

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 181

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61F 2/24 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-39740**

(22) Přihlášeno: **19.03.2022**

(47) Zapsáno: **28.06.2022**

(73) Majitel:
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ
Ústav jaderné fyziky AV ČR, v. v. i., Husinec, CZ
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
4, Krč, CZ

(72) Původce:
Mgr. Elena Filová, Ph.D., Praha 4, Modřany, CZ
RNDr. Jana Musílková, CSc., Praha 2, Vinohrady,
CZ
Mgr. Adam Eckhardt, Ph.D., Praha 5, Stodůlky, CZ
Mgr. Daniel Hadraba, Ph.D., Neratovice, CZ
Mgr. David Vondrášek, Praha 9, Černý Most, CZ
Mgr. Šimon Pražák, Plzeň, Východní Předměstí,
CZ
doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc., Praha 4,
Braník, CZ
Ing. David Chvátíl, Praha 8, Karlín, CZ
Ing. Václav Olšanský, Svojetice, CZ
MUDr. Miroslav Koňářík, Praha 4, Modřany, CZ
prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc., Praha 3, Žižkov, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitého vzoru:
**Recelularizovaný perikard pro
kardiovaskulární náhrady**

Recelularizovaný perikard pro kardiovaskulární náhrady

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká recelularizovaného perikardu pro kardiovaskulární náhrady.

Dosavadní stav techniky

10

Materiály na bázi kolagenu, např. perikard, jsou studovány jako biomateriály pro tkáňové inženýrství kardiovaskulárních náhrad (jako jsou např. náhrady srdečních chlopní, cév či cévní záplaty), a dále náhrad šlach, nervových vodičů, chrupavek, kostí apod. Pro zlepšení biologických nebo mechanických vlastností tkání obsahujících kolagen nebo izolovaného kolagenu se používají různé modifikace, jako je decelularizace mnoha různými způsoby (převážně chemicky, dále tlakem apod.), chemické síťování (např. glutaraldehydem, genipinem), fyzikální síťování (např. mikrovlnným zářením, ozařováním elektrony, γ -zářením, UV-zářením), chemické navázání bioaktivních molekul, např. růstových faktorů (Ahmed, M.R., Vairamuthu, S., Shafiuza, M., Basha, S.H., Jayakumar, R. Microwave irradiated collagen tubes as a better matrix for peripheral nerve regeneration. *Brain Research* 1046, 55 – 67, 2005; Filová, E., Staňková, L., Eckhardt, A., Svobodová, J., Musílková, J., Pala, J., Hadraba, D., Brynda, E., Koňářík, M., Pirk, J., Bačáková, L., Modification of human pericardium by chemical crosslinking. *Physiol. Res.* 69, 49-59, 2020; Filova, E., Steinerova, M., Travnickova, M., Knitlova, J., Musilkova, J., Eckhardt, A., Hadraba, D., Matejka, R., Prazak, S., Stepanovska, J., Kucerova, J., Riedel, T., Brynda, E., Lodererova, A., Honsova, E., Pirk, J., Konarik, M., Bacakova, L. Accelerated in vitro recellularization of decellularized porcine pericardium for cardiovascular grafts. *Biomed Mater.* 16(2): 025024, 2021; Sionkowska, A. Thermal stability of UV-irradiated collagen in bovine lens capsules and in bovine cornea, *J Photochemistry and Photobiology B.* 2005, 80, 87-92, 2005), blokování karboxylových skupin a síťování perikardu (CN112773936A), potahování perikardu, např. chitosanem (RU2519219C1), chemická úprava na snížení kalcifikace decelularizovaného perikardu (CN104998299A). Byla snaha o vytvoření recelularizovaného perikardu osazením decelularizovaného crosslinkovaného perikardu kmenovými buňkami pro rekonstrukci pánevního dna a léčbu hernie břišní stěny (CN102552997A). Tento poslední patent neudává podrobnosti přípravy. Lidský perikard byl také osazen srdečními kmenovými buňkami připravenými z buněk perikardu pomocí epiteliálně mezenchymálního přechodu (CN108410801A).

Pro dlouhodobé skladování kolagenních náhrad (perikard, šlachy, kůže, kosti, vazy, chrupavka) se používají různé metody kryoprezervace, jako je lyofilizace a hluboké zamrazení, někteří autoři udávají i metodu mrazového sušení, která spočívá v rychlém ochlazení a následném odstranění vody z perikardu pomocí silného vakua. Takto upravený perikard je následně možné skladovat za pokojové teploty.

Nevýhodou této metody je změna tloušťky perikardu, avšak jeho mechanické vlastnosti se nemění. Kryoprezervace se často kombinuje s ozářením γ -zářením dávkou ionizujícího záření 25 až 35 kGy, a to z důvodu sterilizace štetu. Ozáření γ -zářením (25kGy) způsobuje změnu mechanických vlastností hovězího perikardu, konkrétně Youngova modulu, tahového napětí (tensile strength) a míry jeho prodloužení (elongation rate; Hafeez, Y.M., Zuki, A.B.Z., Yusof, N., Asnah, H., Loqman, M.Y., Noordin, M.M., Ainul-Yuzairi, M.Y. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium. *Cell and Tissue Banking* 6: 85–89, 2005).

Bovinní perikard, používaný pro konstrukci náhrad srdečních chlopní, je obvykle síťovaný glutaraldehydem. Síťování perikardu snižuje jeho degradaci, antigenicitu, trombogenicitu a modifikuje mechanické vlastnosti náhrady. Zbytky glutaraldehydu ve tkáni jsou však považovány za příčinu kalcifikace perikardu v dlouhodobém měřítku; způsobují selhání jeho

funkce a nutnost výměny chlopenní náhrady. Nevýhodou je, že v současnosti používané decelularizované tkáně určené pro kardiovaskulární náhrady jsou v organismu velmi slabě spontánně recelularizovány, zejména endotelizovány. Experimentálně je však možné zlepšit jejich endotelizaci potahováním proteiny, chemickým navázáním růstových faktorů, a rovněž osazením kmenovými buňkami, které ulehčují následnou endotelizaci (Filova, E., Steinerova, M., Travnickova, M., Knitlova, J., Musilkova, J., Eckhardt, A., Hadraba, D., Matejka, R., Prazak, S., Stepanovska, J., Kucerova, J., Riedel, T., Brynda, E., Lodererova, A., Honsova, E., Pirk, J., Konarik, M., Bacakova, L. Accelerated in vitro recellularization of decellularized porcine pericardium for cardiovascular grafts. *Biomed Mater.* 16(2): 025024, 2021; Musilkova J, Filova E, Pala J, Matejka R, Hadraba D, Vondrasek D, Kaplan O, Riedel T, Brynda E, Kucerova J, Konarik M, Lopot F, Jan Pirk, Bacakova L. Human decellularized and crosslinked pericardium coated with bioactive molecular assemblies. *Biomed Mater.* 2019;15(1):015008. doi: 10.1088/1748-605X/ab52db; Polak, R., Rodas, A.C.D., Chicoma, D.L., Giudici, R., Beppu, M.M., Higa, O.Z., Pitombo, R.N.M. Inhibition of calcification of bovine pericardium after treatment with biopolymers, E-beam irradiation and in vitro endothelization. *Materials Science and Engineering C*, 33(1), 85-90, 2013).

Při recelularizaci decelularizovaných maticí (včetně maticí kolagenních) v podmínkách *in vitro* pomocí kmenových buněk je pro správnou diferenciaci buněk nutno přidat do média růstové faktory, nebo růstové faktory chemicky navázat na kolagen. Například perikard modifikovaný fibrinem s navázaným VEGF a osídlený kmenovými buňkami tukové tkáně (ASC) vykazoval vysoký obsah fibronektinu, který podporuje adhezi a růst endotelových buněk na povrchu štěpu a tím zabezpečuje jeho antitrombogenicitu (Filova, E., Steinerova, M., Travnickova, M., Knitlova, J., Musilkova, J., Eckhardt, A., Hadraba, D., Matejka, R., Prazak, S., Stepanovska, J., Kucerova, J., Riedel, T., Brynda, E., Lodererova, A., Honsova, E., Pirk, J., Konarik, M., Bacakova, L. Accelerated in vitro recellularization of decellularized porcine pericardium for cardiovascular grafts. *Biomed Mater.* 16(2): 025024, 2021).

Úkolem předkládaného technického řešení je vyvinout recelularizovaný perikard pro kardiovaskulární náhrady, který spontánně stimuluje adhezi, růst, diferenciaci buněk ASC a produkci mezibuněčné hmoty těmito buňkami bez nutnosti použít růstové faktory na diferenciaci směrem k hladkému svalu, nevyžaduje žádnou další chemickou úpravu s potenciálně toxickými účinky, a má mechanické vlastnosti porovnatelné s decelularizovanou tkání.

35

Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je recelularizovaný perikard pro kardiovaskulární náhrady, který je připravitelný postupem, při němž se decelularizovaný perikard sterilizuje vodným roztokem etanolu, následně se perikard ozáří elektrony o energii v rozmezí 8 až 10 MeV v dávce v rozmezí 20 až 70 kGy, a poté se perikard osadí kmenovými buňkami získanými z tukové tkáně (ASC), a popřípadě následně také endotelovými buňkami.

V jednom provedení je předmětem technického řešení perikard pro kardiovaskulární náhrady recelularizovaný kmenovými buňkami získanými z tukové tkáně.

V dalším provedení je předmětem technického řešení perikard pro kardiovaskulární náhrady recelularizovaný kmenovými buňkami získanými z tukové tkáně a endotelovými buňkami.

Decelularizovaný perikard je složen převážně z kolagenu I a III, je biodegradabilní, biokompatibilní, a má sníženou imunogenicitu oproti nedecelularizovaným tkáním. Decelularizovaný perikardem je s výhodou decelularizovaný prasečí perikard. Postupy přípravy decelularizovaného perikardu jsou známy z literatury, například z článku: Roman Matějka, Miroslav Koňářík, Jana Štěpanovská, Jan Lipenský, Jaroslav Chlupáč, Daniel Turek, Šimon Pražák, Antonín Brož, Zuzana Šimůnková, Iveta Mrázová, Serhiy Forostyak, Peter Kneppo, Jozef

Rosina, Lucie Bačáková, Jan Pirk. Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Appl. Sci.* 2020, 10(16), 5473. V tomto provedení decelularizačního postupu se perikard zamrazí na teplotu v rozmezí -76 až -86 °C v médiu DMEM (Dulbeccova modifikace Eaglova séra) s přidavkem dimethylsulfoxidu, fetálního bovinního séra, antibiotika a antitumorigenika, následně se perikard decelularizuje promýváním v roztoku dodecylsulfátu sodného, a poté se perikard promyje roztokem DNAsy. Kroky zamražení a decelularizace lze opakovat, například je lze opakovat 2x až 4x. Lze ale použít i jiné v oboru známé postupy decelularizace perikardu.

10 Sterilizace vodným roztokem etanolu se s výhodou provádí roztokem o koncentraci alespoň 60 obj. %, výhodněji roztokem o koncentraci 70 obj. %.

Následný krok ozáření elektrony se provádí ve vodném prostředí, dávkou v rozmezí 20 až 70 kGy, s výhodou 25 až 50 kGy. S výhodou se použijí elektrony o energii 10 MeV. Ozáření způsobuje změny fyzikálně chemických vlastností decelularizovaného perikardu, které zahrnují například snížení množství vázané vody, ale zachování amidových vazeb typických pro kolagen (pozorovatelné např. infračervenou spektrometrií), změny denaturační teploty měřené diferenciální skenovací kalorimetrií, mírné zvýšení hydrofóbnosti pozorovatelné jako snížení bobtnání. Mechanické vlastnosti však zůstávají zachovány. Fyzikální zesíťování pomocí ozařování elektrony příznivě ovlivňuje stabilitu mezibuněčné hmoty, zánětlivou odpověď a kalcifikaci při zachování biokompatibility tkání.

Takto upravený perikard pak po osazení ASC stimuluje adhezi a proliferaci těchto kmenových buněk a jejich diferenciaci směrem k hladkým svalovým buňkám, která se vyznačuje produkcí specifických markerů, jako jsou alfa-aktin, kalponin a smoothelin, a to i v kultivačním médiu bez použití růstových faktorů. Kmenové buňky jsou současně stimulovány i k produkci mezibuněčné hmoty, např. kolagenu I a fibronektinu, které mohou následně podporovat osídlení matrice endotelovými buňkami.

30 Osazení kmenovými buňkami z tukové tkáně lze provést například v médiu DMEM s přidavkem fetálního bovinního séra (FBS) a růstového faktoru FGF-2, a s výhodou se dále provádí kultivace po dobu 8 až 14 dní. S výhodou je při osazení hustota buněk v rozmezí 16 700 až 32 000 buněk/cm².

35 Po nakultivování kmenových buněk z tukové tkáně lze následně osadit perikard endotelovými buňkami (např. HSVEC) v médiu EGM-2 (médiu pro růst endotelových buněk), a s výhodou se dále provádí kultivace po dobu 2 až 5 dní, s výhodou 3 až 4 dny. S výhodou je při osazení hustota buněk v rozmezí 28 000 až 56 000 buněk/cm².

40 Recelularizovaný perikard podle předkládaného technického řešení neobsahuje zbytky glutaraldehydu, které by zvyšovaly riziko kalcifikace a snižovaly stabilitu a funkčnost kardiovaskulární náhrady, protože je při přípravě odstraněna potřeba síťování glutaraldehydem. Dále recelularizovaný perikard neobsahuje růstové faktory, zejména TGF-β1, BMP-4, které negativně ovlivňují růst endotelových buněk. Trojrozměrná perikardiální matrice ozářená elektrony poskytuje vhodný systém pro ko-kultivaci kmenových buněk s endotelovými buňkami bez použití těchto růstových faktorů. Zároveň je zajištěna dostatečná recelularizace decelularizovaného meziprojektu, protože takto ošetřený meziprojekt spontánně stimuluje adhezi, proliferaci a diferenciaci kmenových buněk směrem k hladkému svalu bez použití růstových faktorů na diferenciaci kmenových buněk a podporuje tvorbu mezibuněčné hmoty nutnou pro dlouhodobou funkčnost kardiovaskulární náhrady. Urychlení recelularizace perikardu kmenovými buňkami, jejich diferenciací směrem na hladké svalové buňky a tvorba mezibuněčné hmoty dlouhodobě zlepšuje funkčnost kardiovaskulární náhrady.

Objasnění výkresů

Obr. 1 ukazuje poměr intenzity signálů amidu A (3300 cm^{-1}) a amidu I (1650 cm^{-1}) v FTIR-ATR vibračním spektru neozářeného (non) a ozářeného (25 kGy, 50 kGy) decelularizovaného perikardu. Hvězdička popisuje statisticky signifikantní rozdíly.

Obr. 2 ukazuje denaturační teploty nativního perikardu, decelularizovaného neozářeného a ozářeného (25 kGy a 50 kGy) perikardu.

Obr. 3 ukazuje procento bobtnání nativního, decelularizovaného neozářeného a ozářeného (25 kGy a 50 kGy) perikardu.

Obr. 4 ukazuje metabolickou aktivitu ASC buněk na decelularizovaném neozářeném a ozářeném perikardu a na kontrolní polystyrenové misce měřenou pomocí MTS eseje 4. a 8. den po nasazení.

Obr. 5. ukazuje expresi genů pro smoothelin a fibronektin u decelularizovaného ozářeného a neozářeného perikardu. Statistické hodnocení: sloupce označené jiným písmenem se navzájem signifikantně liší v rámci jednoho časového úseku.

Obr. 6. ukazuje imunofluorescenční barvení fibronektinu v ASC buňkách ve vzorku decelularizovaného perikardu (A), v decelularizovaném perikardu ozářeném 25 kGy a 50 kGy 14. den po nasazení. Konfokální mikroskop Leica SP8, obj. $\times 63$, zoom $\times 3$.

25 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Příprava ozářeného decelularizovaného perikardu

Perikard byl odebrán z přeštického prasete a zamražen v DMEM médiu s 10 obj.% dimethylsulfoxidu (DMSO) (Sigma), 20 obj.% fetálního bovinního séra (FBS) (Gibco) a 1 hmotn.% antibiotického-antimykotického roztoku (ABAM, Sigma, 1 ml obsahuje 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu a 25 μg amphotericinu B). Pro decelularizaci perikardu byl dále použit postup podle publikace: Roman Matějka, Miroslav Koňářík, Jana Štěpanovská, Jan Lipenský, Jaroslav Chlupáč, Daniel Turek, Šimon Pražák, Antonín Brož, Zuzana Šimůnková, Iveta Mrázová, Serhiy Forostyak, Peter Kneppo, Jozef Rosina, Lucie Bačáková, Jan Pirk. Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Appl. Sci.* 2020, 10(16), 5473. Decelularizovaný perikard byl sterilizován vodným roztokem etanolu 2 hod a opláchnut v PBS.

Krok ozařování byl proveden tak, že decelularizovaný prasečí perikard byl ponořen v PBS, umístěn na rotační podstavec do vzdálenosti 100 cm od okénka výstupu elektronů z mikrotronu a ozářen elektrony v Microtronu MT25 energií 10 MeV, proudem $I_i = 8$, dávkou 25 kGy a 50 kGy. Doba ozáření byla 20 min pro dávku 25 kGy a 40 min pro dávku 50 kGy. Během ozařování vzorky rotovaly, aby bylo ozáření rovnoměrné ze všech stran. Absorbovaná dávka byla měřena pomocí ionizační komory TN34045 (PTW Freiburg) a programovatelného elektrometru Keithley 617. Ozařování probíhalo při pokojové teplotě, která se udržovala stabilní pomocí chlazení proudem vzduchu.

Některé vzorky decelularizovaného perikardu byly ponechány bez ozáření (srovnávací vzorky).

50 Příklad 2: Recelularizace perikardu lidskými kmenovými buňkami z tukové tkáně

Vzorky ozářeného i neozářeného perikardu z Příkladu 1 byly osazeny lidskými kmenovými buňkami z tukové tkáně (ASC) v hustotě 16 700 až 32 000 buněk/ cm^2 v 24-jamkové destičce,

a byly kultivovány v DMEM médiu s 10 obj.% FBS a s FGF-2 (FGF-basic, human, 154aa, GenScript, 10 ng/ml) po dobu 8 až 14 dní.

5 Příklad 3: Recelularizace perikardu lidskými kmenovými buňkami z tukové tkáně a endotelovými buňkami

10 Vzorky ozářeného i neozářeného perikardu z Příkladu 1 byly osazeny lidskými kmenovými buňkami z tukové tkáně v hustotě 16 700 až 32 000 buněk/cm² v 24-jamkové destičce, kultivovány v DMEM médiu s 10 obj.% FBS a s FGF-2 (FGF-basic, human, 154aa, GenScript, 10 ng/ml) po dobu 8 až 14 dní.

15 Na takto připravený perikard byly nasazeny endotelové kmenové buňky (HSVEC) v hustotě 28 000 až 56 000 buněk/cm², v EGM-2 médiu (C-22111, Promocell), a byly kultivovány v EGM-2 médiu po dobu 2 až 5 dní.

Příklad 4: Charakterizace ozářeného decelularizovaného perikardu před osazením buňkami

a) Charakterizace ozářeného decelularizovaného perikardu na FTIR

20 Fyzikálně-chemické vlastnosti vysušených vzorků perikardu byly hodnoceny pomocí metody FTIR-ATR (Attenuated Total Reflection Infrared Spectrometry) přístrojem Protégé 460 E.S.P. (Thermo Nicolet Instruments Co., Madison, USA) vybaveným ATR nádstavcem (GladiATR, PIKE Technologies) s diamantovým krystalem. Všechna spektra byla zaznamenána 128 skeny s rozlišením 4 cm⁻¹. Plochy pásů (integrálních absorbcí) byly určeny pomocí software OMNIC 7.
25 Infračervená spektra byla měřena na 10 různých místech a byla statisticky vyhodnocena.

30 Obrázek 1 ukazuje poměr intenzit píků amidu A (3300 cm⁻¹) a amidu I (1650 cm⁻¹). Oba píky jsou charakteristické pro kolagen. Pík amidu A zahrnuje amidovou vazbu i OH vazby, pík amidu I zahrnuje vibrace nových kovalentních vazeb v kolagenu. Snížení poměru amidu A vůči amidu I po ozáření poukazuje na ztrátu O-H vazeb, zejména vázané vody během síťování kolagenu.

b) Charakterizace ozářeného decelularizovaného perikardu pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (Temperature Modulated Differential Scanning Calorimetry, TMDSC, TA Instruments)

35 Prasečí perikard byl ponořen do ultračisté vody na 40 min, skalpelem byl vyřezán kus perikardu (7 až 10 mg), položen na hliníkovou misku a hermeticky uzavřen. Během měření byl používán heat-iso mód. Zahřívání bylo nastaveno na 2 °C/min, měření trvalo 100 s (odpovídá 1 modulačnímu cyklu), amplituda zahřívání ± 0,53 °C. Prázdna hermeticky uzavřená miska byla
40 použita jako kontrola. Každý vzorek byl měřen 3x. Denaturační teplota byly měřena pomocí TRIOS software.

45 Měření denaturační teploty perikardu metodou TMDSC před ozářením a po ozáření ukázalo, že denaturační teplota je snížena při rozštěpení kolagenových molekul i elastických vláken, a je ovlivněna i síťováním, viz Obr. 2.

c) Charakterizace ozářeného decelularizovaného perikardu měřením bobtnacího poměru

50 Vzorky nativního perikardu a vzorky decelularizovaného ozářeného a neozářeného perikardu byly vysušeny přes noc při laboratorní teplotě, zváženy a pak ponořeny do ultračisté vody. V stanovených časových intervalech, tj. po 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90 a 120 minutách byly vzorky vybrány z vody, povrch vzorků byl zlehka osušen filtračním papírem a vzorky byly zváženy. Poměr bobtnání byl definován jako poměr hmotností vlhkého vzorku a suchého vzorku.

Poměr bobtnání perikardu vyjadřuje míru jeho smáčivosti, mírné snížení poměru bobtnání poukazuje na zvýšení hydrofóbnosti ozářených perikardů (Obr. 3).

Příklad 5: Vlastnosti decelularizovaného a ozářeného perikardu po osazení kmenovými buňkami

5

- a) Podpora adheze a viability/metabolické aktivity/proliferace kmenových buněk na ozářeném perikardu

Vzorky decelularizovaného ozářeného a neozářeného perikardu byly osazené ASC buňkami v hustotě 30 000 buněk na jamku ve 24-jamkové destičce a kultivovány v DMEM s 10 obj.% FBS a s FGF2. Na hodnocení proliferace buněk/metabolické aktivity 4. a 8. den po nasazení byla použita esej: CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Do 1 ml média bylo přidáno 200 μ l reagentu a inkubováno s buňkami 1 hod. Absorbance byla odčítána měřením 150 μ l roztoku při 490 nm. Měřili jsme 4 paralelní vzorky z každé vzorky.

15

Ozáření decelularizovaného prasečího perikardu elektrony dávkou 25 kGy a 50 kGy zvýšilo metabo-lickou aktivitu kmenových buněk izolovaných z tuku (která je přímo úměrná počtu buněk) 4. den, 8. den po nasazení v porovnání z neozářeným decelularizovaným perikardem (Obrázek 4).

20

- b) Podpora diferenciaci ASC buněk směrem k hladkému svalu

Vzorky decelularizovaného ozářeného i neozářeného perikardu byly osazeny lidskými kmenovými buňkami z tukové tkáně v hustotě 16900 buněk/cm² v 24-jamkové destičce, kultivovány v DMEM médiu s 10 obj.% FBS a FGF-2 (FGF-basic, human, 154aa, GenScript, 10 ng/ml) po dobu 24 hod, 48 hod, 3 dny, nebo 8 dní. Míra diferenciaci buněk a produkce proteinů extracelulární matrix byla sledována metodou RT PCR. Stanovili jsme relativní expresi mRNA genů pro fibronectin (*FN1*) a smoothelin (*SMTN*) vůči referenčnímu genu β 2-mikroglobulinu (*B2M*). Celková RNA byla z buněk izolována pomocí Total RNA Purification Micro Kit (Norgen Biotek), reverzní transkripce provedena pomocí Omniscript Reverse Transcription Kitu (205113; Qiagen, Hilden, Germany) se statistickými (random) hexamery (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, USA) podle standardního protokolu. Vzorky byly skladovány při -20°C. Relativní exprese mRNA byla stanovena pomocí 5×HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX) (kat. č. 08-36-00001; Solis BioDyne, Tartu, Estonia) a hydrolyzačních esejí TaqMan Gene Expression Assays (kat. č. 4331182; Thermo Fisher Scientific).

35

Elektrony ozářený decelularizovaný perikard podpořil v ASC buňkách expresi genů pro markery diferenciaci směrem k hladkému svalu: např. smoothelin (*SMTN*) a expresi genů pro tvorbu mezibuněčné hmoty: např. fibronectin (*FN1*) (Obrázek 5). Smoothelin se považuje za specifický marker hladkého svalu.

40

- c) Tvorba mezibuněčné hmoty ASC buňkami na ozářeném perikardu.

Vzorky perikardu osazené ASC buňkami byly 14. den kultivace fixovány 10 min roztokem 4 hmotn. % paraformaldehydu a byly opláchnuté ve fosfátovém pufru (PBS). Následně byly inkubovány 20 min v roztoku 1 hmotn.% albuminu s 0,1 obj. % tritonu X-100 při pokojové teplotě a opláchnuté v PBS. Následovala 20 min inkubace v roztoku 1 obj.% Tweenu a opláchnutí v PBS. Vzorky byly dále inkubovány přes noc v roztoku protilátky proti fibronektinu, ředění 1:200, při 4°C (F0791, Sigma). Následovaly 2 oplachy v PBS a inkubace v roztoku protilátky Alexa Fluor488 Goat Anti-Mouse IgG (A11017, Thermofisher Scientific) po dobu 1 hodiny a 2 oplachy v PBS. Pozitivní signál byl snímán konfokálním mikroskopem Leica SP8.

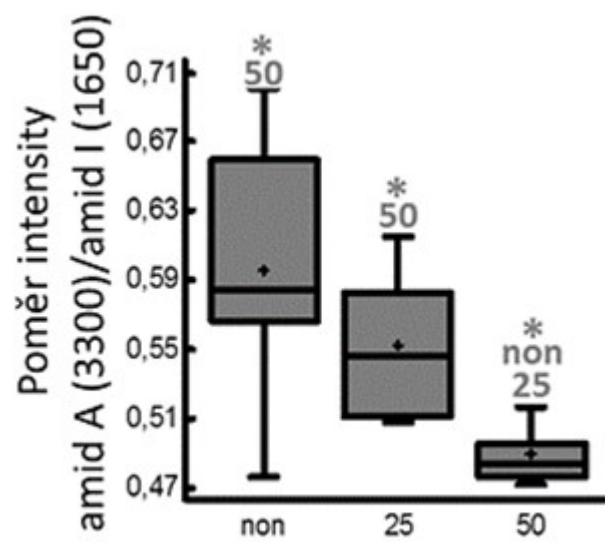
50

ASC buňky produkovaly fibronectin ve větším množství na ozářeném perikardu než na neozářeném decelularizovaném perikardu (Obr. 6).

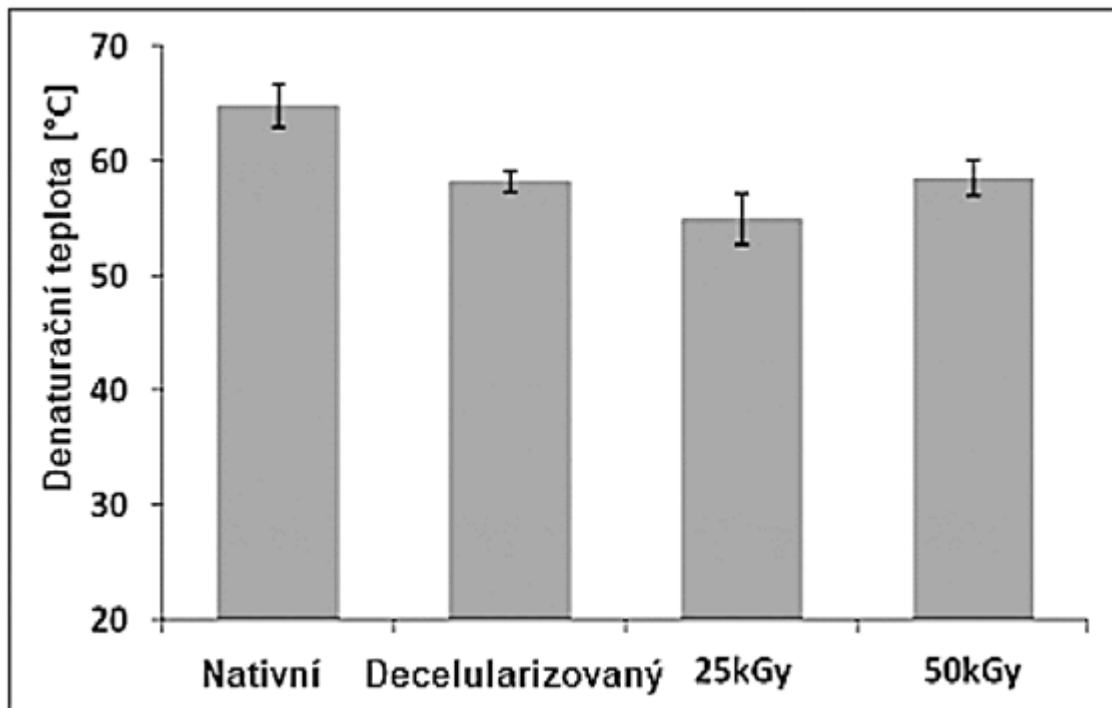
NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Perikard pro kardiovaskulární náhrady recelularizovaný kmenovými buňkami získanými z tukové tkáně, připravitelný postupem, při němž se decelularizovaný perikard sterilizuje vodným roztokem etanolu, následně se perikard ozáří elektrony o energii v rozmezí 8 až 10 MeV v dávce v rozmezí 20 až 70 kGy, a poté se perikard osadí kmenovými buňkami získanými z tukové tkáně.
2. Perikard podle nároku 1, kde krok ozáření elektrony se provede elektrony o energii 10 MeV.
3. Perikard podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2, kde krok ozáření elektrony se provede dávkou v rozmezí 25 až 50 kGy,
- 10 4. Perikard podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde osazení kmenovými buňkami z tukové tkáně se provede v médiu DMEM, Dulbeccova modifikace Eagleova média, s přidavkem fetálního bovinního séra a růstového faktoru FGF-2, a dále se provede kultivace po dobu 8 až 14 dní.
5. Perikard podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde osazení kmenovými buňkami z tukové tkáně se provede na hustotu buněk při osazení v rozmezí 16 700 až 32 000 buněk/cm².
- 15 6. Perikard podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, dále recelularizovaný endotelovými buňkami. připravitelný postupem, kde se po osazení kmenovými buňkami získanými z tukové tkáně perikard následně osadí endotelovými buňkami.
7. Perikard podle nároku 6, kde osazení endotelovými buňkami se provede v médiu EGM-2, Endothelial Cell Growth médium 2, a s výhodou se dále provede kultivace po dobu 2 až 5 dní.
- 20 8. Perikard podle kteréhokoliv z nároků 6 až 7, kde osazení endotelovými buňkami se provede na hustotu buněk při osazení v rozmezí 28 000 až 56 000 buněk/cm².

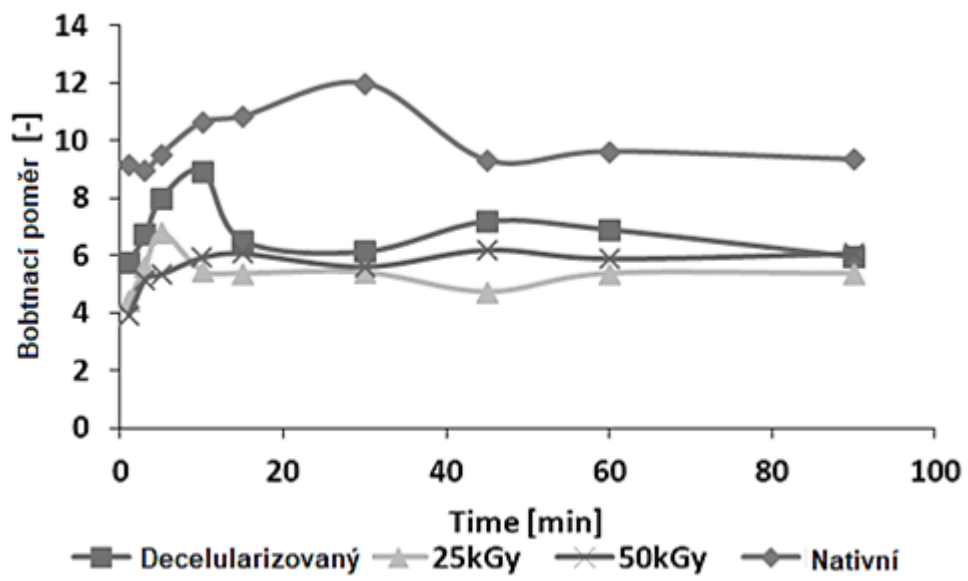
6 výkresů



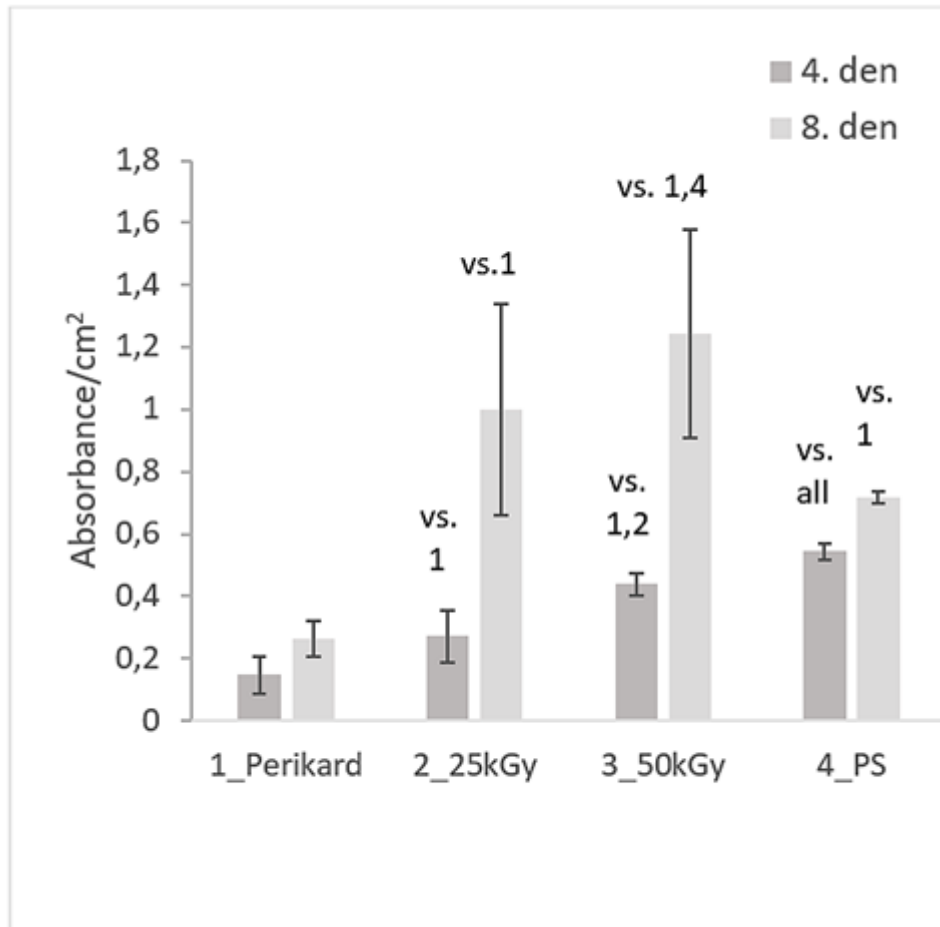
Obr. 1



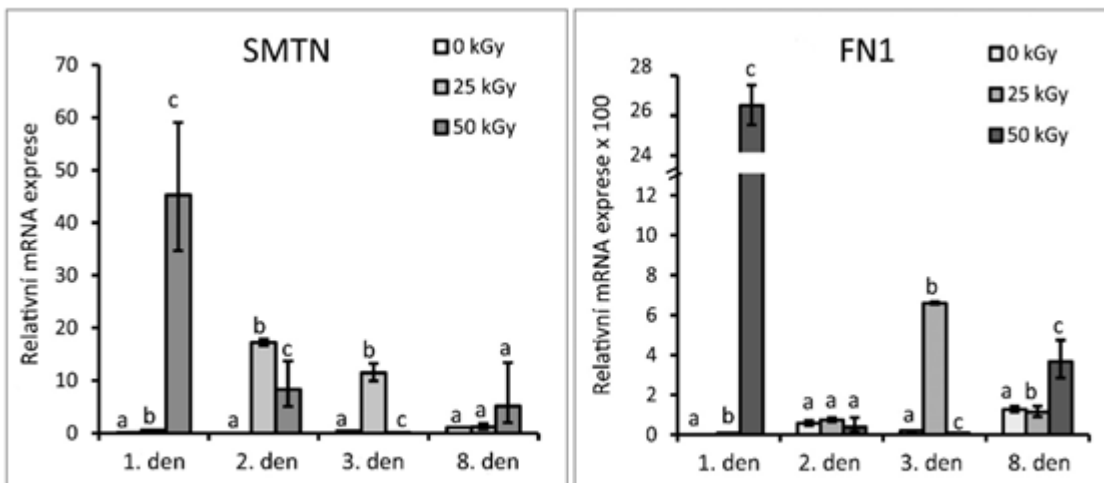
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

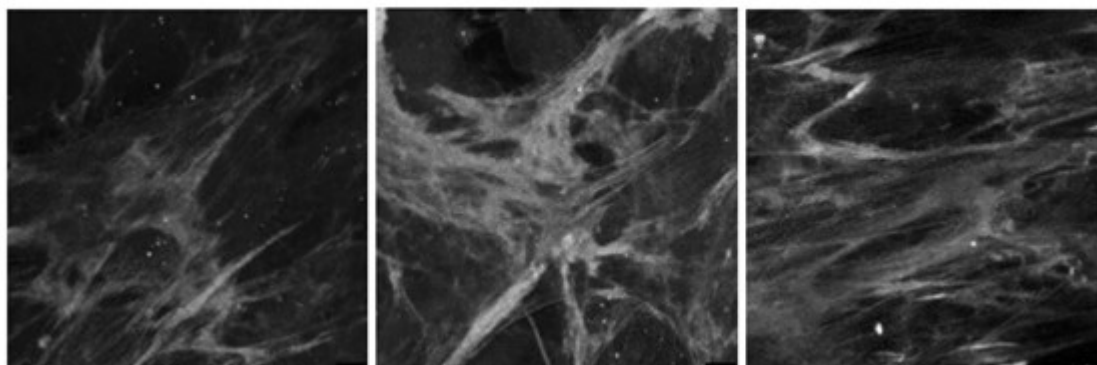


Obr. 5

A

B

C



Obr. 6