejprve uskutečněno velké množství in vitro experimentů ke stanovení vhodných podmínek izolace, kultivace a kryokonzervace MSC a byly definovány analytické metody kontroly kvality. Po optimalizaci kultivačního protokolu byly ve druhé fázi prováděny funkční testy ověřující in vitro imunomodulační efekt MSC kokultivací s alogenními lymfocyty. Dalším krokem bylo přenesení projektu do rozměrů vyžadovaných plánovanou klinickou aplikací (large scale). Byla zavedena a otestována výroba léčivého přípravku moderní terapie podle zásad SVP, farmaceutický systém kvality i logistika. Výrobní procedury byly opakovaně validovány, byly zahájeny stabilitní studie. Postupně vznikla veškerá dokumentace pro výrobní procedury, fungování čistého prostoru i management jakosti. V poslední fázi celého projektu byla připravována a konsultována dokumentace pro povolení klinického hodnocení léčivého přípravku moderní terapie.

Doba trvání přípravy projektu od prvních in vitro experimentů do klinické aplikace byla cca 3 roky. Realizace projektu v podmínkách státního zdravotnického zařízení znamenala některé handicap, ale i některé výhody či příznivé okolnosti. Autoři se podělí o své zkušenosti při jejich řešení a překonávání.

Práce byla podpořena grantem Nadace pro transplantaci kostní dřeně.

NK buňky proti relapsu hemato-onkologických onemocnění - začátek cesty*Holubová M., Lysák D., Jindra P.**Fakultní nemocnice Plzeň*

Transplantace kostní dřeně je pro řadu pacientů s agresivními formami leukémií jedinou možností pro překonání nemoci. Přes její nespornou efektivitu část nemocných po transplantaci relabuje. Standardní postupy řešení potransplantačních relapsů zahrnují chemoterapii či aplikaci dárcovských lymfocytů a nebyvají bohužel ve větší části případů účinné. V současné době se vyvíjejí i nové metody imunoterapie, které by mohly pomoci zabránit návratu onemocnění a tím i zvýšit šanci na dlouhodobé přežití pacientů.

NK buňky jsou jednou z ústředních složek protinádorové imunity. Ke své aktivaci nepotřebují antigenní stimul, ale rozeznávají poškozené (transformované) buňky podle snížené exprese MHC I molekul. Tito přirození zabijáci se stávají náplní mnoha klinických studií zabývajících se využitím protinádorové aktivity NK buněk jak u solidních nádorů, tak u hemato-onkologických onemocnění.

Naším cílem bylo nalézt a optimalizovat vhodné kultivační podmínky pro NK buňky splňující podmínky SVP, které by mohly sloužit jako východisko pro budoucí přípravu infuze NK buněk aplikovatelné u pacientů po transplantaci kostní dřeně.

NK buňky byly izolovány z periferní krve zdravých dárců gradientovou centrifugací a imunomagnetickou selekcí. Izolované buňky byly kultivovány v SCGM mediu popř. X-VIVO mediu s 10%FBS, s anebo bez OKT3 protilátky a s IL-2 (přidán v den izolace a poté každý druhý den). Dále byl testován stimulační vliv kokultivace s podpůrnými autologními či alogenními ozářenými mononukleárními buňkami. Po několikadenní kultivaci byly buňky pasážovány, byl stanoven počet NK buněk a průtokovou cytometrií sledovány aktivací markery CD25 a CD336 (NKp44).

Mírně větší výtěžek NK buněk byl pozorován u SCGM média bez rozdílu v ostatních aditivech. Proto byly testy vlivu přítomnosti podpůrných buněk prováděny pouze v tomto mediu. Mezi kulturami s/bez přidání podpůrných buněk byl výrazný rozdíl ve prospěch kultury s podpůrnými ozářenými mononukleárními buňkami. Nebyl zaznamenán rozdíl v kulturách s autologními nebo alogenními buňkami. Pomocí průtokové cytometrie jsme zjistili, že NK buňky, které mají vyšší proliferační potenciál exprimují ve větší míře CD25, na rozdíl od buněk s nižší proliferací, které měly zvýšenou expresi znaku CD336.

Z našich výsledků vyplývá, že nejvhodnějšími podmínkami pro kultivaci NK buněk pro budoucí klinická využití poskytuje SCGM médium s přidáním podpůrných mononukleárních buněk a IL2 o koncentraci 1000IU/ml. V dalších fázích bude testován cytotoxický potenciál NK buněk a analyzována korelace rozdílné exprese CD25 a CD336 s protinádorovou aktivitou.

Odběry speciálních typů buněk z periferní krve technikou aferézy: historie, současnost, moderní trendy

Kořístek Z.

Klinika hematookologie, Fakultní nemocnice Ostrava

Přibližně před 100 lety, v roce 1911, provedl Reuben Ottenberg první moderní transfuzi u člověka, když předem otypoval krevní skupiny dárce a příjemce a navázal tak na objevy krevních skupin Karla Landsteinerja a Jana Janského. Od té doby uplynulo více než 100 let a periferní krev se postupně stala nejenom standardním zdrojem transfuzních přípravků a krevních derivátů, připravovaných z krevní plazmy. Objev přítomnosti kmenových buněk hematopoézy v krvi myši krátce po 2. světové válce totiž předznamenal nové směry využití periferní krve jako zdroje různých typů buněk s více či méně specializovanou funkcí a určením. Na základě využití fenoménu mobilizace a díky rozvoji technologie separátorů krevních elementů se během 80. letech 20. století postupně vyvinuly a ověřily postupy odběrů koncentrátů krvetvorných buněk z periferní krve a jejich následné transplantace po vysokodávkované chemoterapii. Postupně se periferní kmenové a progenitorové hematopoetické buňky (HSC) staly dominujícím zdrojem nejen pro autologní, ale rovněž pro alogenní transplantace krvetvorby. Periferní krev však byla využita i pro odběry dalších specializovaných typů buněk: granulocytů pro léčbu infekcí, lymfocytů dárce pro posílení graft-versus-leukemia efektu po alogenních transplantacích. V posledních letech jsme svědky nástupu nových postupů v rámci tzv. moderní terapie, kdy je snaha získat a využít další speciální typy buněk, které jsou před použitím u příjemce dále dodatečně manipulovány (selekce, expanze atd.). Jde o postupy v rámci adoptivní imunoterapie nádorů (dendritické buňky, T-cell imunoterapie, vakcinace) nebo infekcí (anti-CMV T cells), protinádorové léčby (NK buňky), ovlivnění GVHD (mezenchymální buňky) a regenerativní medicíny (endoteliální buňky apod.). Odběr dostatečného množství cílových buněk v adekvátní kvalitě je samozřejmě podmínkou pro následné činnosti a úspěšné použití buněk. Přesto, že jsou v současnosti k dispozici moderní separátory buněk z krve s kontinuálním průtokem, základem úspěchu je správné načasování odběru, případně zajištění vyplavení cílových buněk do krve z jiných kompartmentů organismu (typicky kostní dřeň). Cílem sdělení bude kromě rekapitulace vývoje jednotlivých technologií a technik rovněž zamyšlení nad optimalizací jednotlivých postupů z pohledu technického (typy odběrových aferéz a nastavení přístrojů) a biologického (možnosti vyplavení - mobilizace - různých typů buněk).

3D nanovláknenné kompozitní materiály s inkorporovanými aktivními látkami určené pro aplikaci v tkáňovém inženýrství*Jenčová V., Procházková R., Chvojka J., Košťáková E., Mikeš P.**Technická univerzita*

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů se již více než deset let zabývá vývojem nanovláknenných kompozitních materiálů pro tkáňové inženýrství. Předmětem přednášky je výroba a modifikace nanovláknenných kompozitních 3D nosičů určených pro náhrady chrupavky, kostí, malo-průměrových cév a inteligentních krytů ran. Součástí je přehled dostupných technologií výroby nanovláknenných materiálů s inkorporovanými aktivními látkami. Konkrétně se jedná o různé modifikace elektrostatického zvlákňování, koaxiálního zvlákňování a zvlákňování pomocí vysokého střídavého napětí. Do těchto materiálů jsou nejrůznějšími technikami inkorporovány různá léčiva, růstové faktory, trombocyty a další látky v závislosti na daném použití. U vybraných materiálů je následně testována buněčná adheze, proliferace a viabilita v podmínkách in-vitro v naší biologické laboratoři. V současné době dochází také k testování materiálů vyrobených kombinací nanovláken s 3D tiskem a metodou melt-blown. Poslední vyvíjená metoda výroby tkáňových nosičů je tažení individuálních nanovláken. Tato technika umožňuje přípravu velmi přesných orientovaných nanovláknenných nosičů jejichž využití se předpokládá pro reparaci nervové tkáně.

Study of mechanobiological properties of human functional cardiomyocytes using Atomic Force Microscopy

Příbýl J., Pešl M., Acimovic I., Vilotic A., Meli A.C., Rotrekl V., Dvořák P., Skládal P.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Biologický ústav

Human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) can be differentiated into functional cardiomyocytes (CMs) in vitro serving as an important source of cells for regenerative medicine and modeling of heart diseases. Differentiation of hESCs and hiPSCs to the cardiac lineage can be done using different methods as well as different cultivation matrices. These factors can dramatically influence the differentiation outcome. The resulting cardiomyocytes differ not only in yield but also by their biomechanical properties which can be considered as one of the key parameters of the cells quality.

Robust and reliable method to assess the biomechanical properties of cardiomyocytes can be provided by Atomic Force Microscopy. It is part of scanning probe microscopy, originally developed for visualization of solid-phase immobilized samples with a high resolution. Interaction of cantilever-bound tip with rigid sample is evaluated in order to obtain surface properties (profile view, phase imaging, etc.). In this study, interaction of cantilever with beating cell cluster was evaluated, and real-time recorded deflection vs. time curves were further evaluated to get information about the force and frequency of the biological movement.

We implemented the AFM microscope in the apparatus for monitoring of biomechanical properties of cardiomyocytes. Tip located on the cardiomyocyte surface mediates cantilever deflection in real time caused by cell movement (beating). Force of beating can be measured in this way, when cantilever stiffness is multiplied by its deflection determined by AFM measurement. AFM based method is the only one able to routinely monitor beating force of cardiomyocytes in absolute values ? force values in units/tens of nN and beating rate proceeding in range 50–90 bpm were usually measured.

Experimental setup, data evaluation process and examples of effect of various drugs affecting biomechanical properties of cell clusters will be presented.

Acknowledgement

The work has been supported by CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) and FNUSA-ICRC (no. CZ.1.05/1.1.00/02.0123) from the European Regional Development Fund and Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. P302/12/G157).

Materiálové vlastnosti pojivových tkání významné pro implantologii a transplantace

Kuklík M.

Oddělení molekulární endokrinologie – Endokrinologický ústav, Praha

Úvod: Materiálové vlastnosti pojivových tkání skeletu, vaziva, šlach a kloubů u geneticky podmíněných vad a chorob jsou určující pro úspěch chirurgických zákroků (implantace, transplantace).

Chirurg, ortoped, plastický chirurg či traumatolog provádějící tyto zákroky musí respektovat změněnou patofyziologii a patobiomechaniku tkání u geneticky podmíněných vad a chorob pojiva u systémových dysplázií a končetinových vad.

Metodika: Genetická analýza objasňuje změněné materiálové vlastnosti tkání na základě molekulárně genetického vyšetření, genealogie, biochemických vyšetření, zobrazovacích metod rentgenologických, nukleární magnetické rezonance i ultrazvukových vyšetřovacích metod a také na základě somatoskopického, antropologického a biometrického vyšetření včetně dermatoglyfiky.

Výsledky: S využitím uvedených metod popisujeme materiálové vlastnosti u dysproporcionálních kostních dysplázií – rhizomelická achondroplázie, hypochondroplázie, diastrofická dysplázie, pseudoachondroplázie, mesomelických kostních dysplázií, metafyzárních dysplázií, chondrodysplázií – mnohočetné epifyzární dysplázie, kolagenopatií – osteogenesis imperfecta, Marfanova syndromu, u chorob s chaotickým růstem pojiva – exostózové nemoci a enchondromatózy. Z končetinových vad je to proximální femorální fokální dysplázie, femur, fibula, ulna syndrom a femur, tibie, radius syndrom s řadou pozoruhodných biomechanických a materiálových charakteristik.

Výsledky a charakteristiky jednotlivých nosologických jednotek: Na základě mutací vznikají změněné genové produkty podmiňující změněné materiálové vlastnosti pojivových tkání s řadou primárních i druhotných biomechanických efektů.

Achondroplázie – charakteristické jsou zkraty končetin především kořenového charakteru (rhizomelie humerů a femurů), s deformitami. Thorakolumbální kyfóza mění těžiště trupu a v batolecím období dochází často k pádům. Auxologické změny se změněným těžištěm trupu jsou příčinou častých pádů v batolecím věku. Abnormální biomechanická zátěž kloubů ze změněných tělesných proporcí jednotlivých segmentů vede k osteoartróze. Tito pacienti jsou kandidáty endoprotéz kyčelních a kolenních kloubů v časnějším věku než v běžné populaci. Materiálové vlastnosti tkání nejsou překážkou prodlužujících operací vyrovnávajících částečně, paliativně nejen tělesnou výšku, ale i dysproporce pacienta.

Hypochondroplázie – onemocnění typické mírnějším vyjádřením změn, které známe u achondroplázie.

Diastrofická dysplázie – patří k rhizomelickým kostním dyspláziím, růst je komplikován navíc krouťivými, torzními změnami. Přítomna je kyfokolióza, termín diastrophicus znamená torzní změny, vyjádřitelné matematicky. Genetickou příčinou onemocnění je mutace v genu sulfátového transportéru, autosomálně recesivního charakteru.

Nedostatečná sulfatace poškozuje především chondrocyty kloubních chrupavek. Výsledkem jsou deformity skeletu, předčasné osteoartrické (osteoartrotické) změny. Pacienti jsou opět předčasnými kandidáty endoprotéz. Materiálové vlastnosti tkání však nejsou kupodivu překážkou prodlužujících operací, vyrovnávajících částečně, paliativně nejen tělesnou výšku, ale i dysproporce pacienta.

Pseudoachondroplázie – dysproporcionální změny a porucha růstu na rozdíl od předchozích nejsou patrně prenatálně ani postnatálně při porodu, ale až ve věku přibližně 2 let. Kauzální autosomálně

dominantní mutace se týká řetězců oligomerického proteinu (homopolymer), cartilage oligomeric matrix proteinu (COMP)s narušením posttranslačních procesů jeho sestavy.

Leriho – Weillova choroba je způsobena mutací SHOX genu v pseudoautosomální oblasti krátkého raménka X chromosomu, se změněnou regulací osifikace kostí a zkraty končetin v především středním segmentu (mesomelie, deformitami a poruchami radioulnárního a radiokarpálního skloubení, s pseudorevmatickými a osteoartritickými změnami. Mutovaný gen je v heterozygotní sestavě, pokud se vyskytne v homozygotní sestavě jde o těžší formu Langerovy choroby.

Metafyzární dysplázie Schmidova typu je systémové onemocnění kolagenu typu X. Mutace je přítomna v heterozygotní sestavě (autosomálně dominantní typ dědičnosti). Dochází k dysproporcionálně zkrácené poruše růstu s kratším dolním segmentem těla. Kolagen typu X je exprimován především v metafyzárních oblastech kostí, změněné materiálové vlastnosti kostí v případech jeho mutace vedou k varozním deformitám a k abnormální biomechanické zátěži kloubů a k osteoartritickým změnám. Mohou se také vyskytovat patologické zlomeniny připomínající v rtg obraze syndrom bitého dítěte!

Mnohočetná epifyzární dysplázie – je heterogenní skupina onemocnění s opožděným zráním kloubních chrupavek, je to typická preartróza z mutace kolagenu II. Patogeneticky důležitá je změna solvatačního pláště chrupavkového kolagenu II, vedoucí k preartróze. Circulus vitiosus zhoršuje abnormální či nadměrná zátěž v artrotickém kloubu a dochází též ke genovému přesmyku z atypické zátěže na úrovni buněčných membrán a produkci méně obvyklých kolagenních typů (IX,X,XI). Tyto mají menší solvatační plášť a nepředstavují dostatečnou ochranu kloubní chrupavky. Není vhodné podceňovat stížnosti batolat na bolestivost chůze a nezatěžovat je předčasnou chůzí v případě tohoto onemocnění. Důležitá je prevence vyšetření kyčelních kloubů u novorozenců a v kojeneckém věku. Jsou známy přechodné typy choroby k pseudoachondroplázii v případech mutací COMP (heterogenie).

Osteogenesis imperfecta – heterogenní onemocnění, s poruchou osteoblastů, chorobná lomivost kostí převážně způsobená mutacemi kolagenu I (kostní kolagen). Dochází k osteoporóze nezralé kosti, k patologickým zlomeninám a mikrofrakturám deformujícím skelet. Prokázali jsme mutace jak v alfa 1, tak v alfa 2 řetězci s celou řadou patobiomechanických důsledků vedoucích k nestabilitě trojroubovice kolagenu a k poruchám kalcifikace a osifikace. Mutace způsobuje změnu teploty tání DNA TM, vede k snížení termorezistence dvojroubovice DNA. Stejně tak dochází k snížení T_m u heterotrimeru kostního kolagenu I. a k snížení stability makromolekuly (včetně snížené termorezistence). To má za následek nesčetnou řadu klinických (biomechanických) projevů a komplikací při léčbě. Předmětem přednášky je jejich demonstrace na základě vlastních zkušeností.

Dysplázie kleidokraniální – je heterogenní skupina onemocnění, nejčastěji autosomálně dominantně podmíněná porucha osifikace z mutace genu CBFA 1. Poškozena je především desmogenní osifikace, ale změny jsou systémové i na dalším chondrogenně osifikujícím skeletu. Předmětem přednášky je opět demonstrace biomechanických efektů a změn tkání u této choroby.

Osteopetroza – choroba z poruchy funkce osteoklastů, heterogenní, s řadou genetických mutací. Jde o kontratyp k osteogenesis imperfecta, opět s řadou patobiomechanických korelátů jež jsme sledovali a jsou námětem přednášky.

Marfanův syndrom – autosomálně dominantní choroba, heterogenní, ale většinou na podkladě mutace genu fibrilinu. Pozoruhodné jsou změny hypermobility měkkých pojivových tkání s řadou často fatálních důsledků.

Exostosová choroba – ze skupiny chaotického růstu pojiva, s tvorbou exostóz. Příčinou jsou mutace jednotlivých složek glykosyltransferáz, exostozinu 1,2 a 3, s porušením tvorby jejich komplexu v posttranslačních procesech.

Charakter všech mutací je autosomálně dominantní. Choroba má celou řadu patobiomechanických efektů projevujících se v klinickém obraze. Prezентujeme opět vlastní zkušenosti.

Enchondromatóza – chaotický růst pojiva, s tvorbou enchondromů, postihující zpravidla jen polovinu těla, vyskytující se jen jako čerstvá autosomálně dominantní mutace, která neprochází zárodečnou linií. Stejně jako u předchozího onemocnění dochází k prekancerózní, chybné orientace buněk. Prezентujeme opět patobiomechanické charakteristiky našich pacientů.

Femur-fibula-ulna syndrom – (FFU) redukční končetinová vada se snížením denzity v určitých oblastech, název vystihuje hypoplázii, případně chybění jednotlivých částí skeletu. Choroba je indikací k prodlužujícím operacím kompresně distrakční metodou pro korekci nestejné délky končetin.

Femur – tibia – radius – (FTR) skeletální redukční vada s kontralaterální lokalizací než předchozí typ s biomechanicky závažnějšími důsledky, kdy redukční anomálie jsou na tibiální či radiální straně. Z biomechanického hlediska je pozoruhodná tzv. tibializace fibuly, která do jisté míry přejímá funkci chybějící tibie (u některých pacientů).

Proximální femorální fokální deficiencie – s hypoplázií femuru různého stupně, kdy krček femuru se ukazuje jako locus minoris resistentiae. Choroba má řadu vztahů k předchozím syndromům FFU a FTR. Protetická opatření a prodlužující operace se ukazují analogicky vhodné jako u syndromu FFU či FTR.

Jmenované končetinové vady mohou být jednostranné či oboustranné.

Diskuse a závěry:

Společným jmenovatelem chorob pojiva bývá často osteoporóza a osteoartróza. Existují geneticky determinované preartrózy, kdy první změny existují již v dětském věku. Při léčebných zákrocích – aplikaci edoprotéz, prodlužujících operacích, protetice či transplantacích nutno respektovat materiálové vlastnosti tkání.

Klíčová slova: materiálové vlastnosti tkání – epigenetické zaky – mendelovská a polygenní onemocnění – osteoporóza – osteoartróza – osteopetróza – pružnost -pevnost

Vliv různých kultivačních substrátů na proliferaci, stratifikaci a diferenciaci buněk in vitro

Matoušková E., Plítil L., Mandys V., Krbec M.

*Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
Centrum aplikované bioimplantologie*

Důležitou vlastností materiálů v tkáňovém inženýrství je schopnost kultivačních substrátů podporovat proliferaci a diferenciaci buněk. Porovnali jsme různé typy biologických a syntetických materiálů používaných pro hojení ran z hlediska stimulace proliferace, stratifikace a diferenciaci keratinocytů. V další etapě byl vyzkoušen růst mezenchymálních kmenových buněk (MSC) z tukové tkáně na nanovlákněných materiálech, v některých případech v kombinaci s hydroxyapatitem. Kultivace: Primární lidské keratinocyty byly pěstovány na 5 moderních krytech používaných v popáleninové medicíně (Biobrane, Suprathel, Veloderm, Xe-Derma, Xenoderm). Buňky byly kultivovány v organotypických kulturách na vrstvě letální ozářených 3T3 buněk (feeder layer technique). První týden rostly kultury ponořené v kultivačním médiu, druhý týden na rozhraní médium-vzduch. MSC buňky byly pěstovány v médiu s EGF na nanovlákněných materiálech připravených z biodegradabilních polymerů polykaprolaktonu (PCL), polymléčné kyseliny a želatiny. Histologie: Vzorky s keratinocyty byly fixovány a obarveny hematoxylin-eosinem a imunocytochemicky na expresi involukrinu (marker diferenciaci keratinocytů). MSC byly fixovány a obarveny pomocí roztoků May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. Hodnocení a výsledky: Vzorky s keratinocyty byly hodnoceny z hlediska a) růstu keratinocytů (počet jader), b) stratifikace (počet vrstev keratinocytů); a c) síly vrstvy keratinocytů. Diferenciaci keratinocytů byla hodnocena pomocí exprese involukrinu v jednotlivých buněčných vrstvách. Biologické materiály Xe-Derma a Xenoderm stimulovaly vyšší proliferaci a stratifikaci keratinocytů, než materiály syntetické (Suprathel) či biosyntetické (Veloderm, Biobrane). Na materiálu Xe-derma keratinocyty vytvářely 6-12 vrstev epitelálních buněk, na Xenodermu 3-5 vrstev, na Velodermu a Suprathelu a 1-2 vrstvy, na Biobrane 1 nesouvislou vrstvu. Na Xe-Dermě (XD) byla prokázána nejlepší stratifikace a diferenciaci keratinocytů, odpovídající architektuře epidermis in vivo. Tyto výsledky odpovídají i kvalitním klinickým výsledkům při aplikaci XD. Buňky MSC byly hodnoceny z hlediska růstu a schopnosti inkorporace do studovaných matrix. MSC nejlépe proliferovaly na povrchu PCL, který je možné kombinovat s hydroxyapatitem, což indikuje jeho možné použití v ortopedii při hojení kostní tkáně.

Štúdium biokompatibility nanovláknovej matrice modifikovanej biologicky aktívnymi látkami

Michliková M.¹; Dragúňová J.²; Bakoš D.¹; Hnáťová M.¹

Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská republika¹

Klinika popálenín Lekárskej fakulty Univerzity Komenského Bratislava, Slovenská republika²

Úvod

Nanovláknové materiály patria v súčasnej dobe medzi intenzívne študované biomateriály určené pre aplikácie v rôznych oblastiach biomedicíny. Aby bolo možné použiť nanovlákná pre biomedicínske aplikácie, ich povrch je vhodné chemicky a fyzikálne modifikovať pomocou bioaktívnych molekúl. Pri každej modifikácii je súčasne potrebné zistiť aj potenciálny toxický efekt na bunky. Modifikácie, spôsobujúce akýkoľvek stupeň toxicity nie sú pre ďalšie štúdium vhodné.

Cieľ

Cieľom práce bolo pomocou plazmy modifikovať matrice z nanovláknien a testovať biokompatibilitu nemodifikovaných a modifikovaných matric použitím dvoch typov bunkových systémov: myšacie fibroblasty (3T3 NIH) a ľudské dermálne fibroblasty.

Materiál a metódy

Pre štúdium sme použili matrice - polymérne nosiče zložené z dvoch častí - podložky z netkanej textílie a nanosenými vrstvami z nanovláknien troch typov polymérov – polyvinylalkohol (PVA), polyuretán (PUs) a kopolymér kyseliny polyglykolovej a polymliečnej (PLGA). Nanovláknové vrstvy typu PLGA, PVA a PUs boli pripravené metódou elektrospiningu. Testovali sme matrice, ktoré boli nemodifikované a povrchovo modifikované roztokom cyklodextrínu, cyklodextrínom s chitozánom a derivátom cyklodextrínu. Na hodnotenie biokompatibility sme použili nasledovné testy: agarový difúzny test, test MTT a test kontaktnej toxicity.

Výsledky

Experimenty ukázali, že testované nemodifikované matrice, s výnimkou matrice typu PUs sú toxické pre oba bunkové systémy. V prípade modifikovaných matric sa toxický účinok prejavil len na dermálnych fibroblastoch. U eluátov, ktoré boli pripravené z nemodifikovaných matric sa toxický účinok prejavil len u 7 a 14 dňového a u modifikovaných matric testovaných na 3T3 bunkách sa toxický účinok neprejavil.

Záver

U agar difúzneho testu, ktorý bol vykonaný na pripravených nemodifikovaných maticiach u oboch bunkových systémov sa toxicita neprejavila len v prípade matrice typu PUs. V prípade MTT testu vykonaného na bunkách 3T3 sme zistili, že eluáty pripravené z modifikovaných matric nevykazovali výrazné toxické účinky. Modifikáciou mohla byť odstránená príčina toxicity. Z vykonaných testov vyplýva, že bude potrebné vykonať ešte aj ďalšie testy a analýzy na pripravených nemodifikovaných aj modifikovaných maticiach, ktoré by zreteľ

Chitin/chitosan-glucan complex based scaffold for tissue engineering application**A. M. Abdel-Mohsen^{a,b*}, L. Vojtovaa, J. Jancař^{a,c}**^a Central European Institute of Technology (CEITEC), Brno University of Technology, Brno, Czech Republic^b Textile Research Divisions, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt^c Institute of Materials Chemistry, Brno University of Technology, Czech RepublicE-mail address: abdel-mohsen@ceitec.vutbr.cz; abdo_mohsennrc@yahoo.com

Abstract

Chitin/chitosan-glucan complex (ChCSGC) extracted from schizophyllum commune (S.commune) was dissolved for the first time in pre-cooled (-15 °C) 8 wt. % urea, 6 wt. % NaOH aqueous solution within 30 min at ambient temperature to obtain its solution. The effect of urea and sodium hydroxide concentrations on the solubility of the ChCSGC were studied. The original and regenerated ChCSGC were characterized by elemental analysis, FTIR-ATR, TGA, X-RD, ¹H, and ¹³C-NMR. The antibacterial activity of chitin/chitosan-glucan complex has high antibacterial activity against Escherichia coli (E. coli) bacteria. The toxicity of the ChCSGC was tested by using mouse fibroblast cell line with different concentrations of the complex (100-1000 µg/ml) after 3 days, ChCSGC haven't any toxicity. We believe that the new material chitin-chitosan-glucan complex can be used for different medical application especially for tissue engineering application.

Acknowledgements

This work was financially supported by the projects "CEITEC - Central European Institute of Technology –excellent teams (CZ.1.07/2.3.00/30.0005) financed from European Social Fund and (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

Charakterizace a in vitro testování kolagen/polysacharidových kompozitních skafoldů pro medicínské aplikace

Uhrová L., Abdel-Latiff Abdel-Mohsen, Vojtová L., Jančář J.

VUT v Brně, Fakulta chemická

Kolagen je jedním z nejrozšířenějších proteinů přítomných v těle. Díky nízké antigenitě a omezené cytotoxicitě je vhodný pro tvorbu skafoldů. Porézní skafoldy jsou široce používány v tkáňovém inženýrství. Podporují buněčnou adhezi, proliferaci a indukují diferenciaci kmenových buněk. V této práci jsou skafoldy kombinací kolagenu a polysacharidu. Hedvábná vlákna se získávají z různých zdrojů, jako jsou pavouci, housenky bource morušového a štíři. Mezi nimi, hedvábní bource morušového je dobrý zdroj pro rozvoj biomedicínských aplikací. Hedvábní má dobré mechanické vlastnosti a je vyráběno ve velkém v textilním odvětví. Unikátní kombinace pružnosti a pevnosti spolu s buňkami tvoří atraktivní materiál pro tkáňové inženýrství. Skafoldy z kolagen/silk fibroinu byly připraveny v různých hmotnostních poměrech lyofilizační technikou. U všech vzorků bylo prokázáno, že nejsou toxické pro buňky. Na vzorcích byla měřena adheze a viabilita buněk pomocí MTS testu. Botnění bylo měřeno v různých časech v 7,4 pH PBS. Studium degradace ukázalo, že kombinací kolagenu a silk fibroinu lze vytvořit stabilnější skafold než z jednotlivých komponent. Mechanickým testováním byl zjištěn modul pružnosti zkoumaného materiálu 3,5 - 6,9 kPa. Morfologie jednotlivých skafoldů byla měřena pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Struktura pórů je důležitým faktorem, který ovlivňuje účinnost regenerace tkáně. Připravené skafoldy mají potenciální uplatnění v regenerativní medicíně.

Poděkování: Tato práce byla podpořena projektem "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje.

Separace a charakterizace atelokolagenu*Zubal L., Mohsen A., Vojtová L., Matoušková P., Konečná Z.**CEITEC*

Atelokolagen je v současnosti jedním z nejčastěji užívaných materiálů v tkáňovém inženýrství. Jeho příprava v čisté formě je však technologicky i finančně velmi náročná. Přednáška hovoří o jednotlivých krocích výroby atelokolagenu z jeho nerozpustné formy. Kvalita atelokolagenu bude ověřena pomocí SDS-PAGE, cd spektroskopie a reologie.

Významné baktericidní účinky želatinových nanovláken modifikovaných oxidovanou celulózou**Švachová V.^{1,2}, Vojtová L.², Pavlíňák D.³, Alberti M.³, Jančář J.^{1,2}, Hyršl P.⁴***Vysoké učení technické v Brně, Chemická fakulta¹**CEITEC – Central European Institute of Technology, Vysoké učení technické²**Ústav fyzikální elektroniky, Masarykova univerzita³**Institut experimentální biologie, Masarykova univerzita⁴*

Tato práce je zaměřena na přípravu želatinových nanovláken, která jsou modifikována solemi oxidované celulózy. Želatina je směs bílkovin, která se získává částečnou hydrolýzou přírodního proteinu - kolagenu. Je biokompatibilní, biodegradabilní a má vysokou absorpční schopnost. Oxidovaná celulóza a její soli jsou také biokompatibilní, biodegradabilní a vykazují antibakteriální a hemostatické účinky. Touto prací jsme se snažili získat materiál, který by kombinoval jmenované vlastnosti obou látek. Pomocí elektrostatického zvlákňování byla získána nanovlákná s unikátními baktericidními účinky vůči kmenu bakterií *E. Coli*. Chemické složení připravených vláken bylo studováno pomocí ATR-FTIR spektroskopie a EDX elementární analýzy, které potvrdily přítomnost oxidované soli v nanovlákněném materiálu. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byl určen průměr získaných nanovláken a jejich morfologie. Metodou chemické bioluminiscence byly prokázány baktericidní účinky, které ve většině případů vykazovaly téměř úplnou mortalitu po celou dobu testování. Námi připravený materiál může mít potenciální využití v chirurgii, v regenerativní medicíně měkkých tkání (popáleniny), případně ve tkáňovém inženýrství.

Poděkování: Tato práce byla podpořena projekty Regionální VaV centrum pro nízkonákladové plazmové a nanotechnologické povrchové úpravy (CEPLANT) (CZ.1.05/2.1.00/03.0086) a projektem "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

3D zobrazení skafoldů a buněk pomocí mikroCT

Vojtová L.¹, Žídek J.¹, Zubal L.¹, Zikmund T.¹, Prosecká E.², Rampichová M.², Chmelík J.³, Jakubíček R.³, Walek P.³, Jan K.³, Kaiser J.¹

CEITEC VUT¹

Ústav experimentální medicíny AVČR v.v.i., Praha²

Ústav biomedicínského inženýrství, FEKT VUT v Brně³

Ukazuje se, že μ CT bude další plnohodnotnou metodou pro pozorování morfologie polymerních skafoldů s osazenými buňkami v celém objemu vzorku bez jeho destrukce, a také pro stanovení porozity, velikost pórů a objemového poměru buněk a skafoldu. Tato technika nám pomůže lépe porozumět metodám osazování skafoldu buňkami, chování buněk ve skafoldu (proliferaci a diferenciaci v různých časových intervalech), změny v morfologii skafoldu po určité době vystavené buňkám, což je nezbytné v moderním tkáňovém inženýrství pro regeneraci tkání.

The use of auto grafts based on Mesenchymal stem cells for recidivate cleft palate treatment

Vojtaššák J.^{1,2}, Mračna J.³, Ušaková V.⁴, Galbavý Š.⁵

Faculty of Health and Social Care, Trnava University, Trnava¹

Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava²

Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava³

Department of Hematology, Oncological Institute of St. Elisabeth, Bratislava⁴

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava⁵

Key words: autologous Mesenchymal stem cells, collagenous membrane, recidivate cleft palate, therapy

Abstract

Development of the head and face comprises one of the most complex events during embryonic development, coordinated by a network of transcription factors and signaling molecules together with proteins conferring cell polarity and cell–cell interactions. Disturbance of this tightly controlled cascade can result in a facial cleft where the facial primordia ultimately fail to meet and fuse or form the appropriate structures. Collectively, craniofacial abnormalities are among the most common features of all birth defects. The most frequent of these are the orofacial clefts (cleft lip and/or cleft palate - CL/P). CL/P results in complications affecting feeding, speech, hearing and psychological development. The majority are non-syndromic where CL/P occurs in isolation of other phenotypes. The etiology of CL/P is complex and thought to involve both major and minor genetic influences with variable interactions from environmental factors. Patients undergo multiple rounds of surgical repair starting in the first year of life and may continue until 18 or 20 years of age.

Many patients (35 - 40 %) developed recurrent cleft palate fistulas following the initial fistula repair. Recurrence of cleft palate fistulas is not influenced by severity of cleft or type of original palate repair. Following end-stage management, a second cleft palate fistula recurrence occurred approximately in 25 percent of patients.

The authors developed a new method for recidivate fistulas closing based on combination of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSC), autologous platelet rich plasma (PRP), hydroxyapatite and collagenous membrane as extracellular matrix. The in vitro expanded BM MSC. Flow cytometry, OPG and CT examination, histology were used for cell stemness verification and cell therapy effect.

Acknowledgment: This project could be realized thanks the financial and legislative support of Grant of Ministry of Health Slovak Republic No.2007/36-UK-07.

Dlouhodobé výsledky operací TEP kyčle s využitím Burch- Schneiderovy dlahy*Břízová P., Vališ P., Burda J.**Ortopedická klinika LF MU a Fakultní nemocnice Brno*

Úvod: Burch- Schneiderova dlahy je využívána při operacích TEP kyčle ,kdy je nutno řešit defekt acetabula, ať již při primoinplantaci nebo častěji při revizních operacích. Burch- Schneiderova dlahy zajišťuje stabilitu pro možnost implantace acetabulární komponenty. Při této operaci jsou využívány kostní aloštěpy, které vyplňují kostní defekty. Tato práce hodnotí výsledky po implantaci Burch- Schneiderovy dlahy. Autoři v práci představují metodiku zpracování a použití kostních štěpů při těchto typech operací. Součástí je fotodokumentace tohoto procesu.

Materiál a metoda: V letech 1999– 2013 se na Ortopedické klinice FB Brno Bohunice operovalo 105 kyčlí s použitím Burch- Schneiderovy dlahy u 97 pacientů. V této práci je zahrnuto 84 hodnotitelných operací z hlediska dlouhodobého sledování. Průměrný věk u pacientů je 68 let. Při operacích bylo průměrně použito 118g kostních štěpů a to aloštěpů z kostní banky.

Výsledky: Hodnotili jsme počet nutných reoperací a dalších komplikací. V 9 případech došlo k uvolnění implantátu, ve 3 případech bylo uvolnění suspektní. Z dalších komplikací se v 5,25% vyskytla infekce, v 6,3% nestabilita a v 5,25% byl pooperačně neurologický deficit. Celkově byla nutná reoperace u 13 případů.

Diskuse: Vyšší výskyt komplikací je dán více aspekty, ve většině případů se již primárně jedná o revizní operaci, což zvyšuje výskyt infekčních komplikací. Dalším aspektem je celkový stav pacientů a jejich vyšší věk v době operace. Další otázkou je zhodnocení defektu a správná indikace při použití tohoto implantátu a samozřejmě samotná operační technika a zkušenost operátora. Dalším faktorem zvyšujícím možný počet infekčních komplikací a uvolnění implantátu je samotné využití kostních štěpů, prevencí těchto komplikací je jejich adekvátní zpracování a vhodná příprava kostního lůžka k dosažení plné inkorporace.

Závěr: Výsledky využití Burch- Schneiderovy dlahy u operací TEP kyčle hodnotíme jako velmi dobré. Pooperačně došlo ke zlepšení Harris Hip score z průměrných 38 před operací na průměrných 69 po operaci. K perfektní osteointegraci došlo u 70% případů po 2 letech a v 79% případů po 5 letech. Vyšší počet komplikací je dán více faktory, jak je uvedeno výše.

Srovnání techniky implantace solidního chondrograftu a metody prostých návrťů při řešení defektů chrupavky nosných kloubů

Vališ P., Rouchal M., Novák. J., Otaševič T., Pavlovský Z.

Ortopedická klinika LF MU a Fakultní nemocnice Brno

Ústav patologie LF MU a Fakultní nemocnice Brno

Úvod: Vzhledem k nárůstu poškození na nosných kloubech je v posledních desetiletích v popředí řešení chondrálních defektů, které jsou nedílnou součástí těchto poškození.

Vnašem souboru jsme srovnávali metodu implantace solidního chondrograftu s prostými návrty při řešení chondrálních defektů.

Materiál a metodika: Principem naší práce bylo srovnání morfologických, biochemických a klinických výsledků při použití solidního chondrograftu a návrťů spodiny defektů kloubní chrupavky v místě původního defektu. Při kontrolních ASK jsme odebrali z místa původního defektu vzorky, které jsme dále hodnotili. Náš soubor byl 35 pacientů. 4 vzorky byli nehodnotitelné pro malé množství odebraného materiálu. Proto bylo nakonec vyhodnoceno 31 tkáňových vzorků. 24 pacientů bylo po implantaci solidního chondrograftu a 7 byl po ošetření defektů prostými návrty. Uvedené vzorky jsme hodnotili na přítomnost kolagenu 2.typu a matrixmetalloproteináz(MMP-1, MMP-3 a MMP-13).

Závěr: Na podkladě výsledků našeho hodnocení jsme vytvořili doporučení pro praxi při řešení chondrálních defektů nosných kloubů.

Terapie osteochondrálního defektu králíka pomocí hydrogelu z kolagenu I a fibrinu obohaceného o trombocyty a PCL mikročástice

Rampichová M., Filová E., Lukášová V., Buzgo M., Tonar Z., Litvinec A., Beznoska J., Plencner M., Míčková A., Benešová J., Sural M., Chvojka J., Ďoubal S., Kuchařová M., Kralíčková A., Kralíčková M., Amler E.

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Novým trendem v regeneraci chrupavky je implantace vhodného nosiče bez buněk. Tento nosič by měl být navrhnout tak, aby stimuloval migraci mesenchymálních kmenových buněk (MSC) ze subchondrální kosti. MSC kostní dřené jsou schopny se za vhodných podmínek diferencovat do chondrocytů a syntetizovat novou chrupavčitou tkáň.

V naší studii byl vytvořen hydrogelový nosič na bázi kolagenu I a fibrinu, který byl obohacen trombocyty a mikročásticemi. Trombocyty byly použity jako přirozený zdroj růstových faktorů. Dále gel obsahoval mikročástice připravené z nanovláken na bázi poly-ε-caprolaktonu (PCL) a chitosanu (Chit). Na tyto částice byly navázány molekuly polyetylen glykolu (PEG) a protilátka proti antigenu CD44. CD 44 je přirozený receptor pro kyselinu hyaluronovou přítomný u MSC.

Nejprve byl nanovláknový systém testován v in vitro studii. Připravená nanovlákná byla namleta pomocí kryogenního mlýnu. Na připravené mikročástice pak byly nasazeny chondrocyty a fibrochondrocyty a byla sledována buněčná viabilita a proliferace. Následně byly připraveny hydrogelové kompozitní nosiče a byly implantovány do osteochondrálního defektu králíka. Hydrogely obsahující neobohacené mikročástice (Chit-PCL) byly implantovány 7 králíkům a obohacené mikročástice (Chit-PCL-PEG-CD44) 8 králíkům. 5 zvířat bylo použito jako kontrola, kde byl vytvořený osteochondrální defekt ponechán bez léčby. Po 6 týdnech bylo provedeno histologické vyšetření, včetně imunohistochemického barvení proti kolagenu II a osteokalcinu.

Výsledky z in vitro studie ukázaly, že ačkoli vykazovaly oba druhy mikročástic dobrou biokompatibilitu a buňky na nich dobře rostly, větší proliferace byla zaznamenána na mikročásticích obohacených CD44 protilátkou. Přítomnost antigenu CD44 v hydrogelovém nosiči ve studii in vivo vedl k větší pozitivitě na kolagen II v centrální části defektu, což napovídá tvorbě mladé hyalinní chrupavky. U skupiny 2 bylo naopak shledáno signifikantně větší množství elementů pozitivních na osteokalcin, což naznačuje osteogenní diferenciaci. Tyto výsledky byly pravděpodobně způsobeny interakcí buněk a mezibuněčné hmoty s protilátkou proti CD44. Přítomnost částic zároveň pozitivně ovlivnila biomechanické vlastnosti vzorku.

Tato práce byla podpořena Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (grant NT12156), Ministerstvem školství ČR, grant UCEEB IPV6, MPO FR-TI3/808, project ED2.1.00/03.007, Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant 545313, 626012, 424213, 270513, 266801).

Kolagen/Hydroxyapatitový nosič funkcionalizovaný nanovlákný z Polykaprolaktonu, trombocytárním koncentrátem a mesenchymálními kmenovými buňkami pro regeneraci kostních defektů in vivo

Prosecká E.^{1,2}, Rampichová M.^{2,6}, Litvinec A.², Vojtová L.³, Kochová P.⁴, Tonar Z.⁵, Plencner M.^{1,2}, Buzgo M.^{1,2,6}, Amler E.^{1,2}

Ústav biofyziky, 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze¹

Ústav experimentální medicíny AV ČR v. v. i.²

Fakulta chemická, Vysoké učení v Brně³

Nové technologie pro informační společnost, Fakulta aplikovaných věd, Západočeská univerzita v Plzni⁴

Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze⁵

Fakulta biomedicínského inženýrství, České vysoké učení v Praze⁶

Cíl: Cílem studie bylo vyvinout ideální kompozitní nosič pro regeneraci velkých kostních defektů s potenciálem pro klinické použití.

Metody: Z předchozích in vitro testů byl vybrán nosič složený z 0.5% kolagenu typu I a 50% Hydroxyapatitu (1:1 wt%) (Col/HA). Pro zlepšení mechanických vlastností nosiče, klíčovým faktorem pro regeneraci kostní tkáně, byla pro in vivo testování do nosiče přidána nanovlákná z Polykaprolaktonu (PCL) o velikosti 2 mm x 2 mm ? 0.5 mm (Col/HA/PCL). Mechanické vlastnosti nosičů byly poté měřeny pomocí Youngova modulu elasticity v tlaku. Pro in vivo testování byly připraveny 3 skupiny nosičů. Skupina 1: Col/HA/PCL nosič osazený autologními mesenchymálními kmenovými buňkami diferencovanými do osteoblastů (MSCs) (Col/HA/PCL/MSCs). Skupina 2: (Col/HA/PCL) nosič obohacený o trombocyty z trombocytárního koncentrátu (TRS) (Col/HA/PCL/TRS) a skupina 3: (Col/HA/PCL) nosič osazený MSCs a obohacený o TRS (Col/HA/PCL/MSCs/TRS). Všechny skupiny byly implantovány do kondylu femuru králíka do defektu o kritické velikosti a to 6 mm v průměru a 10 mm ? 0.5 mm hloubky. Jako kontrola byly ponechány u jedné skupiny (skupina 4) prázdné defekty. Nosiče byly implantovány in vivo po dobu 12 měsíců a poté analyzovány kvalitativní a kvantitativní histologií.

Výsledky: Nejvyšší objem nově vytvořené kostní tkáně, a to v celém objemu defektu, byl sledován u skupiny 3, tedy u skupiny obohacené o obě složky (MSCs a TRS). Srovnatelná tvorba nové kostní tkáně, též v celém objemu defektu, byla pozorována u skupin 1 a 2. U kontrolní skupiny, prázdného defektu, byl sledován signifikantně nejnižší objem nově vytvořené tkáně a to zejména u okrajů, ne v celém objemu defektu, a s přítomností fibrózní tkáně. Měření mechanických vlastností nosičů prokázalo vyšší hodnoty Youngova modulu elasticity v tlaku u nosiče obsahujícího PCL nanovlákná (Col/HA/PCL) v porovnání s nosičem bez nanovláken (Col/HA). PCL nanovlákná tedy zlepšila mechanické vlastnosti nosiče.

Závěr: Kolagen/Hydroxyapatitový nosič obohacený o autologní mesenchymální kmenové buňky a trombocyty z trombocytárního koncentrátu představuje nosič s vysokým potenciálem pro použití v klinické praxi, nejen ke svým vlastnostem, kdy došlo ke kvalitní, rychlé regeneraci kostní tkáně, ale též z důvodu, že je vyroben z materiálů, které jsou schváleny pro lidské použití a za přítomnosti pouze autologních buněk a růstových faktorů.

Poděkování: Studie byla realizována za podpory Akademie věd České republiky v.v.i. (AV0Z50390703 a AV0Z50390512), Grantové agentury Univerzity Karlovi v Praze (projekty číslo: 330611, 384311, 648112, 626012, P36), a Grantové agentury Ministerstva zdravotnictví (projekt číslo: NT12156). Dále pak částečně z Evropského fondu regionálního rozvoje (projekt číslo ED2.1.00/03.0076, CZ.1.05/1.1.00/02.0090 ? ?NTIS- New Technologies for Information Society?, European Centre of Excellence, a projekt CZ.1.05/1.1.00/02.0068 – ?CEITEC- Central European Institute of Technology?) P36) a Univerzitním centrem pro energeticky efektivní budovy ČVUT (projekt číslo IPv6).

Use of human autologous MSC in treatment of rotator cuff rupture - a case report

Stehlik D., Sevastanová O., Havlas V., Kotaška J., Konrádová Š., Jendelová P., Trč T., Syková E.

Ortopedie 2. LF UK Fakultní nemocnice v Motole

Rotator cuff is known to be a tissue with relatively low tendency to heal when torn. Biological enhancement of rotator cuff repair is a subject of thorough studies.

The goal of the clinical trial is evaluate the influence of autologous MSC on rotator cuff healing.

Bone marrow cells are aspirated from the iliac crest one month before rotator cuff surgery for the purpose of receiving autologous MSCs. These cells are expanded in vitro in order to get sufficient amount. Rotator cuff tears are repaired arthroscopically, and during the final stage of the surgery, MSC cell suspension is applied into the suture of the rotator cuff in a single dose. Outcome measures include clinical examination (ROM), pain score (VAS), functional scoring (UCLA and Constant scores), MRI (tendon continuity/re?rupture).

Now we present case report of the first patient with 6 months follow up, significant pain relief and improvement of function has been observed. There were no adverse effects registered during the whole observation period.

Přínos histologie při posuzování in vivo hojení ran při aplikaci tkáňových nosičů

Kubíková T.¹, Filová E.², Prosecká E.², Plencner M.², Tonar Z.¹

Ústav histologie a embryologie a Biomedicínské centrum, LF UK v Plzni¹

Oddělení tkáňového inženýrství, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.²

Při in vivo hodnocení hojení ran je výhodné použít histologické metody vyšetřování, které odhalí přítomnost a kvantitu jednotlivých tkáňových komponent. Cílem práce je představit možnosti a omezení histopatologických metod při hodnocení in vivo hojení ran. Frakce kolagenu typu I ve tkáni přispívá k mechanické odolnosti tkáně. Rostoucí poměr kolagenu typu I/III ve tkáni znamená maturaci mechanicky pevného kolagenu z prekursorového typu III. Histologicky lze kolagen typu I a III rozlišit při přehledném barvení pikrosiriovou červení a za použití polarizovaného světla při mikroskopickém vyšetřování. Vysoký plošný podíl vláken elastinu ve tkáni přispívá k její pružnosti. Elastin zviditelníme např. metodou modifikovaného zeleného trichromu s Verhoeffovým hematoxylinem. Přítomnost myofibroblastů ve tkáni přispívají ke kontrakci rány. Myofibroblasty obsahují ve své cytoplazmě aktin, jež je možné detekovat pomocí protilátky proti α -hladkosvalovému aktinu. Vysoká hustota mikrocév přispívá k regeneraci a růstu tkáně. Endotel cév zviditelníme reakcí s protilátkou např. anti-von Willebrandovým faktorem, anti-CD31 nebo anti-CD34. Zánětlivé buňky v defektu se podílí na imunitní odpovědi organismu na poranění. Neutrofilní granulocyty reagují s protilátkou anti-myleloperoxidase, T-lymfocyty s anti-CD3, B-lymfocyty s anti-CD20 a makrofágy s protilátkou anti-MAC387. Vysoký plošný podíl glykosaminoglykanů ve tkáni přispívá k její regeneraci. Glykosaminoglykany zviditelní přehledné histologické barvení alcianovou modří + PAS (Periodic Acid Schiff). Osteoblasty a novotvořenou kostní matrix, podílející se na výstavbě kostí a zubů, lze detekovat pomocí protilátky anti-osteokalcin.

Po detekci a vizualizaci je vhodné jednotlivé tkáňové komponenty kvantifikovat pomocí nevychýlených stereologických metod včetně orientování a patřičného víceúrovňového vzorkování tkáňových bločků, histologických řezů a zorných polí mikroskopu. Výsledkem kvantitativní histologické analýzy jsou obvykle spojitě proměnné, které lze využít k standardnímu testování statistických hypotéz.

Podporováno projektem ED2.1.00/03.0076 Evropského fondu pro regionální rozvoj.

Vývoj soupravy určené pro počítání CD34+ hematopoetických buněk pomocí průtokové cytometrie

Benko M.¹, Jinoch P.¹, Škrob F.¹, Šrámková M.¹, Sutherland D. R.², Suchánek M.¹

EXBIO Praha a.s., Oddělení vývoje produktu, Vestec u Prahy, Česká Republika¹

Toronto General Hospital, Eaton, Toronto, Ontario, Canada²

Transplantace krvetvorných kmenových buněk je spolu s chemoterapií terapií první volby při léčbě mnoha hematooonkologických onemocnění. Pro získání štěpu hematopoetických progenitorů je vhodná kostní dřeň, pupečnicková krev, nebo krevní kmenové buňky mobilizované do periferní krve po stimulaci růstovým faktorem.

Pro přijetí štěpu je důležitá co nejvyšší shoda tkáňového HLA typu CD34 buněk dárce a příjemce, počet transplantovaných CD34+ hematopoetických buněk a jejich životnost. Kvantifikace živých CD34+ buněk průtokovou cytometrií je nejpřesnější a nejrychlejší metoda stanovení předpokladu přijetí hematopoetických buněk bez ohledu na původ. Mezinárodní společností ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) byl pro průtokovou cytometrii sestaven a standardizován protokol správné identifikace a kvantifikace CD34+ hematopoetických buněk¹, který je používán ve většině hematologických laboratořích na světě.

Cytometrický protokol ISHAGE určený pro počítání CD34+ buněk využívá maximum dostupných informací pouze z 5 parametrů: značení CD34 a CD45 antigenů, vyloučení mrtvých buněk DNA barvičkou (7-AAD) a vlastnosti buněk podle rozptýlení světelného paprsku ve směru záření (Foward Scatter) a rozptýlení záření do prostoru (Side-angle light Scatter). Těchto 5 parametrů bylo zkombinováno do sekvenční a Boolean strategie ohraničování (gating), použitelné pro hematopoetické kmenové buňky z různých zdrojů a pro velkou škálu průtokových cytometrů. Protokol vyžaduje použití PE-konjugované protilátky proti class III CD34 antigenu, která detekuje všechny glykoformy CD34 a FITC-konjugované protilátky proti CD45 antigenu (pan-leukocytární marker), která detekuje všechny izoformy a glykoformy CD45.

Ve společnosti EXBIO Praha a.s. je ve vývoji souprava, která je plně kompatibilní s protokolem ISHAGE a je použitelná pro všechny typy průtokových cytometrů. V rámci vývoje soupravy byly připraveny fluorescenční konjugáty monoklonálních protilátek proti pan-CD45 (klon MEM-28) a class III CD34 (4H11) lidským antigenům. Titrací bylo stanoveno optimální množství anti-CD34 PE a anti-CD45 FITC značených protilátek pro 1 test. Funkčnost značených protilátek byla ověřena v referenční laboratoři Dr. R. D. Sutherlanda (Toronto, Kanada), autora protokolu ISHAGE. Po ověření klíčových reagentů bylo stanoveno optimální množství vitální barvičky 7-AAD na 1 test a ověřen zdroj fluorescenčních kuliček s přesně stanoveným počtem, které slouží jako referenční standard pro kvantitativní stanovení počtu CD34 buněk ve vzorku. Souprava rovněž obsahuje roztok na lýzi erytrocytů, pomocí kterého je možné leukocyty analyzovat až do 24 hodin bez ovlivnění počtu živých CD34+ hematopoetických buněk ve vzorku.

Pomocí vyvíjené soupravy lze přesně stanovit počet živých CD34+ hematopoetických buněk ve vzorku kostní dřeně, v pupečnickové krvi nebo v plně periferní krvi. Výsledky byly potvrzeny použitím krevního standardu obsahujícího definovaný počet CD34+ buněk (Stem Cell Control Kit, BD, San Jose).

¹Sutherland D. R. a kol. J Hematother. 1996 (3): 213-26.

Imaging Flow Cytometry*Korbel M.**BioTech a.s.*

Imaging Flow Cytometers combine the speed and phenotyping abilities of flow cytometry with imagery and functional insights of fluorescence microscopy. Amnis Imaging Flow cytometers can digitally image millions of cells directly in flow so you can perform high content assays on rare cell populations and quantitate biological phenomena with incredible accuracy. Since 2005, researchers have used Amnis imaging flow cytometers for a diverse range of applications within numerous disciplines. This body of work has resulted in over 200 peer-reviewed journal articles

GxP v přepravě*Kytka J.**World Courier Czech Republic, s.r.o.*

GxP je souhrnný název pro pravidla a postupy týkající se metodiky řízení kvality v rámci Good Practice (správné praxe), jež je používána v mnoha oblastech, a která zahrnuje takové mezinárodně uznávané standardy, jakými jsou GMP (Good Manufacturing Practice = správná výrobní praxe), GCP (Good Clinical Practice = správná klinická praxe), GSP (Good Storage Practice = správná praxe při skladování) a GDP (Good Distribution Practice = správná distribuční praxe). Tyto postupy byly vytvořeny proto, aby bylo zajištěno, že výrobky budou bezpečné, že budou schopny naplnit zamýšlený účel použití, a že v regulovaných odvětvích, jako jsou farmaceutický a potravinářský průmysl, lékařství a kosmetický průmysl, bude dodržována kvalita výrobního procesu, kontroly, skladování a distribuce. Metodika Good Practice hraje zásadní roli při poskytování služeb zákazníkům z oblasti biofarmaceutického průmyslu. Naše společnost se kontinuálně řídí pravidly GxP, a to v rámci celé své globální organizační struktury, což se týká přepravy a skladování nejen léků k výzkumným účelům, ale i biologických vzorků a dalších materiálů pro potřeby globálních klinických studií i mimo tyto studie. Tato strategie do detailu definuje, jak má být metodika GDP (a také ostatní) uplatňována v praxi při všech zásadních postupech, týkajících se přepravy. Jako kurýrní společnost považujeme uplatňování metodiky správné distribuční praxe při přepravních činnostech za svou prioritu, neboť GDP jasně popisuje správné postupy distribuce biofarmaceutických produktů určených pro použití lidmi a zároveň vymezuje způsob přepravy těchto produktů od výrobce (nebo z jiného bodu) ke konečnému uživateli (popřípadě do jiného bodu v přepravním řetězci).

Správné stanovení viability a potenciálu buněk před transplantací*Držík O.**Baria*

Termination pattern of nanocrystalline diamond controls cell behavior

Brož A.¹, Ukrantsev E.², Babchenko O.², Verdánová M.^{1,3}, Kromka A.², Rezek B.², Hubálek Kalbáčová M.^{1,4}

Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague¹

Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i.²

Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague³

Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague⁴

Introduction & Materials and Methods

The aim of the study was to investigate the behavior of human osteoblastic cells (SAOS-2) on nanocrystalline diamond (NCD) film with altered wettability during the cultivation period of 48 h with a focus on primary adhesion. The NCD was already proven to be biocompatible material that can be utilized in implantology as a surface coating¹ or for biosensor development². Surface termination and thus wettability of the NCD was achieved by exposition to oxygen (NCD-O) or hydrogen (NCD-H) microwave plasma. Three different surface termination patterns of the NCD were prepared: 1) a whole surface terminated by O or H, 2) a half of the surface terminated by O and the other half by H, 3) a surface with 200 µm wide O/H alternating stripes. Differences in cell behavior caused by these various termination patterns were studied. Cell number and morphology were determined by immunofluorescent staining of nuclei and actin after 2 h and 48 h of cell cultivation on the NCD with the whole surface terminated by O or H. Live cell imaging phase contrast microscopy and subsequent image analysis were used to follow the cell migration and to determine the number of adherent and non-adherent cells on the NCD samples with O/H halves and O/H stripes.

Results & Conclusion

The results show that the cell behavior, especially cell adhesion is strongly influenced by termination pattern of the NCD. Cell adhesion takes place earlier on the NCD-O than on the NCD-H and this effect is more obvious on more patterned NCDs (stripes). Cells also proliferate more on NCD-O than on NCD-H if they are cultivated on O/H stripes. However, this trend was not observed on NCD with O/H halves or on NCD with O or H termination on the whole surface. Generally, cells move more on NCD-H compared to NCD-O. These results indicate that the different plasma treatment of NCD which resulted in patterned wettability can be used to control cell behavior.

References:

- 1 Jaatinen JJ, Korhonen RK, Pelttari A, Helminen HJ, Korhonen H, Lappalainen R, Kröger H. Early bone growth on the surface of titanium implants in rat femur is enhanced by an amorphous diamond coating. *Acta Orthop*. 2011 Aug; 82(4): 499–503.
- 2 Izak T, Novotna K, Kopova I, Bacakova L, Rezek B, Kromka A. H-terminated diamond as optically transparent impedance sensor for real-time monitoring of cell growth. *Phys Status Solidi B*. 2013 Dec; 250(12): 2741–2746.

Acknowledgements:

This work was supported by: Czech Science Foundation – GACR P108/12/0996. Charles University in Prague, First Faculty of Medicine – project PRVOUK-P24/LF1/3 and Faculty of Science – project GAUK no.: 501212 and grant SVV-2014–260081 and by the project ED2.1.00/03.0076 from European Regional Development Fund.

Vliv biomimetické modifikace polylaktidu funkcionalizovanými blokovými kopolymery na růstové vlastnosti osteosarkomových buněk

Janoušková O., Mázl Chánová E., Machová L., Kubies D., Cuchalová L., Rypáček F.

Ústav makromolekulární chemie v.v.i. AV ČR

Biodegradovatelné polyester, jako například polylaktid (PLA), jsou intenzivně studované materiály v oblasti tkáňového inženýrství. Uplatnění polymerních biomateriálů v těchto aplikacích závisí na interakcích polymerního povrchu s prostředím tkáně, tj. s proteiny a buňkami. Vedle vhodných biodegradačních, mechanických a strukturních vlastností je pro vývoj materiálu, který by zajistil kontrolované interakce na rozhraní buňka-biomateriál, nezbytná přítomnost a také distribuce struktur pro adhezi buněk na povrchu biomateriálu, jako například aminokyselinové sekvence RGDS odvozené od fibronektinu.

Prezentovaná práce se zabývá modifikací polylaktidových povrchů depozicí funkcionalizovaných amfifilních blokových kopolymerů tvořených polylaktidovým (PLA) a poly(ethylen oxidovým) (PEO) blokem, PLA-b-PEO. Amfifilní blokové kopolymery vytváří v selektivních rozpouštědlech asociáty, jejichž depozicí na povrch je možné připravovat organizované povrchy v nanometrových rozměrech. Funkcionalizované povrchy jsou modifikovány streptavidinem a dále sekvencemi aminokyselin odvozených od fibronektinu (RGDS), vitronektinu (KRSR) a růstového faktoru lidských fibroblastů (KRTGQYKLGSKTGPQK).

Vliv připravených povrchů na počáteční buněčnou adhezi byl studován s využitím lidské osteosarkomové buněčné linie MG63, která je široce využívaná pro studium na poli tkáňového inženýrství zaměřeného na obnovu kostí. Vliv rozdílné modifikace povrchů na chování buněk byl sledován změnou morfologie, změnou růstových vlastností a viabilitou. Jednotlivé povrchy ovlivnily růstové vlastnosti buněk, jejich porovnání a selekce umožní optimalizaci povrchových vlastností biomateriálu pro adhezi a růst buněk.

Poděkování: Práce byla uskutečněna s podporou Akademie věd České republiky (grant číslo: P108/12/P624 a P108/11/1857) a MŠMT ČR projekt ?BIOPOL? (grant číslo EE2.3.30.0029).

Characterization of human adipose tissue-derived stromal cells from diabetic patients with critical limb ischemia

Kočí Z.^{1,2}, Turnovcová K.¹, Dubský M.³, Baranovičová L.¹, Holáň V.¹, Chudičková M.¹, Syková E.^{1,2}, Kubinová Š.¹

Department of Neuroscience, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science, Prague¹

Department of Neuroscience, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic²

Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic³

Adipose tissue is an abundant source of autologous adult stem cells that may bring new therapeutic perspectives on the treatment of diabetes and its complications. However, it is unclear whether the mesenchymal stromal cells (MSCs) of diabetic patients, constantly influenced by hyperglycemia, have the same properties as non-diabetic controls. Adipose tissue was isolated from the distal limbs of diabetic patients with critical ischemia. Adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) were characterized in terms of cell surface markers, differentiation into adipogenic, osteogenic, chondrogenic, endothelial, islet-like cell lineages, and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chemokine related genes. Flow cytometry analysis confirmed mesenchymal phenotypes in both, diabetic and non-diabetic ASCs. Nevertheless, 40% of diabetic and 20% of control non-diabetic ASC samples displayed a high expression of fibroblast marker, which inversely correlated with expression of CD105. Moreover, in diabetic patients, significantly decreased expression of VEGF and CXCR4 was found in fibroblast-positive ASCs when compared to their fibroblast-negative counterparts. Reduced osteogenic differentiation and down-regulation of chemokine CXCL12 was found in fibroblast-negative diabetic ASCs. No significant differences were observed between diabetic and control ASCs in adipogenic, chondrogenic, endothelial and islet-like cell differentiation. Impairment of diabetic ASCs, in terms of osteogenic differentiation and CXCL12 signal transduction, may decrease the effectiveness of autologous cell therapies in diabetic patients. Our data suggests that allogenic ASC therapy might be more effective than autologous ASC therapy in diabetic patients.

Testování biokompatibility nanostrukturovaného titanu pro použití v tkáňovém inženýrství

Ostrovská L.¹, Sauerová P.¹, Vištejnová L.¹, Džugan J.², Hubálek Kalbáčová M.¹

Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze¹

Comtes FHT a.s.²

Významným pokrokem ve vývoji a přípravě funkčních materiálů připomínající reálnou tkáň je možnost kontrolovaně připravovat materiály s velikostmi zrn vykazujících rozměry v nanometrových měřítkách. Nanometrové struktury odpovídají přirozenému extracelulárnímu prostřední tkáni a mohou buňky stimulovat ke kvalitnější buněčné adhezi, zvýšené proliferaci či produkci extracelulární hmoty. Cílem této práce bylo studium interakce různých buněčných typů s nanostrukturovaným titanem Gr. 2 a porovnat vliv různých velikostí zrn a přípravy povrchu vzorků na buněčnou adhezi, metabolickou aktivitu a proliferaci.

Titan Gr. 2 byl zpracován pomocí metody tváření za extrémních plastických deformací metodou ECAP- CONFORM. Tímto způsobem zpracování byly vyrobeny experimentální materiály s různou velikostí zrn ($< 1 \mu\text{m}$, $4.6 \mu\text{m}$ a $30 \mu\text{m}$). Z těchto materiálů byly následně vyrobeny vzorky s různou drsností povrchu – povrch broušený (metalografický brusný papír 1200) a povrch leštěný diamantovou pastou.

Lidské linie osteoblastů (SAOS-2) a keratinocytů (HaCaT) a lidské mezenchymální kmenové buňky (MSC) byly kultivovány na nanotitanu po dobu 2 a 48 hod, kdy byl určen počet a velikost buněk. Dále, po 48 hod byly u buněk stanoveny metabolická aktivita a míra produkce pro-zánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8 a TNF- α 945;).

Všechny studované buněčné typy dobře adherovaly na povrchy nanotitanů. Nejvyšší míra adheze byla pozorována u MSC, kdy počet adherovaných buněk byl vyšší než u polystyrenové kontroly (PS). Metabolická aktivita MSC a SAOS kultivovaných na většině typů nanotitanů byla srovnatelná s kontrolní PS, jen v některých případech byla mírně snížena. Na druhé straně, metabolická aktivita HaCaT byla snížena výrazně na většině typů nanotitanů. U všech buněčných typů byly pozorovány různé reakce na jednotlivé nanotitany lišící se rozměrem zrn a úpravou povrchu. Aktivace imunitní odpovědi ve formě zvýšené produkce pro-zánětlivých cytokinů také nebyla registrována u žádného z buněčných typů, což napovídá o neimunogenicitě nově připravených nanotitanů.

Získané výsledky ukazují, že nanostrukturovaný titan nabízí zajímavou možnost ve vývoji kostních a zubních implantátů. Povrchy titanu s nanorozměry podporují adhezi zejména kostních a kmenových buněk, jejichž aplikace v regenerativní medicíně je stále častější.

Příprava pluripotentních kmenových buněk dediferenciací somatických buněk

Pokorná D.

Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i.

Přirozenými pluripotentními kmenovými buňkami jsou buňky embryonální (ESC), které mohou být izolovány z vnitřní vrstvy blastocysty v časných stádiích embryogeneze. Pluripotentní kmenové buňky mohou být připraveny i in vitro dediferenciací somatických buněk. V naší laboratoři se dlouhodobě zabýváme výzkumem metodik přenosu buněčného jádra (SCNT) a dalšími moderními metodikami dediferenciace somatických buněk pomocí vnášení plazmidů a mRNA, kódující yamanakovy faktory a MBD3 siRNA, dále pomocí malých chemických molekul (buňky iPSC) a nově i pomocí nízkého pH (buňky STAP).

Biocompatibility of polyanilines with neural progenitors and cardiomyocytes in vitro*Radaszkiewicz K.A., Lánová M., Vičárová H., Hanáčková M., Humpolíček P., Pacherník J.**Masarykova univerzita*

Conducting polymers are organic polymers able to conduct electricity; they may exhibit metallic conductivity but usually they are semiconductors. Polyanilines (PANIs) as an example of conducting polymers possess ability to respond to various stimuli by the change in their optical, electrical, chemical and mechanical properties. PANIs are one of the best known conducting polymers on account of high electrical conductivity, excellent electronic and optical properties, good redox and ion-exchange activity, environmental stability, simplicity of preparation from common chemicals, and relatively low cost. Therefore in the last decade there is growing interest in the use of conducting polymers for biological and medical applications including cardiac and neuron tissue engineering.

Here in our pilot study, we have tested a potential of various PANIs as a usable material for growth and expansion of neural progenitors, cardiomyogenesis in embryonic stem cells and cardiomyocytes. Our data indicate a utility of some PANIs for growth of tested cells. Moreover we observed improved differentiation of tested cells on PANIs with higher adhesiveness for cells. In following experiments we focus on further characterization of cells on PANIs from the view of polymers conductivity.

Perspectives in the use of myoblasts in mitochondrial diagnostics and bioimplantology

Sládková J., Kostková O., Spáčilová J., Hansíková H., Zeman J.

Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

The field of stem cell research is advancing rapidly, forging new frontiers for cellular therapy and tissue engineering. Although the use of adult stem cells (eg. mononuclear, undifferentiated myoblasts called satellite cells that can proliferate in culture) for treating patients with various diseases (eg. heart failure or urinary incontinence) is promising, further advancement is necessary before stem cell therapy can be considered an established part of daily clinical protocol.

The aim of our study was to collect cultures of myoblasts from patients with mitochondrial disorders and compare them to the mitochondrial morphology between proliferating myoblasts, differentiated myotubes and fibroblasts culture. Upon establishing our findings, we investigated the myoblasts proliferating capacity for efficient autologous transplantation.

We isolated satellite cells by explant technique, which uses the intrinsic property of satellite cells to become activated and migrate to a site of lesion. Satellite cells were allowed to migrate out from muscle explants and were cultured under standard conditions . Once the cells migrate out of the explants (muscle biopsy), they are then referred to as myoblasts.

Our study revealed that in patients with mitochondrial disorders, myoblasts change morphology of mitochondrial reticulum and mitochondrial ultrastructure. Mitochondrial equipment was rather scattered and irregular with sporadically distributed megamitochondria in myoblasts of investigated patients compared with controls. Ultrastructural analysis of cultured myoblasts of patients revealed a rather heterogeneous picture of abnormally sized and shaped mitochondria, almost regularly associated with unusually aberrant and sparse cristae. Potentially, these cultured myoblasts may one day be used to support the diagnostics of mitochondrial disorders. But use of myoblasts from patients with mitochondrial disease for regenerative medicine is limited because they are retarded in growth in comparison with control myoblasts due to the substantial involvement of mitochondria in the regulation of myogenesis.

Supported by: RVO-VFN 64165/2012

Histologická analýza rozhraní bionických implantátů na bázi kolagenu, poly(DL-laktidu) a kalcium fosfátu

Suchý T.^{1,3}, Staněk L.², Sucharda Z.¹, Šupová M.¹, Balík K.¹, Sedláček R.³

Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, Ústav struktury a mechaniky hornin, Akademie věd České republiky, v.v.i.¹

Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha²

Laboratoř biomechaniky, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Fakulta strojní, ČVUT v Praze³

Lidská kost je v podstatě dokonalý kompozit složený převážně z nanosložek, které jí zaručují jedinečné vlastnosti. Kost neposkytuje pouze mechanickou podporu, ale slouží také jako zásobník minerálů. Je dobrým příkladem dynamické tkáně – do určitého rozsahu má jedinečné regenerační a remodelační schopnosti. Ovšem z různých důvodů si mnohé případy traumatických nebo netraumatických poškození vyžadují léčbu pomocí kostních štěpů nebo náhrad. Cílem naší studie bylo in vivo biologické hodnocení nanokompozitního materiálu, jehož složení kombinuje výhody biodegradabilních alifatických polyesterů ve formě nanovláken, přírodního kolagenu jako matrice, a přírodního kalcium fosfátu ve formě nanočástic, to vše doplněno hyaluronanem sodným. Biologické hodnocení bylo provedeno na zvířecím modelu prasete (femur, trochanter major). Odběry byly provedeny po 6 a 12 měsících pod kontrolou RTG a CT. Byly vyjmuty celé hlavice femuru, byla provedena dekalifikace pomocí kyseliny mravenčí po dobu 24 hodin. Následně byly oblasti s implantáty opracovány a zality do parafínu po předchozí fixaci 10% formolem. Preparáty byly krájeny na řezy 3 – 5 µm, barveny HaE a značeny fluoresceinem pro světelnou a fluorescenční mikroskopii. Dále byla na řezy použita molekulární metoda TUNEL (DeadEnd, Fluorometric TUNEL System), která na základě analýzy řezů detekovala buňky v oblasti kompozita přecházející do apoptózy. Výsledky ukázaly, že použitý materiál splňuje očekávání a již po první fázi odběrů (6 měsíců) byl vidět přechod kompozita v kost a prorůstání v celém rozsahu. Byla detekována kolagenní vlákna a diferenciací osteoblastů v oblasti kompozita. V další fázi odběru (12 měsíců), bylo již vidět kompletní prorůstání a téměř neznatelný implantát. Byla zde dokonalá kostní novotvorba a detekována přirozená apoptóza.

Tato studie byla podpořena Technologickou agenturou České republiky (projekt č. 01010185).

Nové možnosti využití mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v chirurgii spánkové kosti

Školoudík L., Chrobok V., Filip S.¹, Laco J.², Dědková J.³, Kočí Z.⁴

Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

¹*Klinika onkologie a radioterapie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové*

²*Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové*

³*Radiologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové*

⁴*Ústav experimentální medicíny Akademie věd České republiky, v.v.i.*

Úvod: Multipotentní mezenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou studovány pro schopnost vyžrávání směrem ke specializovaným mezodermálním tkáním, jakým je tkáň kostní. Osteogeneze vyvolaná MSCs aplikovanými spolu s nosičem do kostěného defektu přináší novou metodu terapie kostěných defektů.

Pracovní hypotéza: Implantace kultivovaných mezenchymálních kmenových buněk na nosiči do defektu spánkové kosti umožní remodelaci kosti pevnou vitální kostní tkání. V humánní medicíně bude možno využít nové techniky k rekonstrukci kostěné stěny zvukovodu po sanačních operacích spánkové kosti otevřenou technikou. Dojde k oddělení zevního ucha od pneumatického systému spánkové kosti, což sníží morbiditu a zvýší kvalitu života pacientů po sanačních středoušních operacích.

Hlavní cíl studie: Vytvoření vhodného zvířecího modelu a preklinické vyzkoušení účinnosti lidských MSCs pro rekonstrukci zvukovodu po sanačních středoušních operacích.

Metodika: Osteogenní diferenciacie je preklinicky testována a hodnocena na zvířecím modelu. Experimentální zvířetem je morče. Pro přípravu kombinovaného biomateriálu jsou použity lidské mezenchymální buňky izolované z kostní dřevě. Za aseptických podmínek a v souladu se Správnou výrobní praxí (SVP) v čistých prostorech ÚEM AV ČR byly buňky namnoženy a v třetí pasáži sklizeny. Vždy pro jeden implantát se smíchalo 1,6 ml MSC s 0,02 g CEM-OSTETIC a s tkáňovým lepidlem Tissucol. Pro první (experimentální) skupinu morčat byl připraven kombinovaný osteokondukční materiál s mezenchymálními kmenovými buňkami, pro kontrolní skupinu byl připraven materiál bez kmenových buněk. Experimentální zvíře je operováno v celkové disociativní anestezii se zachováním spontánního dýchání. Biomateriál je implantován do vytvořeného defektu přední stěny tympanické buly. S odstupem 1 měsíce je hodnoceno HRCT vyšetření spánkové kosti, je provedena explorace tympanické buly a hodnocen histologický nále z v oblasti implantace biomateriálu.

Výsledky: Pro hodnocení výsledku implantací biomateriálu 30 dní po operaci jsme získali 15 experimentálních zvířat, 8 v experimentální skupině s implantací biomateriálu s MSC a 7 v kontrolní skupině s implantací materiálu bez MSC.

Po implantaci osteogenního materiálu bez MSC i biomateriálu s MSC došlo k uzavření kostěného defektu s novotvorbou kosti u všech experimentálních zvířat. Použitý materiál nevedl k významnější zánětlivé reakci či nežádoucím změnám v tympanické bule. Při kvantitativním zhodnocení novotvorby kosti dochází 30 dnů po implantaci biomateriálu k signifikantnímu zvýšení osteoneogeneze ve skupině morčat s implantací biomateriálu s MSC oproti skupině kontrolní s implantací osteogenního nosiče bez MSC.

Závěr: Experimentální studie ukazuje na možnost nového využití MSCs v klinické praxi.

V současnosti je metoda implantace MSC do operačního defektu spánkové kosti testována na úrovni experimentálního zvířecího modelu. Její využití v humánní medicíně je zcela novou technikou, která umožní obnovení anatomických poměrů po sanačních operacích spánkové kosti.

Podpořeno MZ ČR - RVO (FNHK, 00179906).

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE SVĚTOVÝCH ZNAČEK

Thermo Scientific - Jouan, Heto, Heraeus, Forma, Labsystems, Barnstead, Sorvall, Savant
EVERMED, ERLAB, TECNIPLAST, SYNGENE



MTX 150 THERMO

nová řada mikroultracentrifug
špičkový výkon 150 tisíc RPM během 80 sec
kompaktní stolní i stojanové provedení
široká nabídka rotorů



Sci-tive Ruskinn

In vivo prostředí v izolátoru
řízená atmosféra O₂ 0-20% a CO₂ 0-30%, regulace
teploty a regulace RH, HEPA filtrace a uhlíkové filtry
možnost instalace mikroskopu a jiných zařízení



VARIOSKAN FLASH THERMO

multifunkční reader pro destičky 6 -1536
fotometrické, luminometrické
a fluorometrické aplikace,
kontinuální spektrum, špičková přesnost



GBOX SYNGENE

gel imaging systémy v řadě modifikací
pro fluorescenční
i chemiluminiscenční aplikace
výběr chlazených kamer s vysokým
rozišením a citlivostí

MULTISKAN FC THERMO

mikrodestičkový reader nové generace
96 a 384 jamkové mikrodestičky
možnost integrace s roboty THERMO

Matrix PlateMate 2x3

dávkovací automat, 6 pozic,
kompatibilní s formáty 24, 48, 96, 384
a 1536, objemy 0,1-300 µl
integrovatelný do robotických linek
i pro samostatné využití



HERASAFE KS THERMO

nová generace špičkových biohazard boxů tř. II
certifikace podle ČSN EN 12469 - ochrana obsluhy
interní prostředí - třída čistoty ISO4 dle EN ISO 14644-1
dva nebo tři HEPA filtry, volitelně uhlíkové filtry



ProtoCol 2 Synbosis

automatický systém pro počítání kolonií
a analýzu inhibičních zón
rozišení kolonií od 50 µm,
klasifikace podle barvy,
velikosti i tvaru kolonií



MULTIFUGE X1/X3 THERMO

nová řada univerzálních centrifug
až 4 x 750 ml, výkon do 15200 ot
unikátní systém upínání rotoru
bez klíče (Autolock®)

HERAcell 150i THERMO

inkubátor s řízenou atmosférou CO₂
garantující výborné kultivační prostředí
kapacita 151 l nebo 240 l
horkovzdušná dekontaminace ContraCon

