

# Testování biokompatibility materiálů

Jiřina Medalová [jipro@sci.muni.cz](mailto:jipro@sci.muni.cz)

# Co všechno lze nahradit??

## Organické náhrady

- Kůže a kožní deriváty
  - Kůže, Vlasy, zuby, boltce, nos
- Orgány
  - ledviny, srdce, játra, plíce, pankreas, penis
- Tkáně
  - Rohovka, mozková plena, céva, kost, šlacha, srdeční chlopeň, končetina, prst
- Buňky
  - Kostní dřeň, naprogramované T buňky, spermie, vajíčka



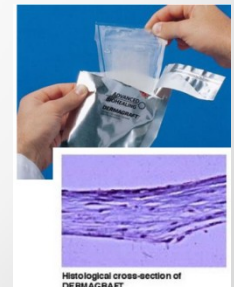
## Neorganické náhrady

- Falešné oko
- Kloub, kost
- Končetina, prst
- Zub
- Cévní stent
- Meziobratlová ploténka
- Srdeční chlopně



## Kombinace buněk a neorganických nosičů - biomateriálů

- Kůže
- Cévy
- 3D modely tkání osídlené buňkami (srdce, ledviny...)

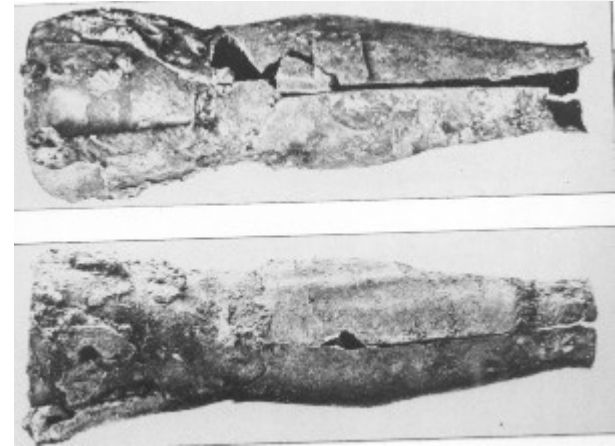


# Historie - Náhrady končetin, zubů

800 př.n.l Egypt



300 n.l Itálie



<https://epochaplus.cz/egyptske-protezy-palcu-u-nohy-obstoji-i-v-dnesni-konkurenci/>

2500 př.n.l. Mexiko



1500 n.l. Japonsko



<http://www.lpdental.cz/p91/prvni-zubni-nahrady>

# Umělé náhrady

- 1938 - První totální náhrada kyčelního kloubu
- 1940 – Zavádění polymerů do medicíny
  - PMMA pro nápravu zlomených kostí
  - celulóza pro dialýzu
  - stehy z nylonu
- 1952 – první mechanická srdeční chlopeň
- 1953 – první náhrada cévy z polymerního dacronu
- 1976 – první arteficiální srdce
  
- 1975 - Založení společnosti pro biomateriály

## Vývoj materiálů a cíl dané generace materiálů:

1. generace – od 1950 – inertnost materiálů
2. generace – od 1980 – bioaktivita materiálů
3. generace – od 2000 – obnovení funkčních tkání

GEORG HERMANN VON MEYER (1815-1892)

JULIUS WOLFF (1836-1902)

KARL CULMANN (1821-1881)

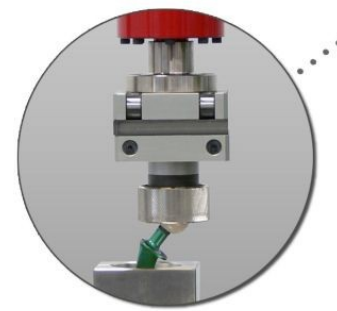
PÁNOVĚ, TEN KARLOV JERÁB PŘENÁŠÍ ZATÍŽENÍ STEJNĚ JAKO KOST!

NIKOLIV, ZAČNĚME OD BŮNKY!

WILHELM ROUX (1850-1924)

NIKOLIV, ZAČNĚME OD BŮNKY!

CHEMICKÉ SLOŽENÍ



1822

WHITE - PRŮJIM ODSTRANĚNÍ KLOUBU

1886

HANSMANN - STABILIZACE ZLOMENIN

1891

GLÜCK - PRŮJIM UMĚLÁ NÁHRADA KLOUBU

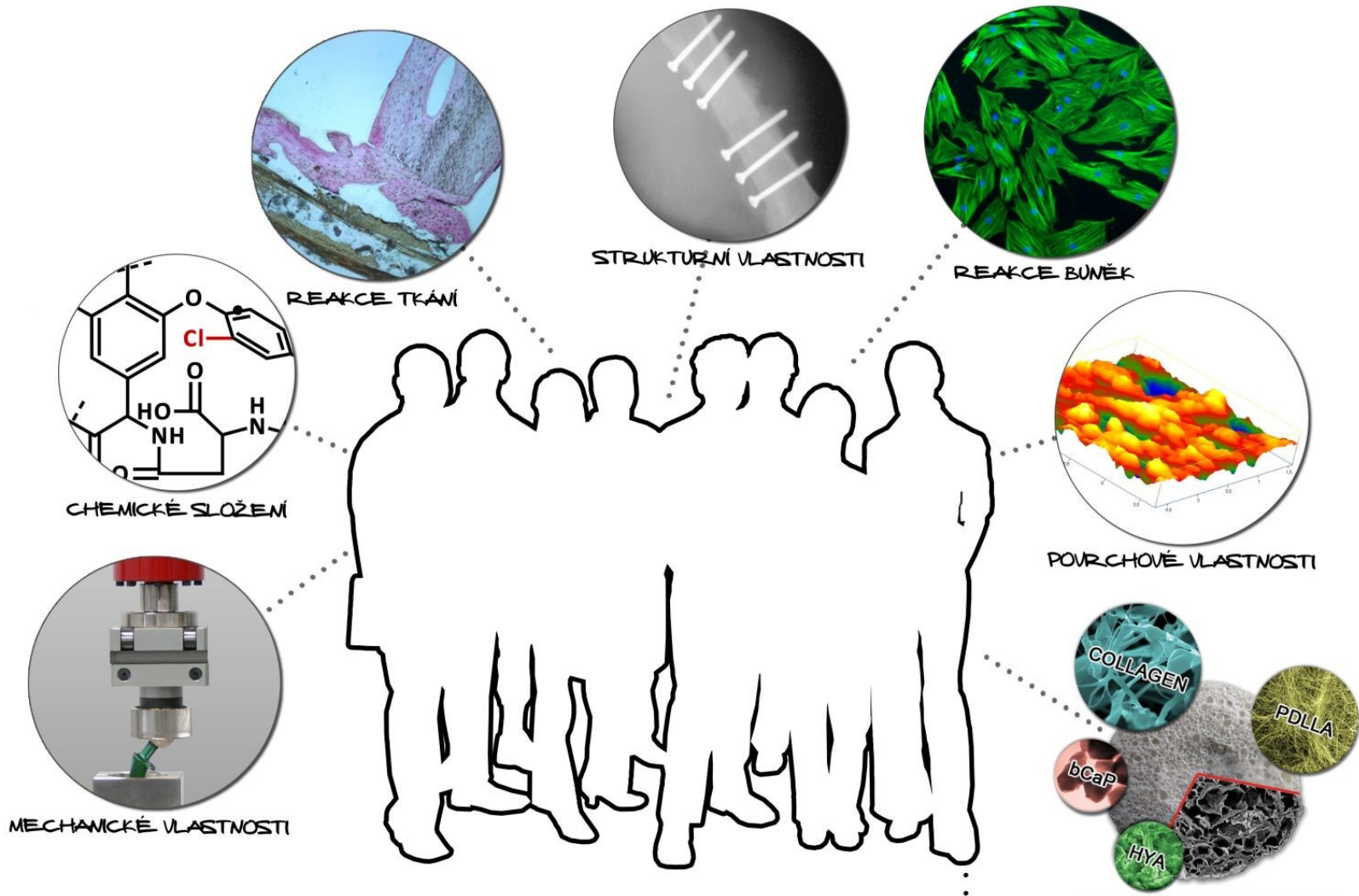
1950+

KOVY A JEJICH SLITINY NERESORBOVATELNĚ A NEBIOAKTIVNĚ

1970+

KERAMIKA A POLYMERY BIOAKTIVNÍ NEBO BIORESORBOVATELNĚ

ROUX



**1950+** ..... **1970+** ..... **1990+** ..... **2019** .....



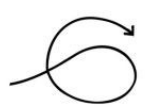
**A JEJICH SLITINY  
RESORBOVATELNĚ  
A NEBIOAKTIVNÍ**



**KERAMIKA A POLYMERY  
BIOAKTIVNÍ NEBO  
BIORESORBOVATELNĚ**



**KOMPOZITY A NANOKOMPOZITY  
BIOAKTIVNÍ A  
BIORESORBOVATELNĚ**



**BIOMIMETICKÉ MATERIÁLY  
TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ  
MATERIÁLY, KTERÉ NAPODOBUJÍ TKÁŇ  
A KOMBINUJÍ SE S ŽIVÝMI BUNĚKAMI**

# Nejpoužívanější materiály

## Biomateriály – Keramika

| <b>Materiál</b>       | <b>Aplikace</b>                                   |
|-----------------------|---|
| Alumina               | Náhrady kloubů                                    |
| Zirkonia              | Náhrady kloubů                                    |
| Fosforečnany vápenaté | Kostní grafty, Povrchové nátěry (vrstvy) u fixací |
| Bioaktivní skla       | Kostní grafty, Povrchové nátěry (vrstvy) u fixací |
| Porcelán              | Zubní implantáty                                  |

# Nejpoužívanější materiály

## Biomateriály – Kovy

| Materiál                                 | Aplikace   |
|--|--|
| 316, 316L<br>Nerezová ocel               | Fixace zlomenin<br>Náhrady kloubů<br>Spinální instrumentace<br>Chirurgická instrumentace |
| Čistý titan<br>Ti-6Al-4V<br>Ti-13Nb-13Zr | Náhrady kostí, kloubů<br>Zubní implantáty  |
| CoCr slitiny                             | Náhrady kostí, kloubů<br>Zubní implantáty<br>Srdeční chlopně                             |
| Slitiny zlata                            | Srdeční chlopně  |



# Nejpoužívanější materiály

## Biomateriály – Polymery

| Materiál  | Aplikace (např.)  |
|---|---|
| Polyethylén (UHMWPE)                            | Jamky pro výměny kloubů                                   |
| Polypropylén                                    | Stehy, MCP klouby   |
| Polytetrafluoroethylén (Teflon)                 | Vaskulární protetika                                      |
| Polyestery                                      | Vaskulární protetika, doprava léčiv, stehy, vazové grafty |
| Polyurethany                                    | Vaskulární protetika, srdeční chlopně, katetry            |
| Polyvinylchlorid (PVC)                          | Katetry   |
| Polymethylmethakrylát (PMMA)                    | Fixace implantátů   |
| Silikonové elastomery                           | Oftalmologie  |
| Hydrogely (např. HEMA)                          | Oftalmologie  |
| Kyselina polymléčná (PLA) a polyglykolová (PGA) | Resorbovatelné materiály, doprava léčiv                   |

# Biomateriály

Žádoucí vlastnosti - biokompatibilita:

dobrá smáčivost, volná povrchová energie,  
povrchový náboj, konstantní drsnost, neimunogenost  
nekarcinogenost, nepyrogenost  
samodegradovatelnost x vysoká stabilita

- musí být sterilizovatelný

- výroba musí být ekonomicky, časově i ekologicky nenáročná

Postup testování - *in vitro* – cytotoxicita (cytokinetické parametry), mutagenita,  
imunogenita

- buněčné kultury – analogická tkáň, buněčné modely

- *in vivo* – pyrogenita, systémová a akutní toxicita, imunogenita  
karcinogenita, mutagenita

- myši → prasátka → lidé

# Biomateriály a plazma

Osteoartritida – kostní implantáty pokryté hydroxyapatitem pomocí plazmy

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28254288>

- CaO-SiO<sub>2</sub> plazmou nasprejovaný na keramiku

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771893>

Kardiovaskulární systém - chlopně s nepřilnavými vrstvami

- hydrogely s imobilizovanými kmenovými buňkami

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25778713>

Intervertebral disc – plazmou naspreovaný titan nebo titan + fosforečnan vápenatý

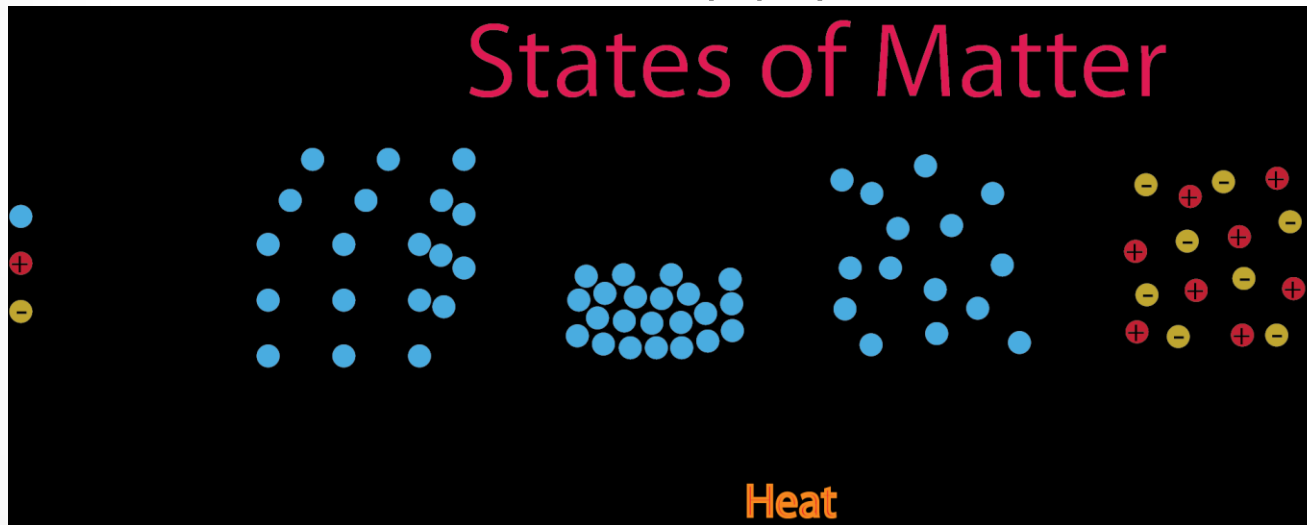
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541680>

Arteficiální cévy - nejrůznější polymery funkcionalizované plazmou

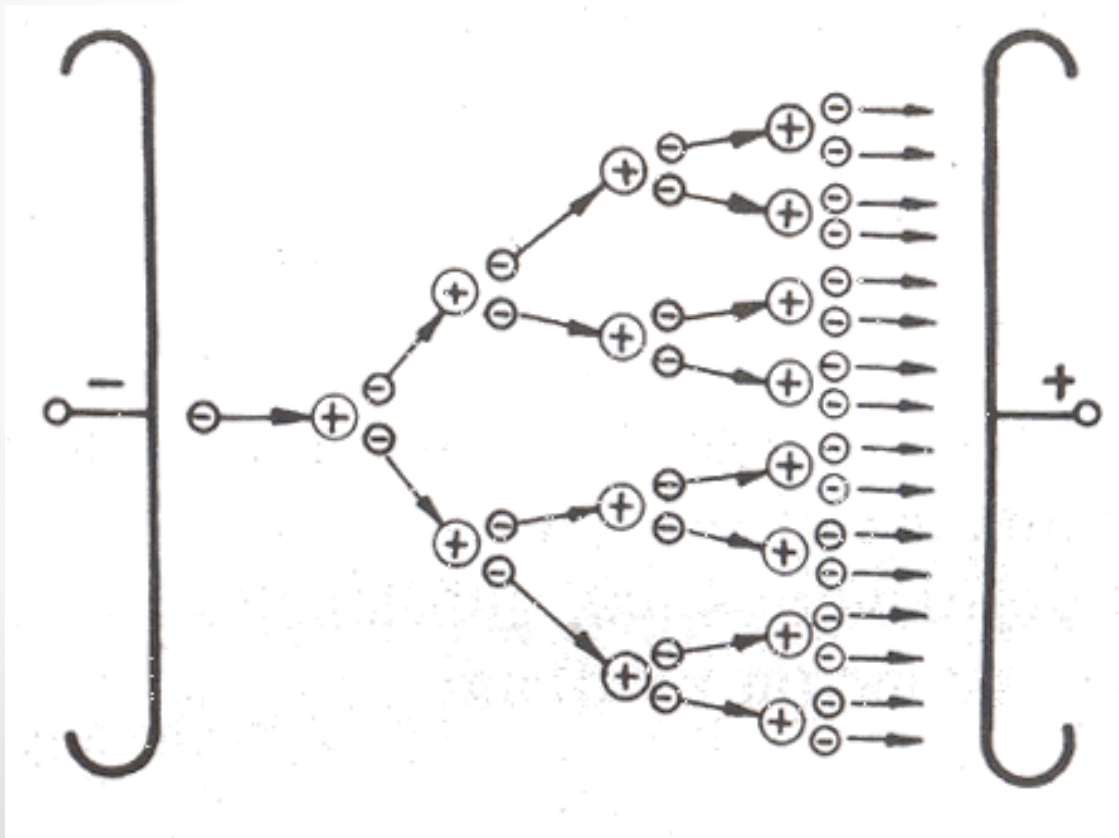
<https://www.mdpi.com/1996-1944/12/2/240>

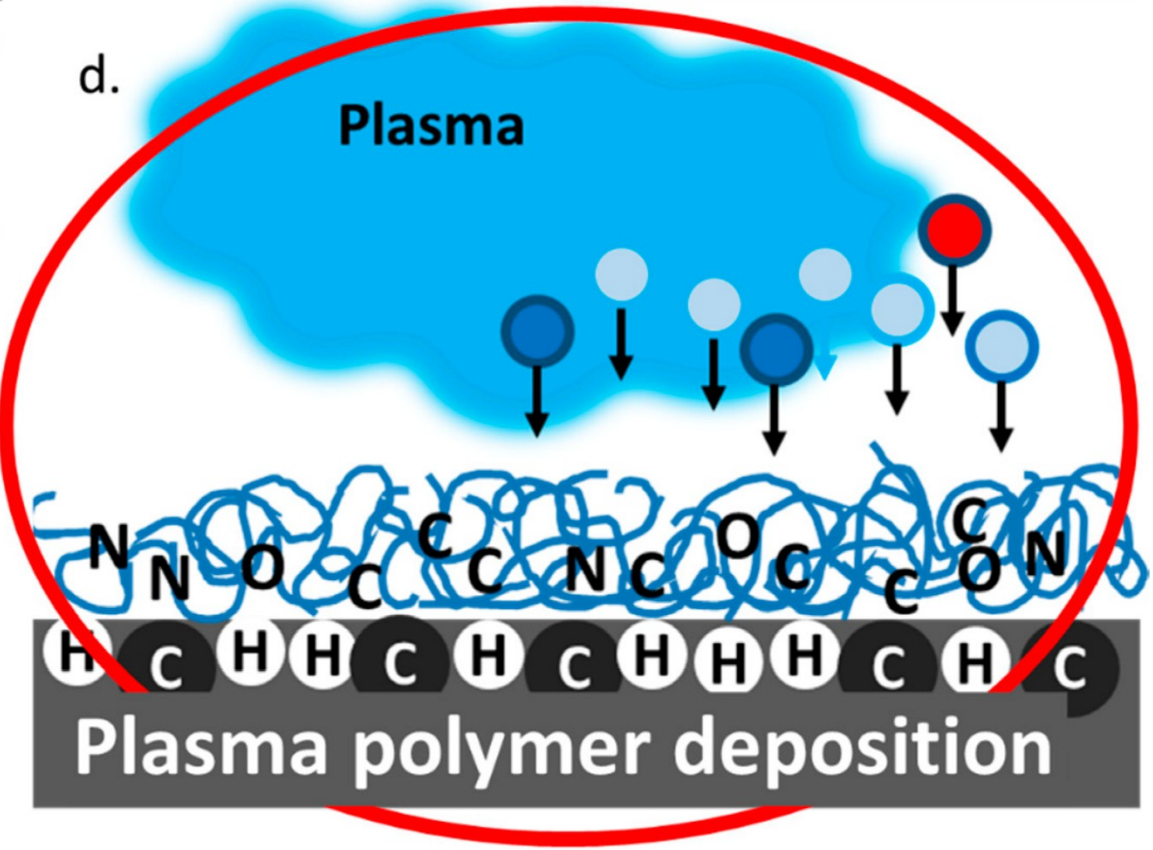
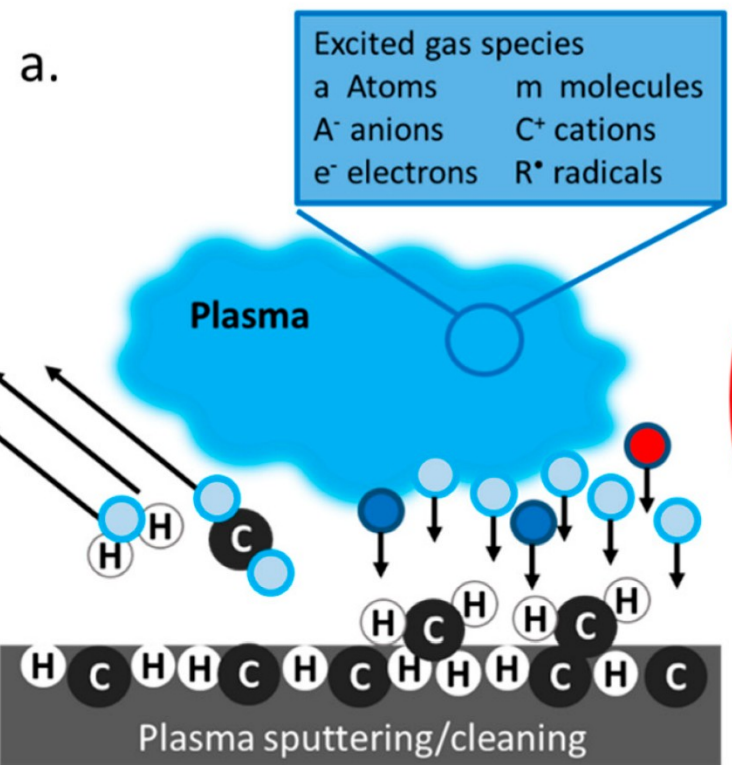
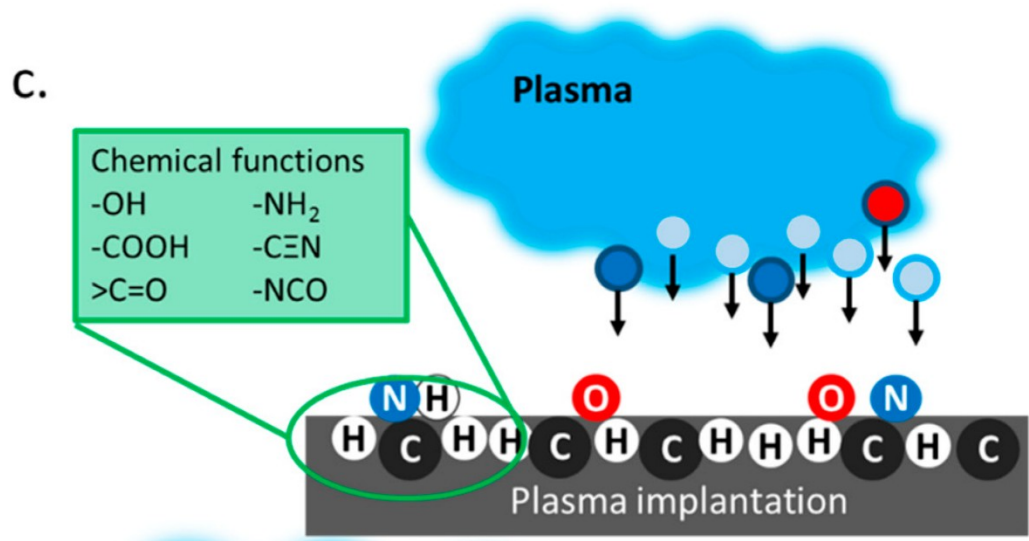
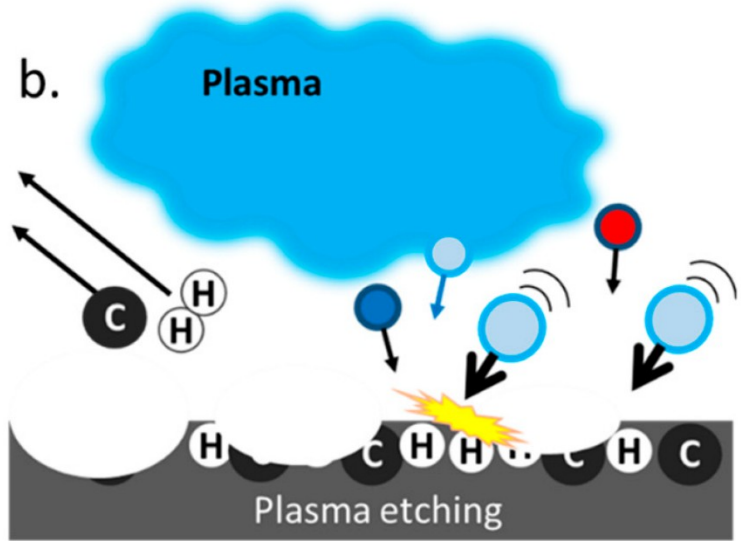
# Plazma

- čtvrté skupenství hmoty
- kvazineutrální ionizovaný plyn

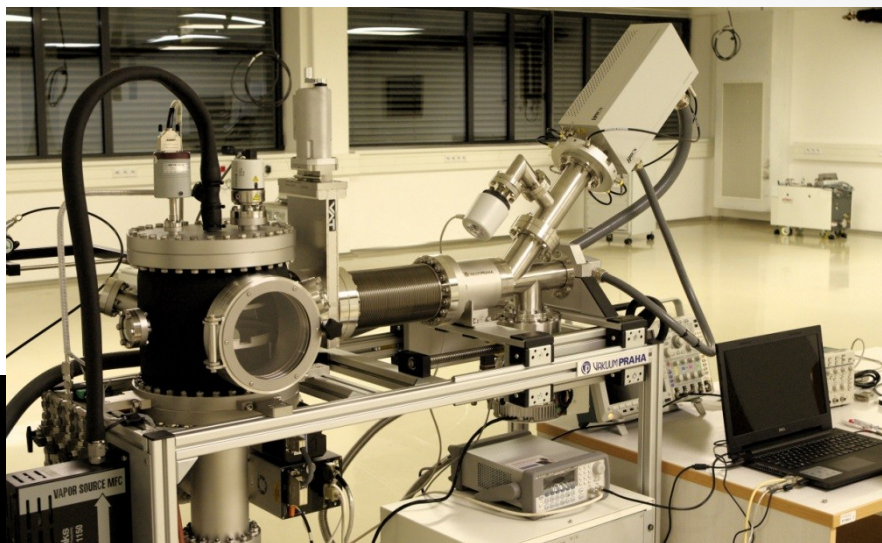


# Plazma elektrických výbojů



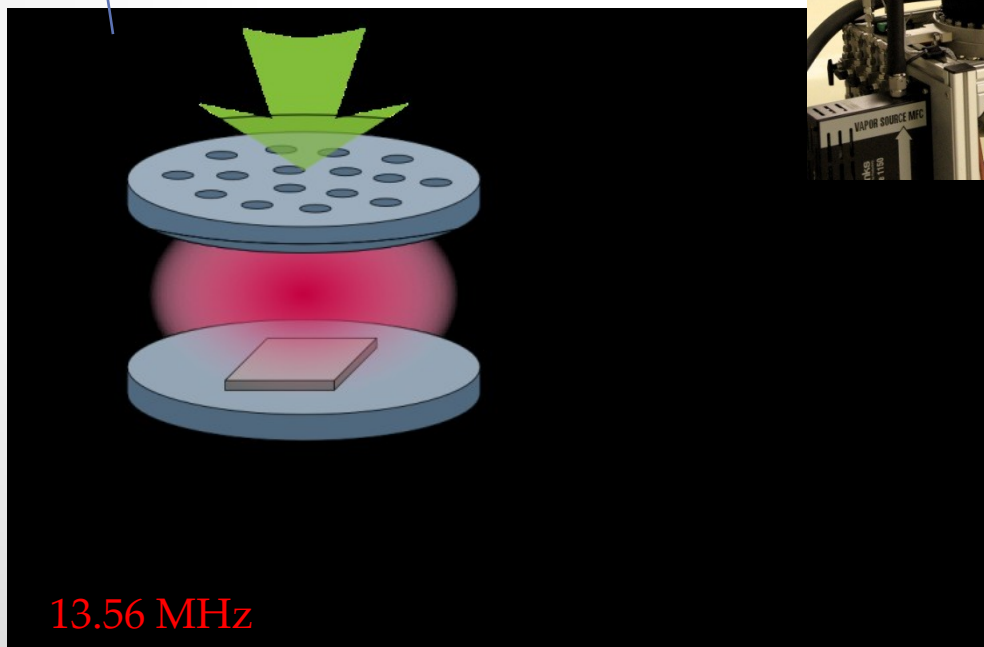


# Plazmová funkcionlizace povrchů



Plazmový reaktor s diagnostickými metodami  
pro měření

Cyclopropylamine + Ar

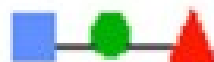


13.56 MHz

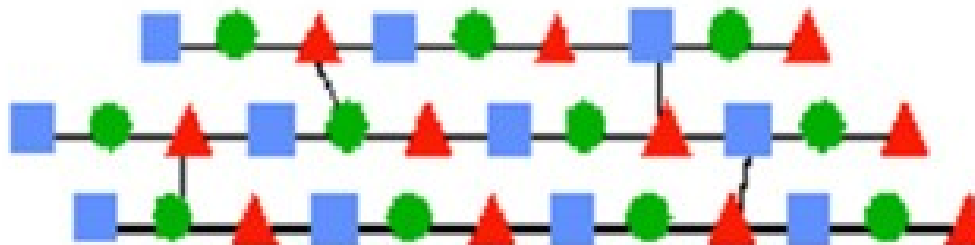
Schéma kapacitně vázaného plazmového výboje

# Plazmová polymerace

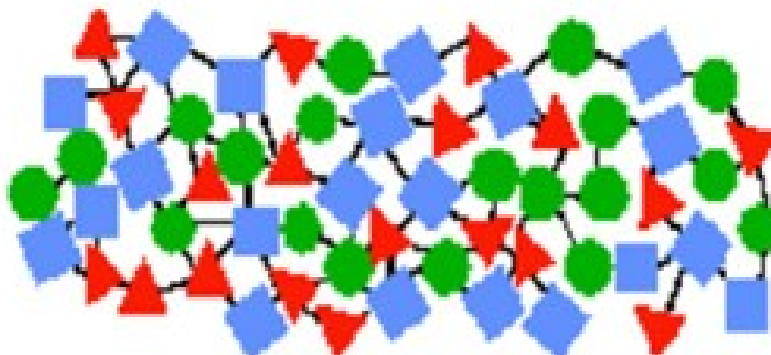
monomer



klasický polymer

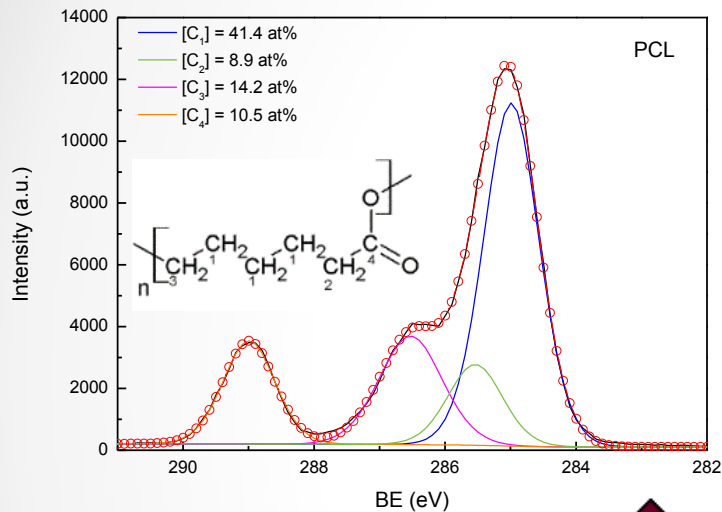


plazmový polymer



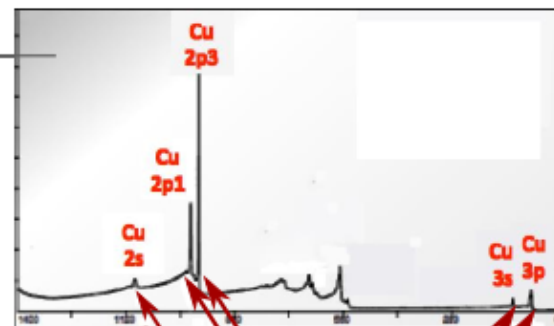


# X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)



## Photoemission of Electrons

**XPS spectrum**  
area under the peaks is related to the amount of each element present



**X-ray source**

**X-rays**

**photoelectron**  
knocked free by X-rays,  
higher energy level equals less binding energy



# Testování biomateriálu

## 1. Adekvátní modelová linie

- Kůže – fibroblasty, keratinocyty, melanocyty
- Céva – endoteliální buňky, b. hladké svaloviny
- Krevně-mozková bariéra – endoteliální buňky, astrocyty

## 2. Typ kultivace

- 2D monokultura
- 2D kokultivace
- 3D monokultura
- 3D kokultivace
- [Organ-on-chip](#)
- Organismus-on-chip

## 3. Testování kompatibility

- Biokompatibilita – testování cytokinetických parametrů + mutagenity
- Imunokompatibilita – testování aktivace imunitního systému

# Proliferace

## Jak růst v přítomnosti nového materiálu ovlivní růst buněk?

- Kvantifikace ATP – čím více ATP v buněčném lyzátu, tím více buněk tam bylo
- Metabolická aktivita – kvantifikace barevného nebo fluorescenčního produktu metabolismu
  - Formazánové metody – do média se přidá tetrazoliová sůl (MTT, WST1, XTT, MTS), která je činností mitochondriálních enzymů redukována na barevný formazán
  - Resazurin – resazurin je dehydrogenázami redukován na červeněfluoreskující rezorufin
  - Calcein AM – esterázy odštěpí acetoxymethyl ester a calcein začne fluoreskovat (a není už prostupný pro membránu)
- Přímé nabarvení buněk – nafocení povrchu a spočítání b. pomocí ImageJ <https://imagej.net/Fiji/Downloads>
  - DAPI, Hoechst – barviva, která prostupují membránu

# Buněčná smrt

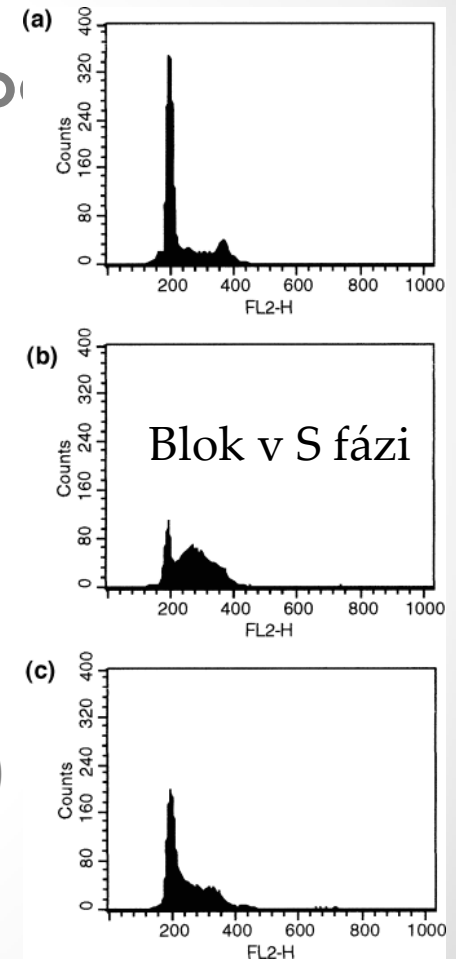
Na testovaném povrchu je méně buněk, pro

## 1. Umírají – apoptóza

1. Annexin V (zvýšení koncentrace fosfatidylserinu na vnější straně membrány)
1. DNA žebřík (štěpení DNA mezi nukleosomy)
2. 7-Aminoactinomycin D barvení (živé, umírající a mrtvé b.)
3. Štěpení caspáz, PARPu

## 2. Nerostou

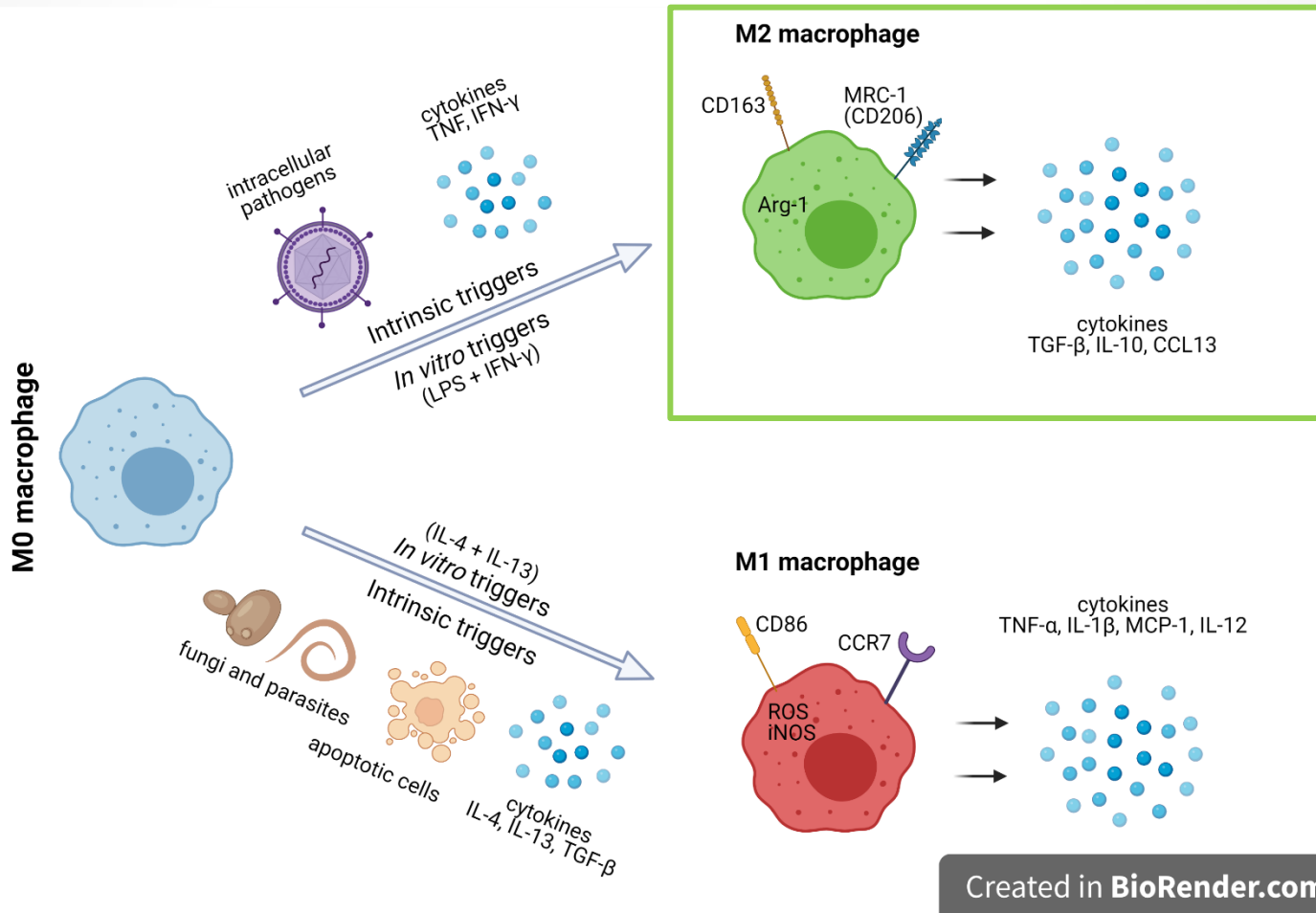
1. Blok v průchodu buněčného cyklu (Vindelovův roz., DAPI)
2. Spadnou do G0
3. Diferencují??



# Diferenciace

- Diferenciace bývá často doprovázena poklesem proliferace
  - Kožní buňky – ↑Keratin 1, ↑10, ↑Involukrin, ↑E Cadherin
  - Endoteliální buňky – při *de novo* tvorbě z kmenových buněk se zvyšuje exprese markerů – Pecam1, VWF, KDR, CD34 a VE Cadherin
  - Fibroblasty – ↑ $\alpha$ SMA, ↑collagen 1 – aktivace do myofibroblastů
  - VSMC – ↑ $\alpha$ SMA v kontraktilní fázi, ↑collagen 1 – přechod do syntézní fáze
- Detekce qRT-PCR nebo průtoková cytometrie

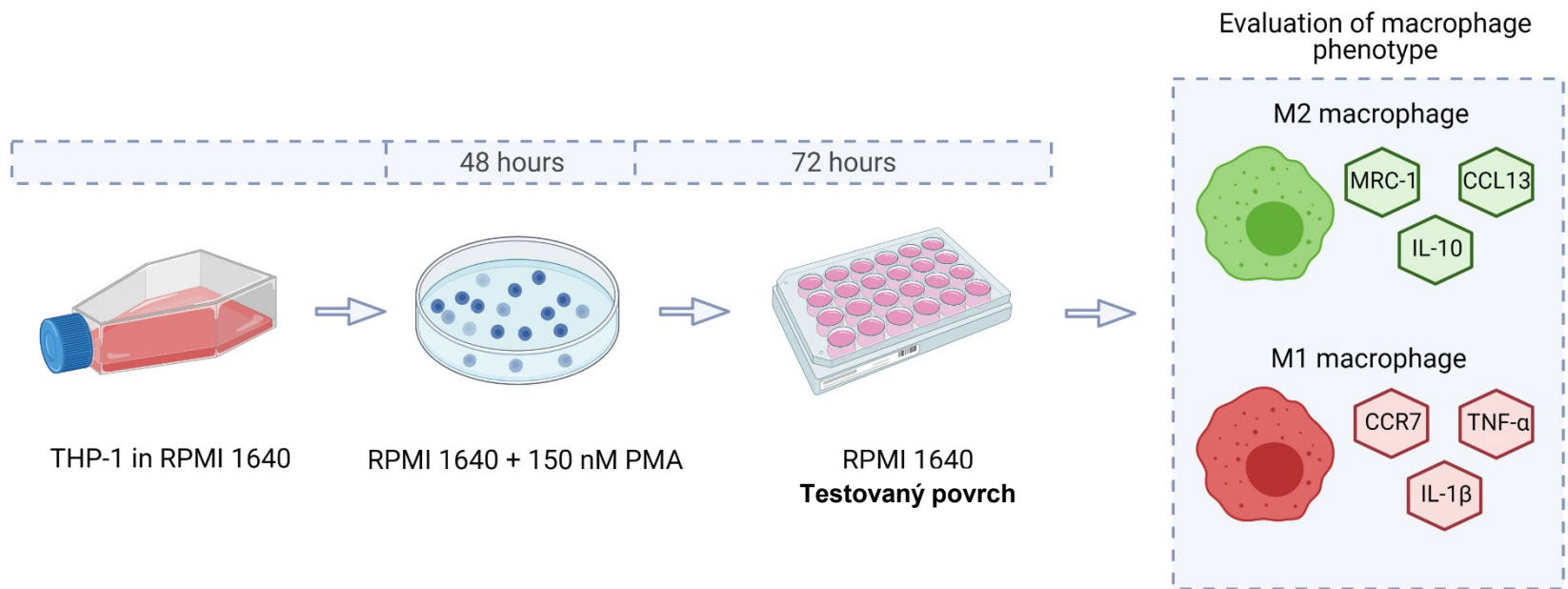
# Imunokompatibilita



By Jana Bartošíková

Testujeme reakci makrofágů na daný materiál – prozánětlivá (nežádoucí)  
- proregenerační (žádoucí)

# Postup



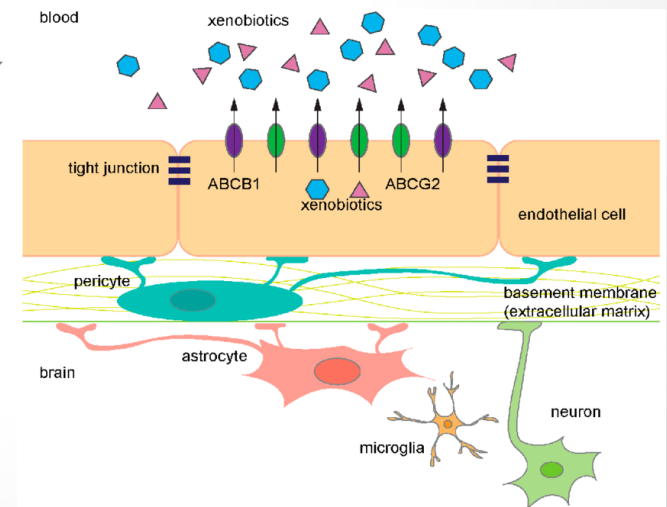
Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

By Jana Bartošíková

- Vyhodnocení exprese cytokinů
  - ELISA assay – ukotvení cytokinu v sendviči protilátek a jeho kvantifikace
  - qRT-PCR – detekce počtu mRNA pro jednotlivé cytokiny

# Kokultivace buněk

- Model cévy – různé uspořádání
  - buňky na protějších stranách membrány
  - Směsná populace na jedné straně membrány
  - Jedny buňky na dně jamky, druhé na membráně
- Kokultivace vede ke snížení proliferace VSMC buněk, patrně vlivem TGF
- Model krevně-mozkové bariéry
  - Důležitá je tvorba **konfluentní** monovrstvy endoteliálních buněk
    - [XCELLigence](#) – zvýšení impedance při zvýšení konfluence
  - Analýza exprese ABC transportérů
    - qRT-PCR (MDR1, MRP1, BCRP)
    - Dye exclusion assays



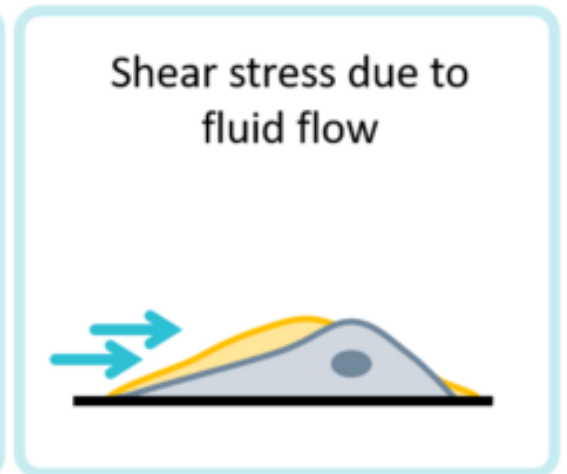
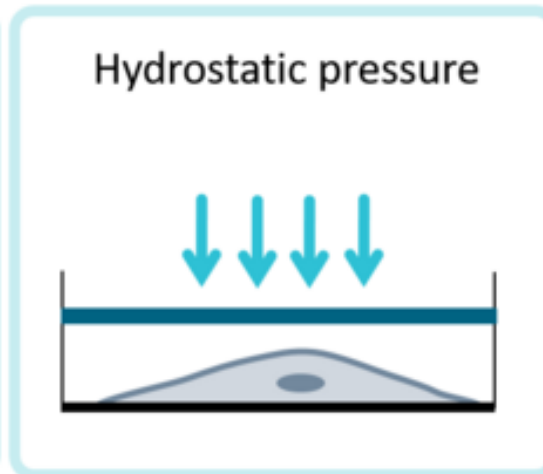
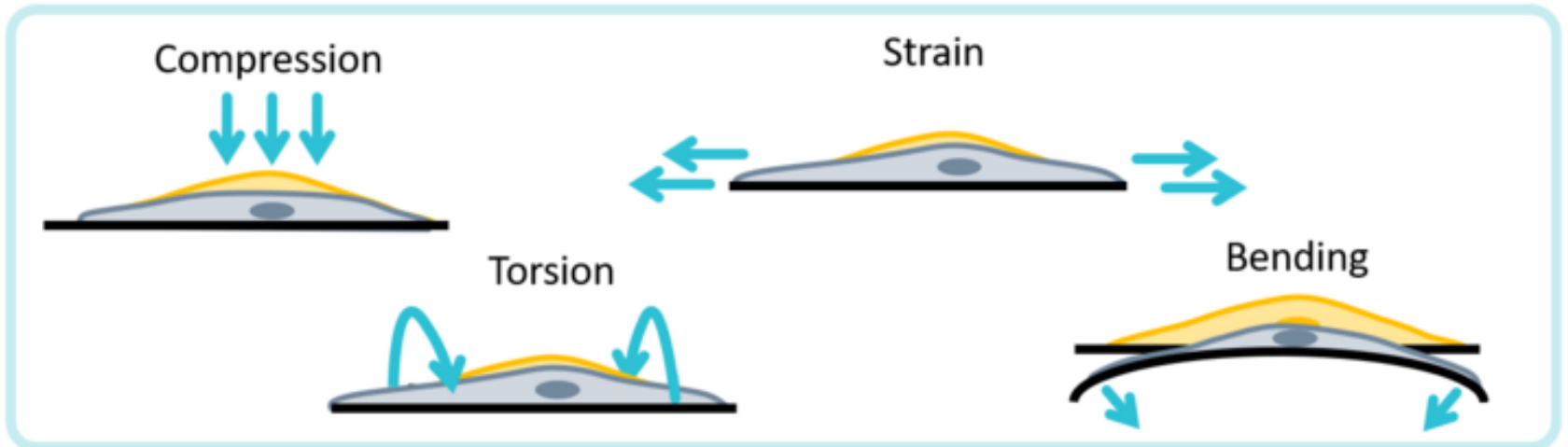
<https://www.youtube.com/watch?v=FcvDvCXyF4k>

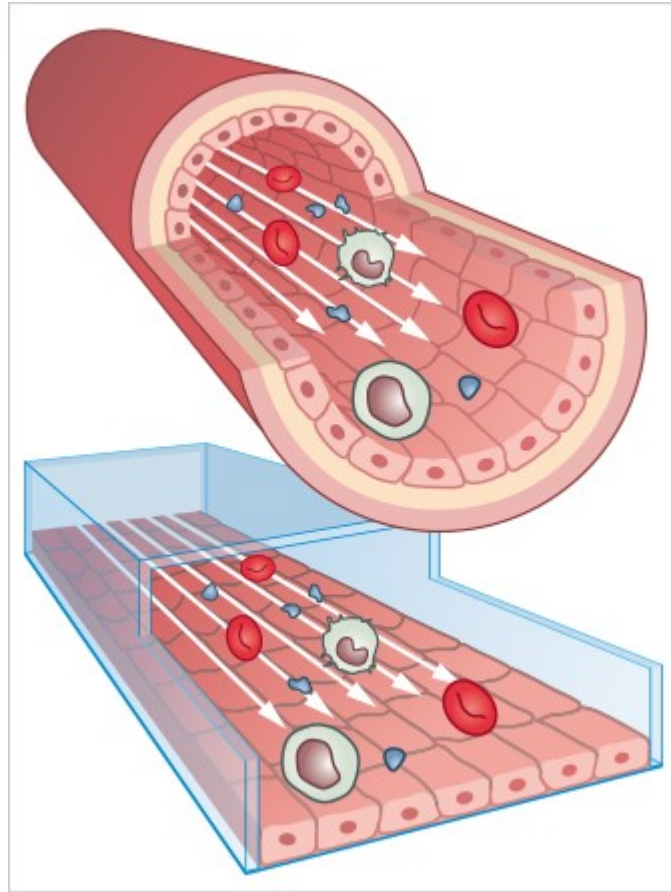
<https://www.youtube.com/watch?v=3s8zQKH0sOI>

[https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-the-components-in-the-blood-brain-barrier-BBB-ABCB1-purple-and-ABCG2-fig1\\_321322613](https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-the-components-in-the-blood-brain-barrier-BBB-ABCB1-purple-and-ABCG2-fig1_321322613)



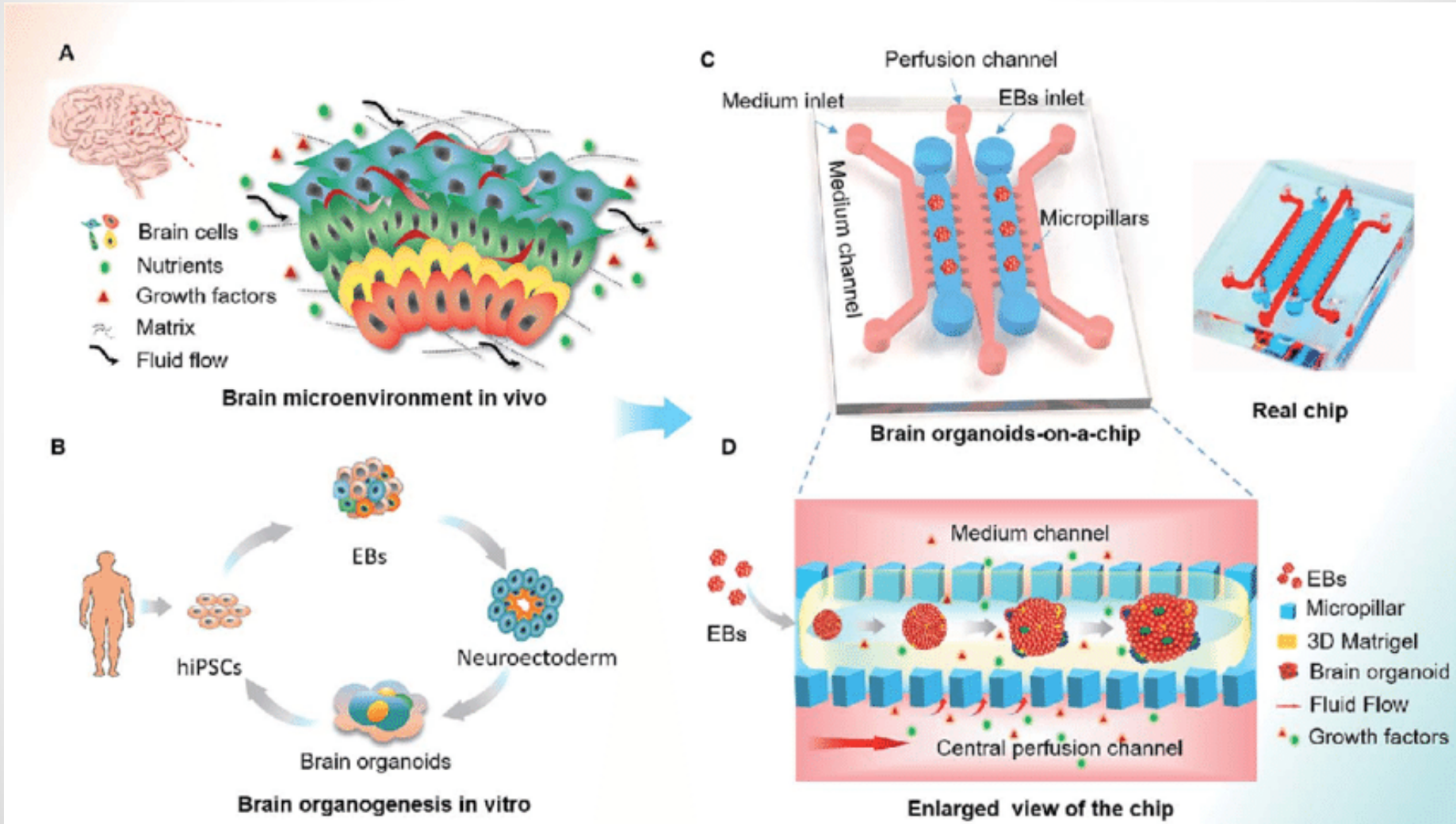
# Dynamická kultivace





<https://ibidi.com/content/303-why-cell-culture-under-flow>

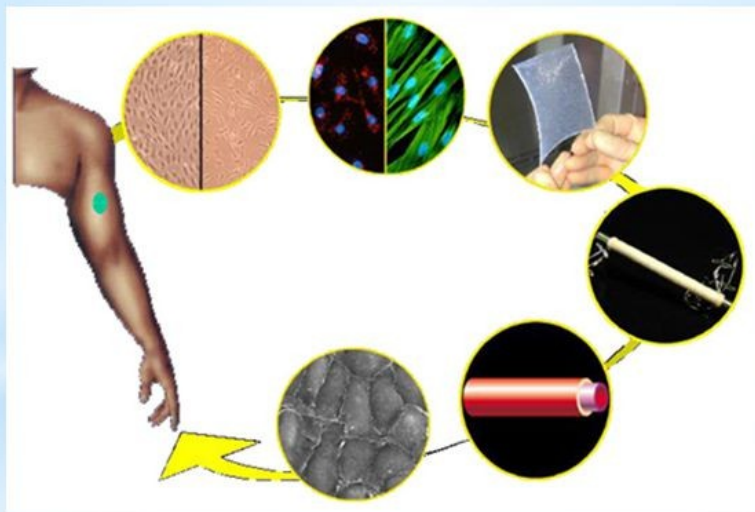
# Brain-on-chip



# GAČR projekt: Plazmové polymery připravené na nanovláknenných membránách pro inženýrství cévní tkáně

Povrchy tvořené polykaprolaktonem spřádeným do nanovláken a funkcionalizované aminy jsou vhodnými nosiči pro náhrady cév

## Cévy vyrobené v laboratoři

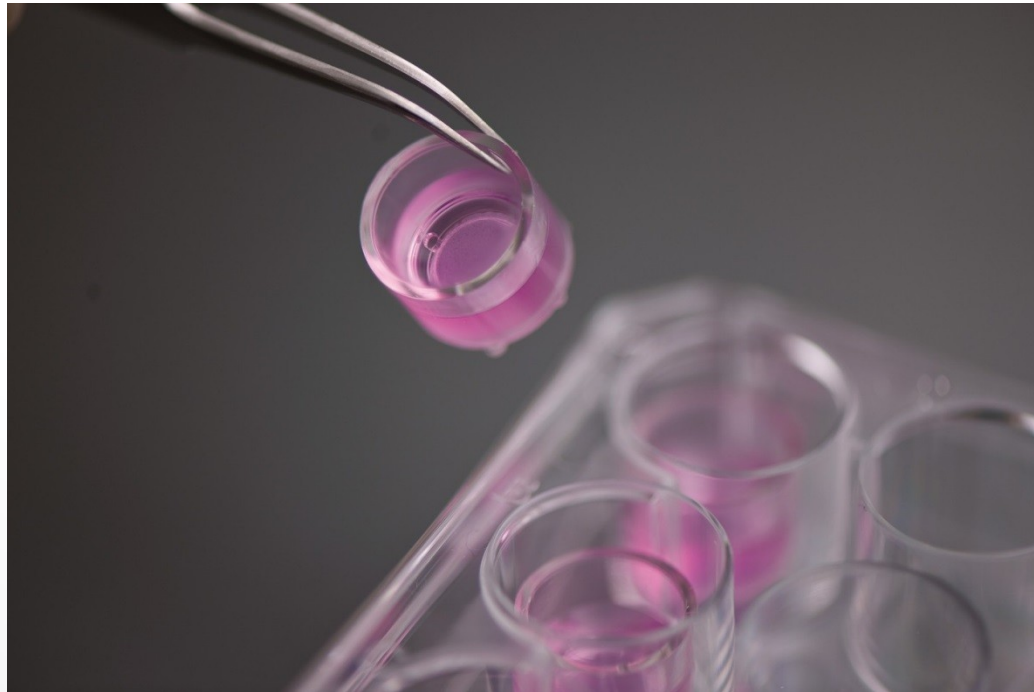


Postup výroby cévní náhrady. Céva je vypěstována z pacientových kožních buněk, z kterých nejprve naroste „plachta“ a ta se pak sroluje do trubičky. Do nitra základu nové cévy se usadí buňky endotelu

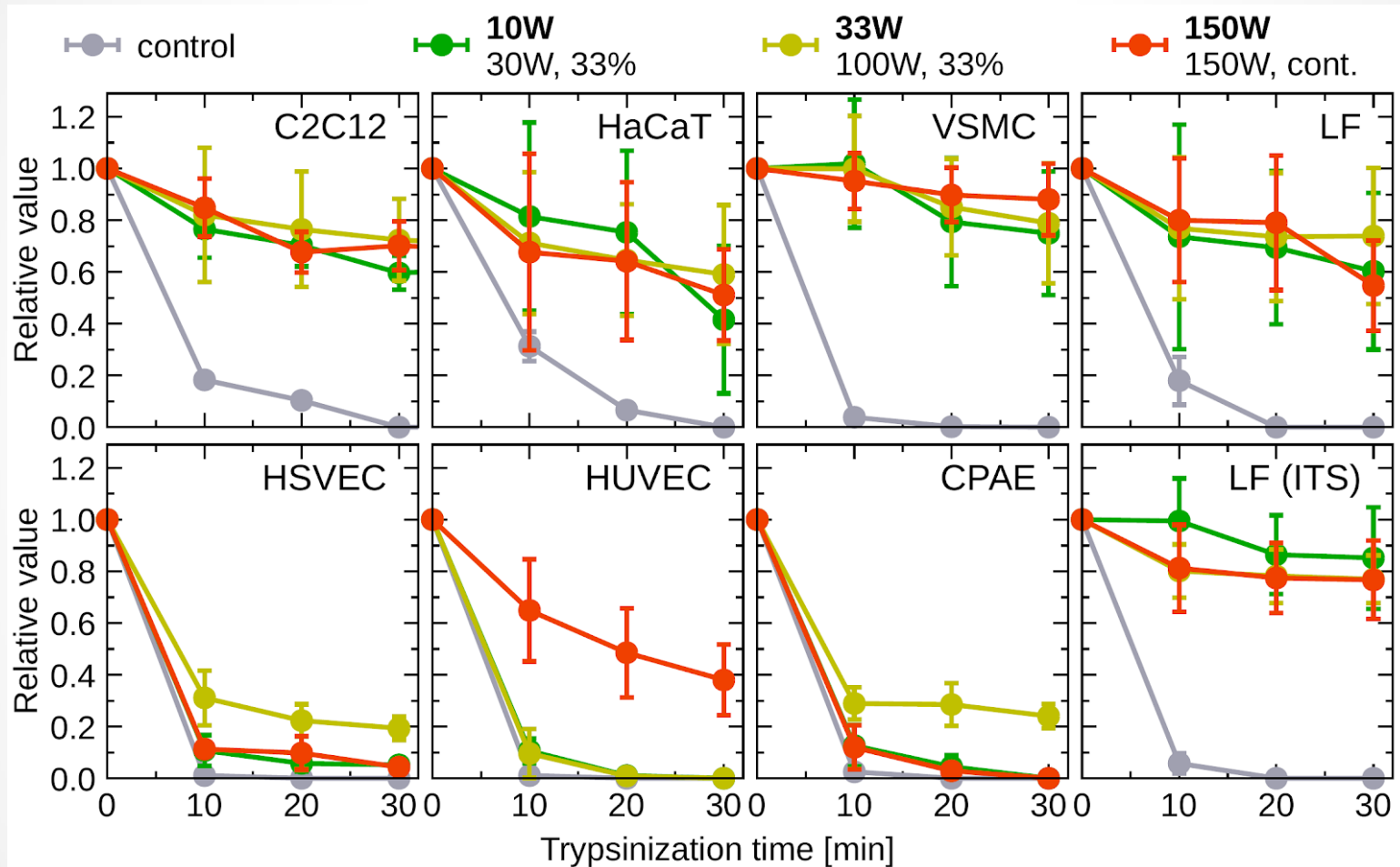
- **Plazmatem aktivovaný cyklopropylamin vytváří aktivní aminové (+) funkční skupiny na povrchu polystyrenových misek a nanovláknenných membrán z polykaprolaktonu**
- Hlavní změna fenotypu buněk - **zvýšení odolnosti vůči trypsinu**
- Studované buněčné linie
  - Myoblasty kosterní svaloviny (C2C12)
  - Keratinocyty (HaCaT)
  - Fibroblasty (LF)
  - Buňky hladké svaloviny z cévy (VSMC)
  - Endotelové buňky (HUVEC, HSVEC, CPAE)
- 3 studované povrchy - 10 W, 30 W a 150 W
  - Petriho misky
  - nanovláknna z polykaprolaktonu
- Imunologická odpověď – RAW makrofágy + ELISA
- Kokultivace endotelových buněk a VSMC

# Membrány

- Cell crowns (Scaffdex) – s membránami v 24 W desce  
- nejsou průsvitné, nutné fluorescenční barvení

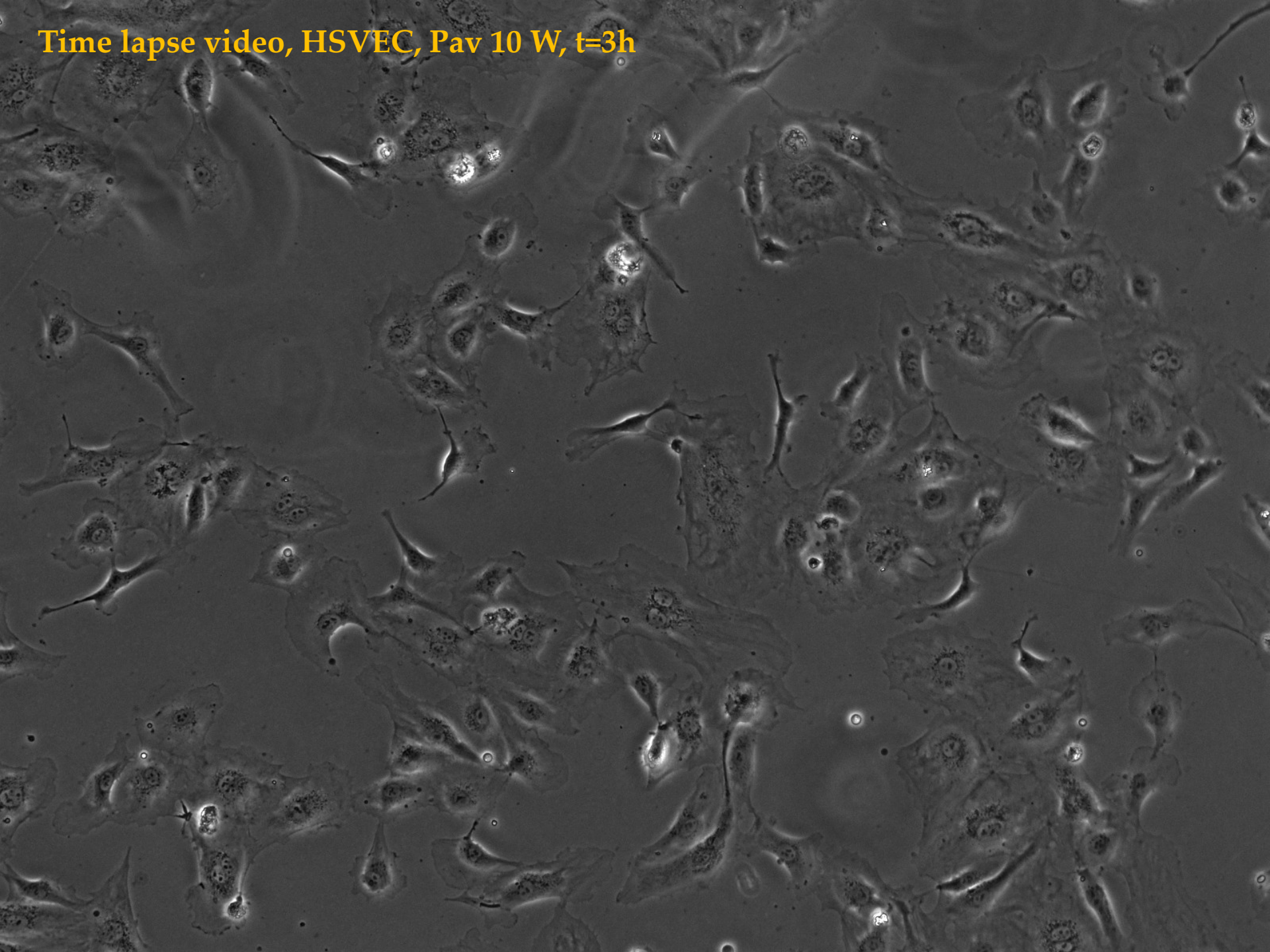


# Odolnost buněk vůči trypsinu



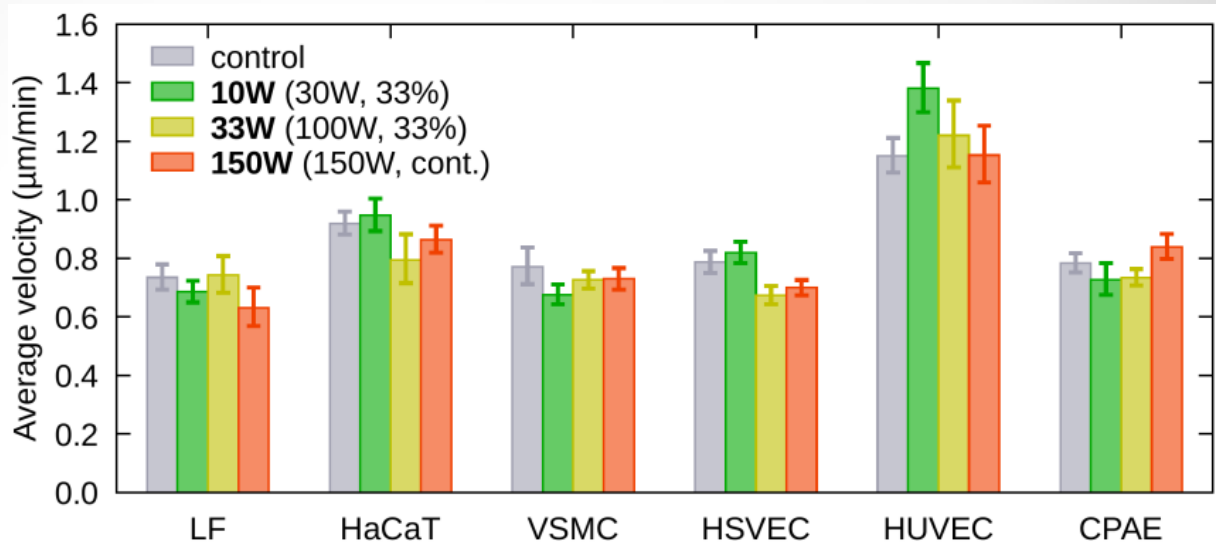
P. Černochová, et al. 2020, Cell type specific adhesion to surfaces functionalized by amine plasma polymers, Scientific Reports (in revision)

Time lapse video, HSVEC, Pav 10 W, t=3h

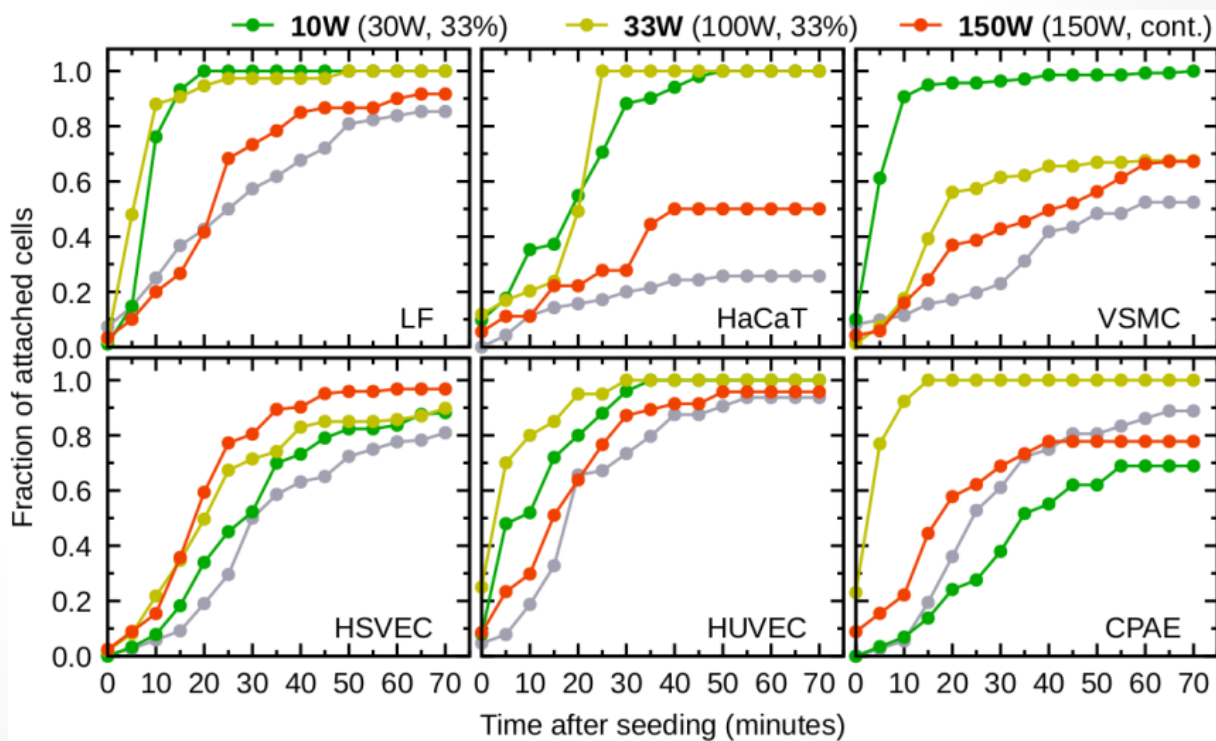




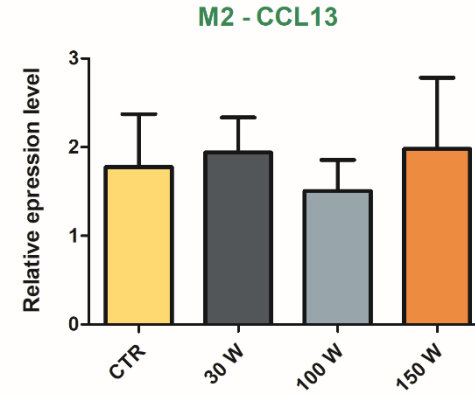
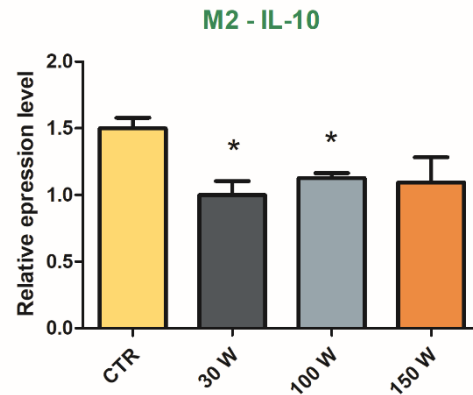
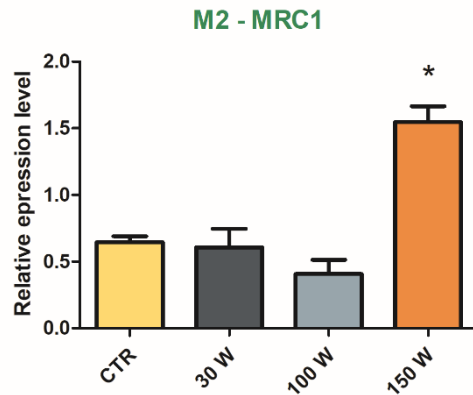
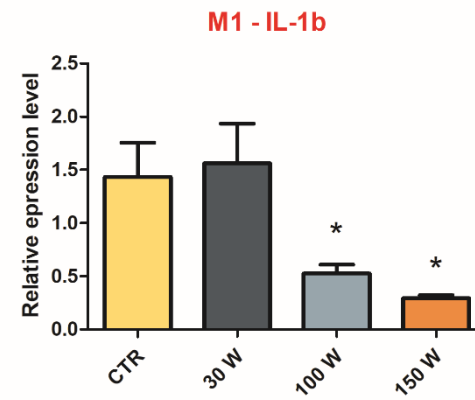
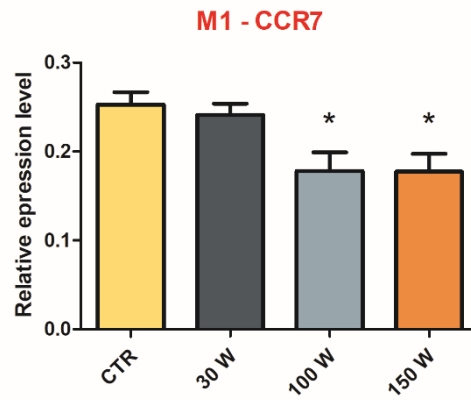
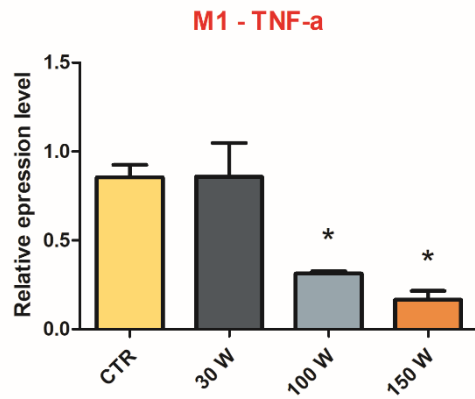
Rychlost pohybu



Rychlost přisedání



# Imunokompatibilita CPA membrán



# Shrnutí 2D testování PCL membrán s aminovými skupinami

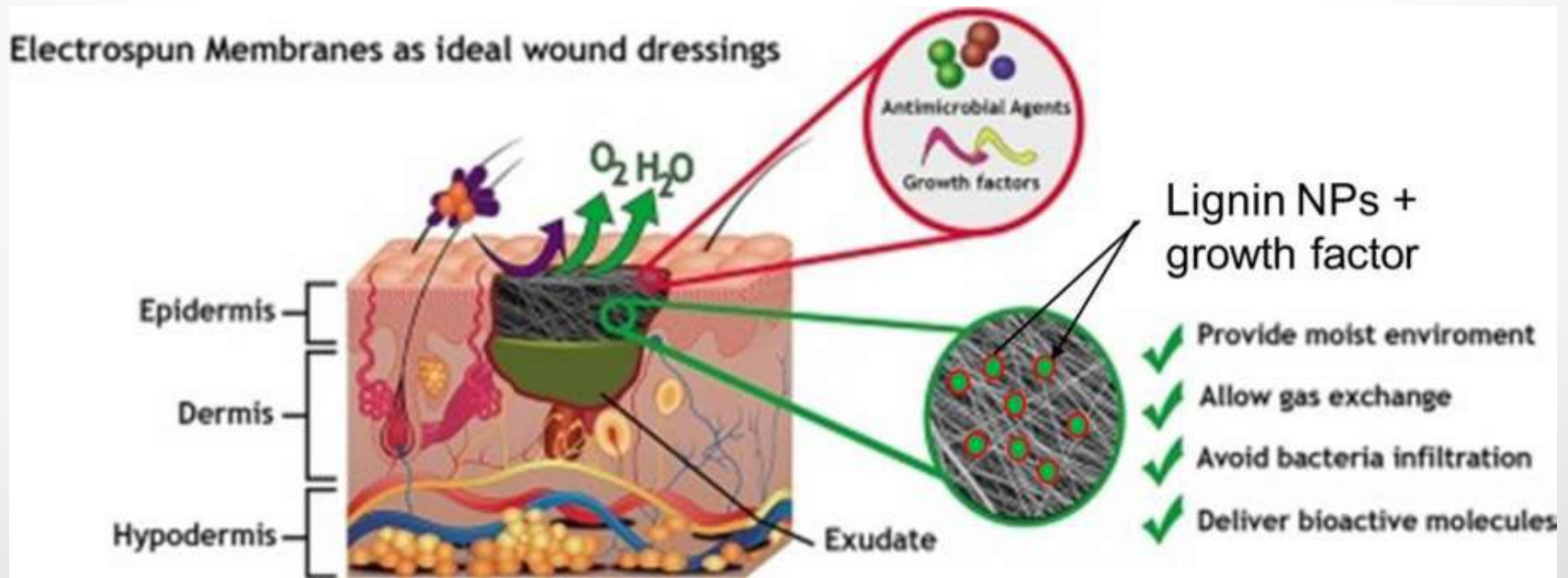
- Indukují vysokou adhezi neendoteliálních buněk
- Buňky na nich mírně zpomalují proliferaci
- Buňky neumírají, nediferencují
- Cytokinetické parametry jsou nejstabilnější při kultivaci na 100W membráně
  
- M2 proregenerační fenotyp makrofágů nejlépe indukuje vrstva 150W a hned za ní 100W
  
- **Pro další testování je nejvhodnější membrána 100W**

# Lignp4Wound

M-ERA.NET grant: Antibacterial breathable wound dressing based on polymer electrospun nanofibers

**Membrány z nanovláken polykaprolaktonu jako obvazy na chronické rány**

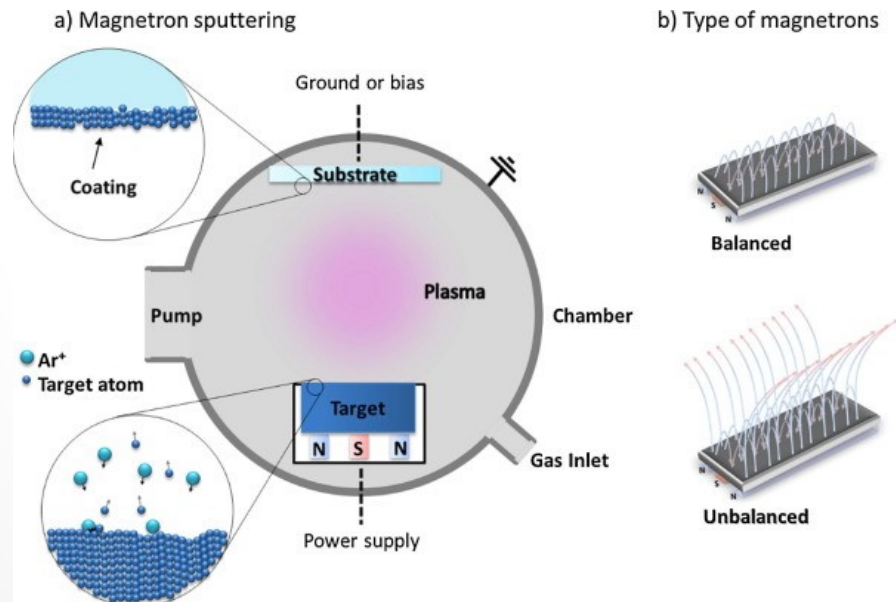
- S naspreovanými solid lipid particles (SLPs) obsahujícími antibiotika - tetracyklin a gentamicin
- S naspreovanými nanočásticemi ligninu
- Modifikace přidáním růstových faktorů a chitosanu



# COOH funkcionalizace

GAČR projekt: Plasma and ion-implantation processing of microporous polymer nanomaterials for bioapplications

- plazmou modifikované PCL membrány s záporně nabitými COOH funkčními skupinami
- Posílení antimikrobiálních účinků nanostříbrem naprášeným magnetronem
- Využitelné buď ke krytí chronických ran nebo jako filtry vzduchu



Velasco et al. 2016

# Chronické rány

Rána, která i přes adekvátní terapii nevykazuje po dobu 6–9 týdnů tendenci k hojení

## Nejčastější chronické rány

- **bércové vředy venózní etiologie** (jsou jedním z projevů chronické žilní insuficience)
- **arteriální kožní vředy** (projev pokročilé ischemické choroby dolních končetin)
- **Dekubity - proleženiny**
- **neuropatické kožní vředy** (jsou jedním z důsledků onemocnění diabetes mellitus)
- **kožní vředy v terénu lymfedému**

- Moderní léčba - vlhká terapie rány
- profesor Winter, v roce 1962 jako první popsal, že udržování rány ve vlhkém stavu urychluje reepitelizaci

- aktivní povrch potlačující infekci a podporující hojení rány

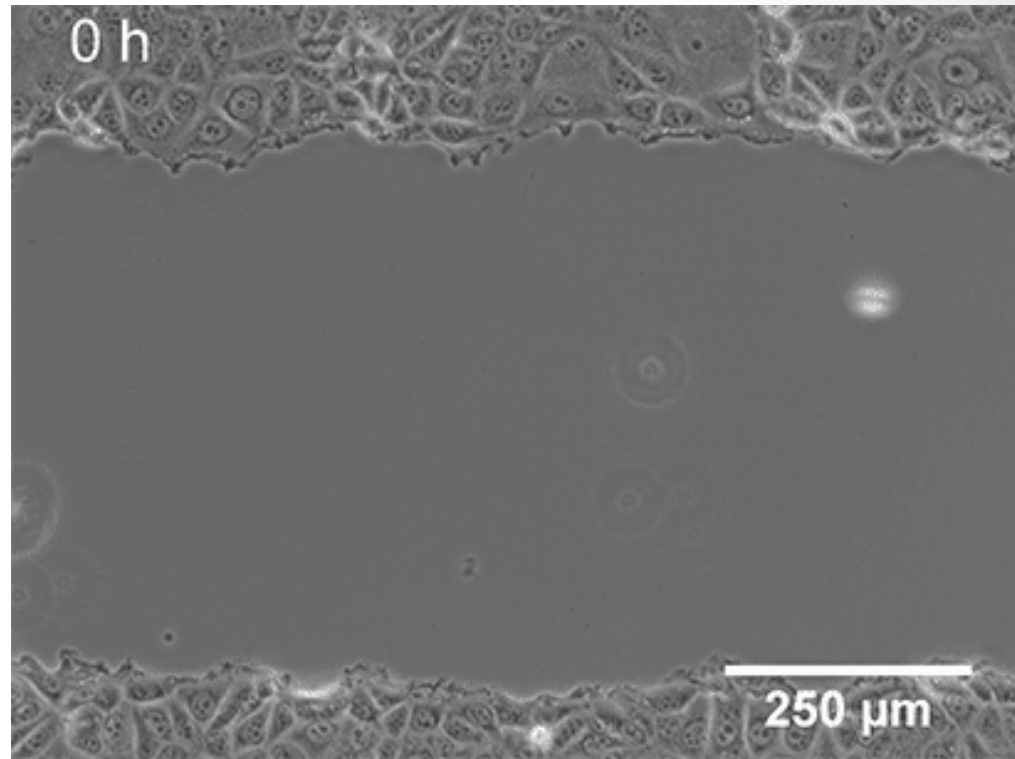


# Wound healing assay

Jak rychle „rána“ zaroste?

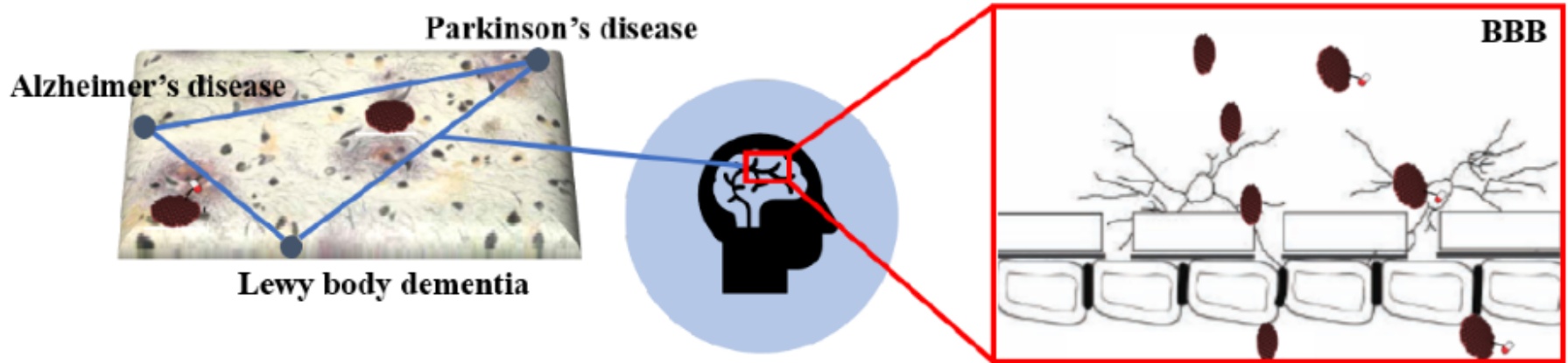
Life imaging microscopy

- Ibidi komůrka na hladkém povrchu
- Buňky v želatině v Ibidi
  - obvaz položen na povrch



# Neuro-PlasGQDs

- Marie-Curie grant: Využití grafenových mikroteček (GQD) k terapii neurodegenerativních onemocnění
- **GQD jsou atomy uhlíku dopované NH<sub>4</sub>, které nejsou toxické, autofluoreskují, prochází krevně mozkovou bariérou, narušují tvorbu peptidových komplexů (alfa synuklein, amyloid beta) a mohou sloužit i jako vektory pro konjugovaná léčiva**
- Teranostika – terapie + diagnostika





# Shrnutí

- Dlouhá a pestrá historie náhrad tkání a orgánů
- Funkcionalizace povrchů vede k širokému spektru vlastností materiálů
- Využití plazmy pro modifikace povrchů
  - Zvýšení adheze, které ovlivňuje i rychlost dělení buněk
  - Některé povrchy mají schopnost aktivovat pro regenerační imunitní odpověď

**PCL s CPA jsou potenciálně využitelné jako nosiče buněk v náhradách tkání a nebo jako funkční krytí ran**

# Spolupráce

- Skupina plazmových technologií na CEITEC (Doc. Zajíčková)

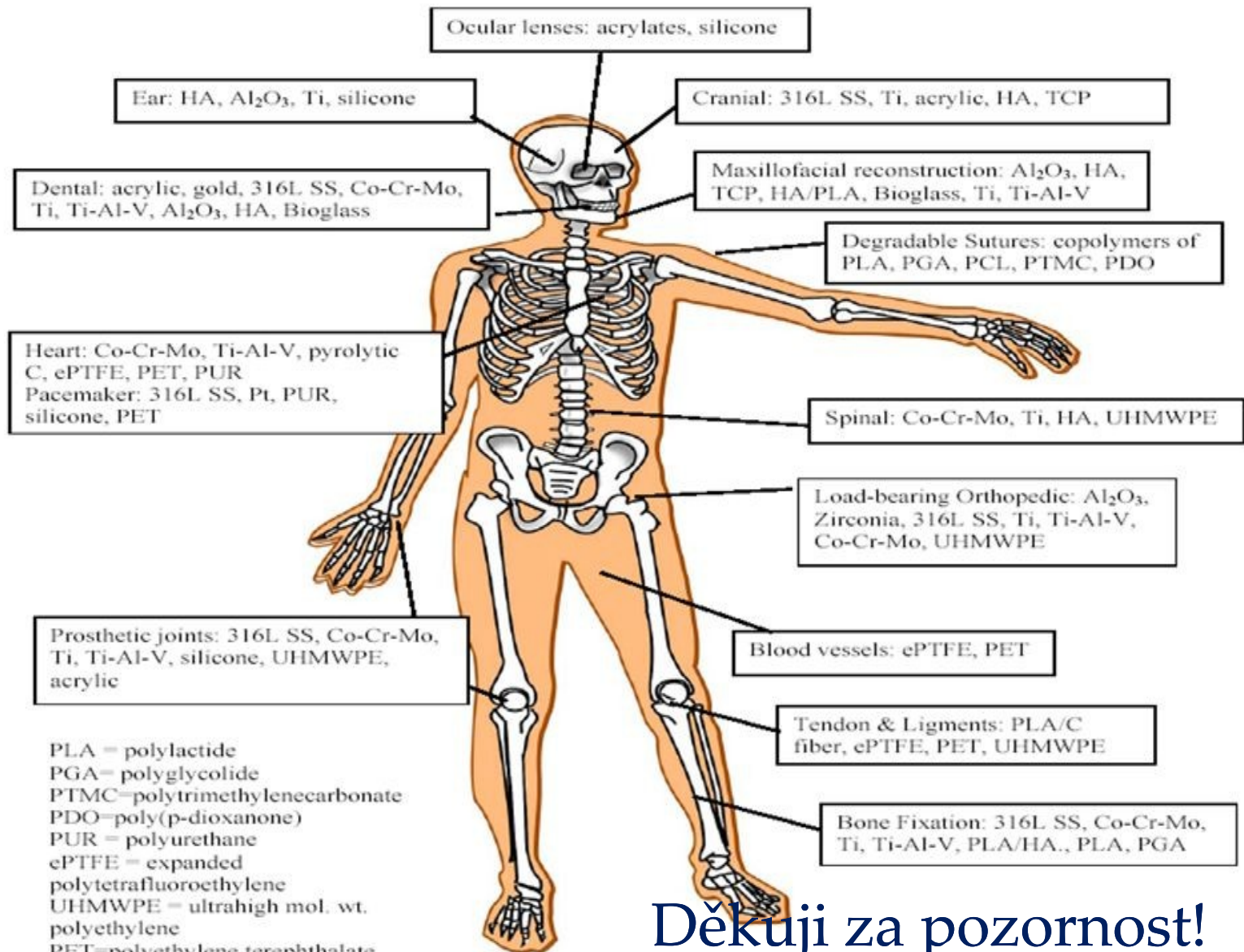
<https://www.ceitec.cz/plazmove-technologie-lenka-zajickova/rg9>

- Biomateriály a tkáňové inženýrství, (FGÚ AVČR, doc. Bačáková)

<http://www.fgu.cas.cz/departments/biomaterialy-a-tkanove-inzenyrstvi?publicationsCount=20>



# Biomaterial Science



PLA = polylactide  
PGA = polyglycolide  
PTMC = polytrimethylenecarbonate  
PDO = poly(p-dioxanone)  
PUR = polyurethane  
ePTFE = expanded polytetrafluoroethylene  
UHMWPE = ultrahigh mol. wt. polyethylene  
PET = polyethylene terephthalate  
HA = hydroxyapatite  
SS = stainless steel

Děkuji za pozornost!  
[jipro@sci.muni.cz](mailto:jipro@sci.muni.cz)