

## TKANIVOVÉ INŽINIERSTVO – BUDÚCNOSŤ MEDICÍNY?

*Jana Dragúňová*

**Abstrakt.** Obyvateľstvo Európy starne. V tomto veku sa začína zhoršovať kvalita života človeka a výrazne stúpa potreba špeciálnej zdravotnej starostlivosti. Jedným zo závažných problémov je i nárast počtu paraplegikov. Preto sa v súčasnej dobe vyvíja nátlak na vývoj takých náhrad, ktoré by umožnili aktívny život do vysokého veku a umožnili postihnutým ľuďom návrat do plnohodnotného života. Problémom posledných rokov je i potreba náhrad alebo vylepšenia niektorých orgánov pre tzv. skrášľovaciú plastickú chirurgiu.

Riešením nedostatku vhodných náhrad orgánov, tkanív alebo buniek by mohli byť produkty tkanivového inžinierstva a regeneračnej medicíny. Tieto problémy dnes vieme riešiť pomocou protéz, pomocou zariadení na podporu činnosti, pomocou transplantácie orgánov, tkanív alebo buniek pomocou produktov regeneračnej medicíny.

Najrýchlejšie rozvíjajúcim odvetvím medicíny je v súčasnosti tkanivové inžinierstvo a regeneračná medicína. Ide o multidisciplinárny odbor, ktorého cieľom je príprava plne funkčných náhrad orgánov a tkanív. Na prípravu konštruktov sa využívajú matrice z biosyntetických materiálov. Matrice tvoria sieť, na ktorú sa osádzajú bunky, a to bunky somatické (telové) alebo kmeňové bunky. Pri tvorbe konštruktu sa musia zohľadňovať aj požiadavky na príslušné rastové faktory potrebné k zachovaniu, integrácii a vývinu konštruktu.

Všetky snahy vedcov v danej oblasti by však mali mať určité etické pravidlá. Princípy využitia čohokoľvek na čokoľvek nesmú poprieť základné morálne princípy. Nemôžeme pod rúškom pojmu „pre väčšie dobro“ zastierať aj také skutočnosti, ako je kozmetická regenerácia pokožky starnúcej ženy embryonálnymi bunkami pochádzajúcich zo stimulovaných potratov afrických alebo ázijských chudobných žien. Podobne je otáznym výskum zameraný na embryonálne kmeňové bunky. Je zarážajúce, prečo sa ich výskum prioritne podporuje, najmä ak nie je vyjasnený ich tumorigénny potenciál. Pritom máme k dispozícii dospelé kmeňové bunky, ktoré sa už desaťročia v rekonštrukčnej medicíne úspešne využívajú.

Už raz sa ozvala ponuka: *Budete ako Boh, ak porušíte Božie princípy*. Ako na túto ponuku odpovieme dnes?

**Abstract. Tissue engineering – a future of medicine?** Population of Europe is ageing. In this period a quality of life begins to worsen and the requirements of special medical care increase enormously. One of the significant problems resides in the growth of number of paraplegics. In the present time that's a cause of increased pressure for a development of such types of substitutes which could enable an active life to the handicapped men (afflicted people) until high age and rejoining to a full-valued life. Problems of current years is a necessity to develop and improve substitutes of some organs for so-called beautifying plastic surgery (cosmetic surgery).

Solution of deficiency of suitable organ substitutes of organs, tissues or cells could be products of tissue engineering and regenerative medicine. Now, these problems are solved utilizing prosthesis, devices supporting activities (func-

tions), organ grafts, tissues or cells and products of regenerative medicine, respectively.

In the present time as the fastest development of medicine branch are observed tissue engineering and regenerative medicine. It is multidisciplinary field, which is aimed for the preparation of fully functional prosthesis of organs and tissues. To prepare the construct are used matrices from biosynthetic materials. Matrices are creating a network representing a

setting bed for the cells whether the somatic cells or stem cells. Creating a construct (artificial substitute) must be taken into account requirements for (given) appropriate growth factors necessary to conservation, integration and construct formation.

All the ambitions of scientists in the given sphere should be determined by some clear ethical rules. Principles of utilization of anything can't deny basic moral principles. It is not possible by color of notion of „bigger well“ to mask such reality as a cosmetic regeneration of skin of an ageing woman with embryonic cells derivable from the stimulated abortions of African or Asiatic miserable women. In a similar way a controversial research is oriented on embryonic stem cells. It is therefore bewildering why this type of the research is priority supported particularly when a tumorigen potential of these cells is not cleared up so far. At the same time we dispose adult stem cells successfully utilized in reconstruction medicine over a period of several decades.

Man already heard once: *If you break divine laws, you will be like God.* In which way do we respond this offer today?

Strata orgánu alebo tkaniva, prípadne jeho poškodenie sprevádzalo ľudstvo počas celej histórie jeho existencie. Kým v minulosti sa väčšinou jednalo o dôsledky vojnových konfliktov alebo infekcie, v súčasnosti sa k týmto problémom pridávajú aj tie, ktoré sú spojené so sociálnou revolúciou. Obyvateľstvo Európy starne. Predpokladá sa, že dĺžka života Európana v roku 2050 dosiahne 80,5 roka a ľudia nad 60 rokov budú tvoriť tretinu celkovej populácie. Na Slovensku presiahne index starnutia pred rokom 2025 hraničnú hodnotu 100. To znamená, že počet obyvateľov v poproduktívnom veku bude vyšší ako počet obyvateľov v produktívnom a predproduktívnom veku – populačné starnutie na Slovensku bude jedno z najrýchlejších v Európe [1]. V tomto veku sa začína zhoršovať kvalita života človeka a výrazne stúpa potreba špeciálnej zdravotnej starostlivosti. Zmenil sa i životný štýl súčasných ľudí vo vyspelých krajinách. Prechod k sedavému spôsobu života má za následok rýchlo sa zvyšujúci počet tzv. civilizačných ochorení: choroby chrupu, cukrovka, artritída, srdcovo-cievne ochorenia, zlyhanie orgánov (najmä obličiek a pečene), degeneratívne ochorenia (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba). Pribúda i paraplegikovia – ľudí postihnutých ochrnutím. V minulosti títo ľudia umierali veľmi rýchlo, dnes vďaka moderným liečebným postupom sme schopní udržať pacienta dlhé roky pri živote, pacient ale zostáva ochrnutý.

– 18 –

Ľudia v poproduktívnom veku však chcú žiť plnohodnotný život. Preto sa v súčasnej dobe vyvíja nátlak na vývoj takých náhrad, ktoré by umožnili seniorom aktívny život do vysokého veku.

Problémom posledných rokov je i potreba náhrad alebo vylepšenia niektorých orgánov pre tzv. skrášľovaciú chirurgiu. Korigujú sa prsníky, vzhľad tváre (nos, uši, pery, zuby, vyhladzujú sa vrásky), penis, je snaha predlžovať končatiny (nie každý má od narodenia nohy modelky), transplantujú sa vlasy. Ako sa dajú uspokojiť tieto požiadavky? Existuje niekoľko možností:

- a) použiť protézy,
- b) použiť zariadenia na podporu činnosti orgánu (napr. kardiostimulátory),
- c) použiť transplantáty,
- d) použiť produkty, ktoré poskytuje súčasné tkanivové inžinierstvo a regeneračná (rekonštrukčná) medicína.

### PROTÉZY

Jednou z najstarších protéz je *zubná protéza*, ktorú je možné datovať aspoň približne do obdobia IV. dynastie (2580 – 2465 pred Kristom). V egyptskej hrobke z tohto obdobia sa našli dva zuby, ktoré boli spojené zlatým drôtom. Zubné protézy poznali i Etruskovia a Feničania, Číňania a starí Indovia, ktorí používali náhrady zubov zo slonoviny. Očné protézy poznali Rimania, sklené očné protézy sa začali používať až v súvislosti s rozvojom sklárskeho priemyslu (Benátky).

Zo starovekej Indie pochádza správa o kráľovnej Vishple, ktorej musela byť amputovaná noha v súvislosti s poranením, ktoré utrpela vo vojne. Noha jej bola nahradená železnou protézou. Protéza jej umožnila nielen chodiť, ale zúčastniť sa aj ďalších bitiek [6].

Jednou z najstarších „skutočných“ protéz je *náhrada palca na nohe*, pochádzajúca približne z obdobia 600 rokov pred Kristom, objavená v hrobke starého Egypta. Bola zhotovená z kože a dreva. Protézu testovali dobrovoľníci s podobným postihnutím a zhodli sa, že protéza je veľmi pohodlná a umožňuje plnohodnotnú chôdzu.

V staroveku sa vyrábali drevené alebo kovové „chodúle“, ktoré sa pripevňovali pomocou popruhov. Až po prvej svetovej vojne sa začala v Nemecku priemyselná výroba protéz. Prvá protéza „Jupa knee“ pozostávala z lôžka, kolenného kĺbu a chodidla s členkovým kĺbom. V súčasnosti existujú protetické chodidlá typu Cheetah, ktorý vyrába firma Össur. Túto protézu používajú súčasní paraolympionici. Na podobnom princípe sa vyrábajú aj robotické protézy horných končatín. Súčasný trend pri výrobe protéz smerujú nielen k vytvoreniu náhrady orgánu zabezpečujúcej základný pohyb, ale takej náhrady, ktorá umožňuje jemné pohyby prstov, prípadne zabezpečí i niektoré funkcie nervového systému [6].

Jedným z triumfov súčasnej protetiky je náhrada kĺbu. Jej základ tvorí kovová (titanová) hlava kombinovaná s polyetylénom s vysokou molekulovou hmotnosťou. V súčasnosti sa protézy používajú aj vo veterínárnej medicíne.

Okrem klasických protéz existujú i **umelé náhrady orgánov**:  
**Umelé srdce** je bionická pumpa implantovaná do tela. Prvýkrát bolo použité pred tridsiatimi rokmi (1982). Dnes je k dispozícii umelé srdce AbioCora, ktoré je nezávislé na vonkajších dodávkach energie. Pacientovi však nie je schopné poskytnúť celoživotnú náhradu a väčšinou sa používa na preklenutie času po transplantácii. Nevýhodou je jeho cena (AbioCora stojí 160 000 dolárov).

**Umelú obličku**, transplantovateľnú pacientovi do tela sa doteraz nepodarilo vyvinúť. Zariadenie, označované ako umelá oblička, je dialyzačné zariadenie – mimotelové zariadenie, ktoré na princípe polopriepustnej membrány je schopné oddialyzovať škodlivé látky z tela pacienta. Dnes sa používajú aj dialyzačné zariadenia, ktoré využívajú bunky obličiek.

**Umelá pečeň** je v princípe mimotelové zariadenie podobné umelej obličke. Umožňuje preklenutie obdobia od zlyhania pečene po transplantáciu. Pacient musí chodiť na detoxikáciu podobne ako pacient na dialýzu.

V súčasnosti sú k dispozícii protézy a náhrady, ktoré môžu pacientovi uľahčiť život do takej miery, ako to v minulosti nebolo mysliteľné. Dodnes však nijaká protéza ani umelo vytvorená náhrada nie je schopná plnohodnotne nahradiť poškodený orgán alebo tkanivo. Jediným spôsobom ako nahradiť celý stratený orgán alebo tkanivo v jeho plnej funkčnosti je transplantácia.

## TRANSPLANTÁTY

Transplantácia je metóda, ktorá umožňuje funkčne rovnocennú náhradu orgánu, tkaniva alebo bunkového systému organizmu takým spôsobom, že nahradíme orgán alebo tkanivo prenesením zdravého orgánu, jeho časti, tkaniva alebo buniek na poškodené miesto.

V Indii už dvetisíc rokov pred Kristom transplantovali odrezané nosy (trest za cudzoložstvo) transplantátom autológnej kože. Tieto technológie sa v princípe používajú dodnes. V Európe bol prvý prípad transplantácie kože popísaný v roku 1442, keď Brancas použil kožu z ramena sluhu na rekonštrukciu nosa jeho pána. V roku 1597 Tagliacozzi publikoval prácu *De curtorum chirurgia per insitionem*, kde popisuje rekonštrukcie nosov podobnou metódou ako Brancas. Nešlo ani tak o liečbu vojnových poranení, ako o rekonštrukciu nosov syfilitikov. V 16. storočí bola totiž v Európe epidémia syfilisu (priniesli ho námorníci z Nového sveta) a v poslednom štádiu tejto choroby pacientom odpadávali nosy.

V roku 1668 v Rusku chirurg Job van Meereken použil na opravu defektu lebky (rana šablou) ruského šľachtica časť lebky psa. Chirurgická operácia prebehla úspešne, ale ruská pravoslávna cirkev vyhlásila xenotransplantáciu za nezlučiteľnú s vierou, šľachticovi i lekárom pohrozila exkomunikáciou a psia lebka musela byť odstránená.

Prvý pokus o transplantáciu krvi (transfúziu) bol popísaný v 15. storočí, keď pápežovi Inocentovi VIII. bola podaná krv troch desaťročných chlapcov. Krv bola podaná perorálne (ústami), pretože v tom čase neexistovali poznatky o krvnom obehu (princípy krvného obehu vysvetlil až anglický lekár Harvey v roku 1628). Transfúzia, samozrejme, nebola úspešná a zomrel nielen pápež, ale i traja chlapci. Úspešnú transfúziu umožnil až objav krvných skupín (nezávisle objavil krvné skupiny český lekár Jan Jánský v roku 1906 a rakúsky lekár Karl Landsteiner (1901). Landsteiner za svoj objav dostal v roku 1930 Nobelovu cenu, objav Jánskeho sa nespomenul. V rokoch 1939 – 1940 Landsteiner spolu s Alexom Wienerom, Philippom Levinom a R. E. Stetsonom objavili aj Rh faktor. Ďalším prielomom bol objav antikoagulantov, teda látok, ktoré zabráňujú zrážaniu krvi.

**Transplantácia orgánov** vyžaduje mimoriadne vyspelé chirurgické techniky. Čínsky lekár Pien Čchi'ao (alebo Bian Que) popisuje výmenu srdca medzi dvoma mužmi už sedemsto rokov pred Kristom. Hoci táto procedúra pravdepodobne patrí do sféry legiend, je pravda, že starí Číňania poznali a používali anestéziu (napr. lekár Hua Tuo, ktorý zomrel pravdepodobne v roku 208, používal na omámenie pacientov koktail z konopy indickej) a ich chirurgické vedomosti i zručnosti si zasluhujú úctu aj dnes. V 3. storočí bola popísaná i transplantácia nohy čierneho sluhu jeho pánovi. Túto transplantáciu vykonali svätí Kozma a Damián, ktorí sa dnes považujú za patrónov transplantáčnych technológií.

Pokusov o transplantácie bolo viacero, ale absentovali základné vedomosti o imunitnom systéme organizmu, nebola vyvinutá ani dostatočná technológia operácií a neboli nijaké poznatky o bakteriálnych kontamináciách a spôsobe ich liečby. Preto väčšina pokusov o transplantáciu končila neúspechom.

Prielomom v transplantáčnej medicíne boli objavy 20. storočia. Objav špeciálneho cievneho stehu (U steh) umožnil technickú realizáciu transplantácie orgánov. Prvýkrát ho použil Francúz Alexis Carrel. Steh umožnil zošiť cievy tak, aby bol zachovaný priedchod krvi cievou. Pretože však nebol známy mechanizmus zrážania krvi a nebol objavený heparín, dochádzalo často k vytvoreniu krvnej zrazeniny, ktorá cievy upchala. Carrel spolu s R.G. Harrisonom je súčasne považovaný aj za objaviteľa technológie tkanivových kultúr, ktorá dnes umožňuje pripravovať bunky pre transplantáciu.

Ďalším významným pokrokom bol *objav antibiotík*, ktoré pomohli prekonať pooperačné komplikácie spôsobené mikroorganizmami.

Rozhodujúcim objavom však bol objav *mechanizmu imunitnej odpovede organizmu* (sir Peter Medawar v roku 1944) a objav *imunosupresív* (cyklosporín objavený J. F. Borelom v roku 1972). Tieto objavy boli základom v rozvoji transplantáčnej medicíny.

V súčasnej dobe môžeme a vieme transplantovať orgány, tkanivá alebo bunky. Môžu byť:

### 1. Autológne

Ide o transplantáciu z jedného miesta tela človeka na iné miesto. Výhodou autológnej transplantácie je to, že u pacienta nenastáva imunitná odpoveď (ide o telu vlastné transplantáty). Nevýhodou je veľmi úzky okruh použiteľných transplantátov (najčastejšie sa používa autotransplantácia kože u ťažko popálených pacientov).

### 2. Alogénne

Ide o transplantáciu medzi dvomi geneticky odlišnými jedincami toho istého druhu. Môžeme použiť transplantát zo živého človeka alebo mŕtveho (kadaverózneho) darcu. Alotransplantácie vyvolajú imunitnú reakciu u príjemcu.

Špeciálnym prípadom sú tzv. izotransplantácie. Ide o transplantácie medzi jednovaječnými dvojčatami. Aj keď ide o transplantáciu medzi dvomi jedincami, pre zhodu v imunitnom systéme sa tieto transplantácie považujú za druh autotransplantácie.

### 3. Xenogénne

Ide o transplantáciu medzi zvieratom a človekom. Poznáme konkordantné xenotransplantácie (medzi primátom a človekom) a diskordantné – z iných zvierat na človeka. Konkordantné transplantácie narážajú na niekoľko problémov. Prvým je ich akútny nedostatok. Primáty majú podobný rozmnožovací cyklus ako človek (samica šimpanza, goriľ alebo orangutana má v priebehu života iba niekoľko mláďat, podobne ako človek), druhým sú etické problémy. Najvhodnejším darcom pre človeka nie je primát, ale prasa. Štruktúra prasacej kože a orgánov (srdcové chlopne) je mimoriadne podobná ľudským; prasacie orgány sú dostupné v potrebnom množstve (prasiatka sa rozmnožujú veľmi rýchlo), etické problémy sú minimálne. Nevýhodou xenotransplantácií je ako silná imunitná odpoveď, tak možnosť prenosu zoonóz na príjemcu (napr. porcínne endogénne retrovírusy), ktoré by v neprirodzenom hostiteľovi mohli byť príčinami ochorení s vysokou letalitou. Preto sa v EÚ v súčasnosti zvažuje zákaz používania xenotransplantátov.

#### *Etické problémy s xenotransplantátmi*

Katolícka morálka **dovoľuje použitie zvierat** na získanie tkanív alebo orgánov, ktoré slúžia na transplantácie človeku, **ak je cieľom záchrana jeho života**, ale človek sa musí zodpovedať Stvoriteľovi aj tým, ako zaobchádza so zvieratami. Každé zbytočné utrpenie zvierata alebo jeho zbytočné zabitie sa prieči Božiemu plánu [3, §2415 - 2418]. Príkladom takéhoto použitia je odobratie ich orgánov a tkanív na transplantáciu, aj keď by si to malo vyžadovať potrebu experimentovania alebo aj ich genetických modifikácií [3, §2417]. Ale i v tejto perspektíve sa eticky vyžaduje, aby človek **chránil zvieratá pred utrpením, riešpektovoval kritériá skutočnej potreby a odôvodnenosti a vyhýbal sa nekontrolovateľným genetickým modifikáciám** [3, §2418]. Od človeka sa teda vyžaduje zodpovedný prístup.

Podľa vyjadrení Magistéria a teológov **neexistujú špeciálne morálne námietky, pokiaľ je nádej na úspech a nemení sa ľudská identita a podstatné funkcie osoby.**

Pri xenotransplantáciách sa môžu vyskytnúť i psychické problémy, ak si príjemca uvedomí, že súčasťou jeho tela sa stane zvierací orgán alebo tkanivo. Preto je dôležité xenotransplantáciu príjemcovi zdôvodniť a príjemca s ňou musí vedome a dobrovoľne súhlasiť.

Dnes je transplantácia bežnou lekárskou technikou. Transplantuje sa kostná dreň, obličky (od príbuzných aj od mŕtvych darcov), pečeň, pankreas, srdce, pľúca (alebo srdce i pľúca naraz). V súčasnosti chirurgovia dokážu transplantovať aj ruku (prvýkrát ruku transplantoval Jean-Michel Dubernand v Lyone v roku 1998) a dokonca aj tvár.

Na celom svete existujú tkanivové banky a transplantačné tímy, ktoré zabezpečujú, aby sa transplantáty odoberali, pripravovali a u tkanív aj uchovávali podľa prísnych smerníc tak, aby poskytli pre príjemcu čo najlepšie a bezpečný transplantát. Nijaký orgán alebo tkanivo nesmie byť použité na komerčné účely.

Všetky hlavné náboženstvá (kresťanstvo, judaizmus, islam, budhizmus) sa k darcovstvu orgánov a tkanív medzi ľuďmi stavajú pozitívne [10]. Na transplantáciu sa pozerajú ako na poskytnutie tej najväčšej služby bližnému. Známy je výrok pápeža Jána Pavla II: „Neberte si svoje orgány do neba.“ **Bezplatné darovanie orgánov po smrti je dovolené a môže byť záslužné** [3, §2301].

Problémom transplantácií je akútne nedostatok darcov. Nie každý človek (či už živý alebo kadaver) môže byť darcom. Výber darcov podľa lieha prísnych kritériám a darcov, ktorí vyhovejú požiadavkám, je veľmi málo. Preto napr. na Slovensku bolo v roku 2011 podľa údajov slovenského Centra orgánových transplantácií 382 registrovaných čakateľov na transplantáciu obličky a realizovaných bolo iba 116 transplantácií od kadaverózných darcov a 13 od príbuzných [5]. Ostatní pacienti neboli transplantovaní pre nedostatok darcov. Riešením nedostatku vhodných náhrad orgánov, tkanív alebo buniek by mohli byť produkty tkanivového inžinierstva a regeneračnej medicíny.

## **PRODUKTY TKANIVOVÉHO INŽINIERSTVA A REGENERAČNEJ MEDICÍNY**

Tkanivové inžinierstvo (TI) je nová oblasť biotechnológie, ktorá kombinuje rozličné aspekty medicíny, bunkovej molekulárnej biológie, materiálových vied a inžinierstva za účelom regenerácie, reparácie alebo úplnej náhrady ľudských tkanív a orgánov [2]. V súčasnosti sa z tohto odboru vyčleňuje **regeneračná** (alebo reparačná) **medicína** (RM).

**Tkanivové inžinierstvo** zahŕňa prípravu kompletného konštruktu in vitro. V laboratóriu pripravíme maticu s bunkami, pridávame potrebné rastové faktory, kultivujeme ju a po vytvorení konštruktu ho implantujeme do organizmu. Výhodou takéhoto postupu je príprava



v presne definovaných podmienkach. Nevýhodou je to, že nevieme vytvoriť tkanivo pod záťažou (napr. vytvorenie chrupavky alebo kostného tkaniva vyžaduje aj záťažový faktor na to, aby bolo plnohodnotné) a doteraz vieme veľmi málo o rastových faktoroch, ktoré sú potrebné na to, aby konštrukt bol plne funkčný a inkorporovateľný do organizmu.

**Regeneračná medicína** využíva na prípravu konštruktú vlastné telo pacienta. Do organizmu vložíme pripravenú maticu, bunky (obvykle vo forme suspenzie) a vlastné formovanie transplantátu prebieha v tele príjemcu. Výhodou je dostupnosť všetkých rastových faktorov v optimálnej koncentrácii a časovej postupnosti i existencia záťaže, nevýhodou je, že tieto konštruktú často degenerujú, pretože nedochádza k množeniu buniek vo vnútri konštruktú.

Produkty TI a RM by teda mali pokryť potrebu náhrad zlyhávajúcich orgánov a tkanív, mali by poskytnúť materiál, potrebný pri súčasných chirurgických výkonoch (závažné poranenia), mali by poskytnúť vhodný materiál pre plastickú (kozmetickú) chirurgiu a mali by aj poskytnúť modely, ktoré by nahradili pokusy na zvieratách. Viaceré kozmetické a farmaceutické firmy už používajú na testovanie kozmetických prípravkov modely kože alebo rohovky. Na týchto produktoch tkanivového inžinierstva sa testuje metabolizmus látky a jeho produkty, toxicita a dráždivosť jednotlivých prípravkov pre ľudský organizmus. Produkty TI a RM obvykle obsahujú:

- a) matrice (syntetické alebo prírodné),
- b) solubilné faktory,
- c) bunky (somatické, kmeňové alebo reprogramované).

Na vytvorenie plnohodnotného konštruktú je teda potrebné kombinovať najvhodnejší typ matrice s najvhodnejšími bunkami (súborom rôznych buniek) za podmienok, ktoré povedú k vytvoreniu daného typu tkaniva. Pri tvorbe akéhokoľvek tkaniva si musíme uvedomiť niekoľko základných princípov:

- a) ktoré štruktúry a funkcie tkaniva chceme obnoviť,
- b) čo túto štruktúru charakterizuje.

Každé tkanivo (orgán) má totiž jedinečnú trojrozmernú štruktúru. Ak chceme vytvoriť takýto konštrukt v laboratórnych podmienkach, musíme prejsť od dvojrozmernej kultivácie na trojrozmernú, pretože pri 2D kultivácii dochádza veľmi často k strate daného typu fenotypu príslušných buniek (napríklad bunky chrupavky pri 2D kultivácii sa menia na fibroblasty a pre ďalšiu prípravu konštruktú sú nepoužiteľné). Okrem toho tkanivo je tvorené i medzibunkovou hmotou. Jej štruktúra i kvalita musí byť zachovaná. Väčšina tkanív je tvorená viacerými typmi buniek a pri konštrukcii plnohodnotného tkaniva musíme použiť nielen všetky typy buniek, ale zachovať aj ich pomer, pretože môže dôjsť k tomu, že jeden druh buniek „vytlačí“ ostatné bunky, ktoré sme do konštruktú nasadili.

Je potrebné dodať i rastové a stimulačné faktory, a to v koncentrá-



ciách a poradi, v akom sa v tkanive prirodzene vyskytujú. Pri vývoji teda musíme napodobniť normálny vývin tkaniva počas morfogénzy.

Veľmi podstatné je zaistiť i cieвне zásobovanie a inerváciu konštruktú. Na tomto probléme v súčasnosti zlyháva väčšina vytvorených produktov. Dôležité sú i mechanické parametre (chrupavky, kostné tkanivo alebo svalové tkanivo je v organizme vystavené špecifickej záťaži). Ak tieto parametre nedodržíme pri príprave, konštrukt odumiera a bunky degenerujú. Preto sa vyvíjajú zariadenia, ktoré pri príprave konštruktú simulujú dané záťažové parametre (napr. na konferencii Bioimplantologie v Brne v roku 2013 predstavili českí vedci Musílková a kol. z Fyziologického ústavu AV ČR „cvičiaci stroj STREX“ pre ľudské svalové bunky. Tým, že dochádza ku kontrakciám a uvoľňovaniu, bunky si zachovávajú svoje vlastnosti).

## MATRICE

Matrice pre TI a RM sú komponované na princípe využitia biomateriálov. Biomateriál je definovaný ako syntetický materiál, ktorý nahrádza alebo obnovuje funkciu nového tkaniva. Používa sa ako dočasný mechanický substrát, ktorý dostatočne odoláva tlakom okolitých tkanív *in vivo* až do vytvorenia mechanicky odolného tkaniva [4].

Na to, aby mohli byť biomateriály použité, musia spĺňať určité požiadavky. Musia byť:

- a) *biokompatibilné*: musia sa inkorporovať do organizmu bez vyvolania nepriaznivej odozvy;
- b) *biofunkčné*: musia spĺňať požiadavku na korekciu ochorení a defektov rôzneho pôvodu;
- c) *technicky a ekonomicky dostupné*;
- d) *neškodné*.

Biomateriály používané v RM a TI sa delia na syntetické a prírodné. K syntetickým materiálom zaraďujeme syntetické degradovateľné a nedegradovateľné polyméry, kovy, keramiku a polovodičové materiály. Polyméry (dacron/polyuretanfluoroetylén) sa v súčasnosti používajú ako nosiče pre konštrukciu cievných náhrad. Osídľujú sa alebo progenitorovými bunkami endotelia (endothelial progenitor cells), ktoré cirkulujú v krvi a môžu sa diferencovať na bunky endotelia, alebo kmeňovými bunkami, izolovanými z kostnej drene alebo tuku.

Pri konštrukcii biosyntetického močového mechúra najprv vyrobili zo špeciálnych polymérov vrecká, na ktoré nasadili z vnútornej strany psie fibroblasty a na vonkajšiu stenu psie bunky hladkého svalstva. Tieto mechúre voperovali pokusným psom, kde plnili výborne svoju funkciu [9]. Súčasná práca sa zameriavajú na rekonštrukciu ľudského močového mechúra. Používajú sa najmä autológne kmeňové bunky a výsledky sú sľubné [7]. **Prírodné** materiály majú schopnosť simulovať pôvodné životné podmienky bunky. Získavajú sa z rastlín (celulóza, škrob, alginát) alebo zo živočíchov (kolagén, kyselina hyalurónová, glykoza-

minoglykány, heparín). Osobitnou skupinou sú ešte polyizoprény ako kaučuk, gutaperča a balata. Najčastejšie používané prírodné materiály sú kolagén a chitín. Špeciálnou skupinou sú kompozity, ktoré sú vlastne kombináciou predchádzajúcich dvoch skupín. Veľmi často sa používajú aj matrice v tvare mikrokapsulí (alginátové gély), do ktorých sa vložia bunky. Táto liečba sa považuje za perspektívnu najmä pri liečbe diabetu. Do alginátového gélu sa vkladajú Langerhansove ostrovčeky, produkujúce inzulín (a to ako alogénneho, tak aj xenogénneho pôvodu) a injikujú sa pacientovi. Bunky produkujú inzulín, ten sa vzhľadom na to, že alginát je semipermeabilná membrána, dostáva do krvi pacienta, ale súčasne alginát chráni bunky pred imunitným systémom pacienta. Alginát imunitný systém neidentifikuje ako cudzí a antigény transplantovaných Langerhansových ostrovčekov sú ním chránené. Pacient by tak mohol prísť raz za dva až tri roky na injekciu buniek a odpadlo by každodenné používanie inzulínu.

Ďalšou skupinou matric používaných v RM a TI sú decelularizované (zbavené buniek) časti tkaniva (orgánu), ktorý chceme nahradiť. To znamená, že z daného tkaniva (orgánu) odstránime poškodené bunky a „kostru“ použijeme ako scaffold pre zdravé bunky. V súčasnosti sa decelularizované matrice používajú najčastejšie pri príprave náhrad kože. Nedávno popísali vedci v časopise Nature Medicine použitie „kostry“ obličky zbavenej buniek ako nosiča pre bunky obličky krysy. Takto umelo pripravená oblička bola funkčná [8].

## BUNKY

Na prípravu produktov TI a RM môžeme použiť:

- A. **Somatické (zrelé) bunky.** Ich použitie je obmedzené malou proliferáčnou schopnosťou a neschopnosťou diferenciacie.
- B. **Kmeňové bunky:**
  1. *Embryonálne kmeňové bunky (ESC)* – nediferencované nezrelé bunky so schopnosťou neobmedzenej reprodukcie a schopnosťou diferenciacie;
  2. *Dospelé kmeňové bunky (adult stem cells – ASC)* – vyskytujú sa v kostnej dreni, pupočníkovej krvi, rohovke, zubnej pulpe, pečeni, koži, vlasových folikuloch, GIT, pankrease, tukovom tkanive.
- C. **Reprogramované somatické bunky** – ide o telové zrelé bunky, ktoré boli reprogramované tak, že nadobudli vlastnosti kmeňových buniek. Na reprogramovanie sa používajú alebo vektory, alebo špeciálne kultivačné podmienky.

**Somatické bunky.** Sú to všetky bunky organizmu s výnimkou po hlavných buniek. Naše telo je zložené asi z dvesto päťdesiatich typov buniek. Tieto bunky sú schopné vytvoriť iba bunku toho istého typu ako sú samé – teda z keratinocyту môže vzniknúť iba keratinocyt a nič iné. Okrem toho má väčšina z nich obmedzenú schopnosť množiť sa (tzv. Hayflickov fenomén). Aj pri týchto obmedzeniach je technológia

kultivácie somatických buniek pre liečbu prínosom. K najväčším úspechom patrí liečba popálených pacientov pomocou keratinocytov, používaná už od polovice sedemdesiatych rokov dvadsiateho storočia, alebo liečba defektov chrupavky pomocou autológnych chondrocytov. V súčasnosti vieme kultivovať v potrebnom množstve keratinocyty, fibroblasty, melanocyty, chondrocyty, osteoblasty, myocyty, krvné bunky.

**Kmeňové bunky.** Kmeňové bunky sú nediferencované bunky, ktoré sú schopné diferencovať sa na viacero typov buniek. Súčasne majú schopnosť obnovy seba samých (self-renewal). Ide o bunky, ktoré nemajú nijakú konkrétnu špecializáciu, ide o akési „bunky – náhrady“ v organizme. Na rozdiel od somatických buniek, ktoré sú schopné množným vytvoriť iba takú istú bunku ako sú samé, kmeňové bunky sú schopné vytvoriť dva typy buniek: také isté bunky ako sú samé a bunky, ktoré sa môžu premeniť pod vplyvom podmienok prostredia na iný typ buniek, napríklad na bunku kostnú, nervovú alebo svalovú. Tieto bunky sú v organizme prítomné po celý život – od počiatočných fáz vývoja až po smrť.

Podľa toho, v ktorom štádiu vývoja človeka sa kmeňové bunky vyskytujú, poznáme tieto typy kmeňových buniek: embryonálne, ktoré pochádzajú z rôznych štádií vývoja embrya (tento typ buniek označujeme aj ako prenatálne bunky) a dospelé (postnatálne kmeňové bunky).

**Embryonálne kmeňové bunky.** Schopnosť embryonálnych buniek vytvoriť prakticky všetky bunky (a teda orgány a tkanivá človeka) predstavuje úžasný potenciál. Mohli by teda slúžiť na opravu akéhokoľvek defektu v ľudskom tele. Embryonálne kmeňové bunky možno pestovať v bežných laboratórnych podmienkach a namnožiť do potrebného množstva. Takisto vieme tieto bunky nasmerovať tak, aby z nich mohol vyrásť požadovaný typ buniek. Na ich získanie však musíme použiť ľudské embryo a ich izoláciou sa embryo ničí. Preto je dôležité, ako definujeme ľudskú zygotu, prípadne embryo.

#### ***Stanoviská k používaniu embryonálnych kmeňových buniek***

**Konzervatívne stanovisko:** Ak život človeka začína počatím, má ľudské embryo (vrátane štádia zygoty) status človeka a pokusy s ESC sú pokusmi na ľuďoch. Pápež Benedikt XVI. v decembri 2005 vyhlásil: „Boh pozerá na embryo ako na hotového človeka“ a pri audiencii, ktorú poskytol účastníkom konferencie o kmeňových bunkách v novembri 2011, povedal: „Zničenie čo i len jediného embrya nemôže byť ospravedlnené prospechom, ktorý by z tohto konania mohol byť prinesený inému“. Z toho vyplýva, že cieľavedomé zničenie embrya je vraždou ľudskej osoby.

**Liberálny názor:** Ak je pre niekoho zygota iba bunkou a blastula, prípadne včasnne štádia embrya iba zhlukom ľudských buniek a osobou sa stáva až narodením, sebauvedomením sa, alebo schopnosťou cítiť bo-

leš, potom môže byť pre pestovanie použité bez akýchkoľvek problémov. Embryo teda v tomto ponímaní nemá status človeka.

Existuje i *hybridný – kompromisný názor*, že status človeka nadobúda embryo postupne a rané embryo (1 – 14 dní, a podľa judaizmu dokonca nie je ľudský zárodok definovaný do 40. dňa ako človek) má špecifický status, nie je osobou. V tomto prípade je použitie embrya do stanoveného limitu povolené. Navyše sa berie do úvahy aj to, že zničenie embrya prinesie vylicievanie inému jedinčovi. V tomto prípade by embryo mohlo byť na pestovanie použité (embryo si nevyžaduje absolútnu ochranu), ak jeho zničením sa poskytne úžitok pre iného človeka.

V novembri 2011 Európsky súdny dvor zakázal svojim rozhodnutím patentovanie a používanie techník, ktoré využívajú ľudské embryonálne bunky. Rozšíril pojem ľudského embrya aj na neoplodnené vajíčka stimulované na delenie alebo s transplantovaným jadrom inej bunky (terapeutické klonovanie). Týmto rozhodnutím sa ukončil proces Brüstle versus Greenpeace. Profesor Oliver Brüstle podal žiadosť na patentovanie produkcie nervových buniek na liečbu Alzheimerovej choroby pestovaním embryonálnych kmeňových buniek. Európsky súdny dvor definoval embryo v troch formách: ako oplodnené vajíčko, ktorým sa začína vývoj ľudskej bytosti od počatia, ako neoplodnené vajíčko, do ktorého sa implantuje jadro inej ľudskej bunky a ako vajíčko, ktorého delenie bolo stimulované (partenogéza – rozmnožovanie bez spermí). Všetky tri typy embrya sú postavené na úroveň človeka a práca s nimi je zakázaná s výnimkou terapeutického zásahu, t. j. ak by sa mala uskutočniť operácia na embryu vedúca k záchrane jeho života, alebo opraveniu chyby a zlepšeniu jeho existencie.

Podľa zákonov SR (zákon č. 300/2005 Z. z.) je podľa § 161 neoprávnený experiment na človeku a klonovanie ľudskej bytosti trestným činom a podľa zákona o zdravotnej starostlivosti č. 576/2004 Z. z. je embryo dané na úroveň osôb. Podľa Zákona o zdravotnej starostlivosti § 26 nemožno výskum bez zdravotnej indikácie vykonať na ľudskom plode alebo zárodku.

Problémom pri používaní embryonálnych kmeňových buniek môže byť i to, že nie sú imunologicky kompatibilné. Znamená to, že ESC pochádzajú z iného jedinca, a organizmus príjemcu ich rozpoznáva ako cudzie, aj keď ich antigenicita je veľmi nízka.

Tento problém by mohol byť vyriešený pomocou tzv. terapeutického klonovania. Z vajíčka by sa odstránilo jadro a vložilo jadro bunky príjemcu. Takáto bunka by sa pomnožila do štádia blastocytu. Bunky z nej získané by si zachovali vlastnosti ESC, ale antigény by boli príjemcove. Išlo by o vytvorenie vlastného embrya na objednávku. Morálne a etické problémy takéhoto postupu sú zhodné s tými, ktoré sú pri využívaní ESC.

**Dospelé kmeňové bunky.** Dospelé kmeňové bunky sa vyskytujú v každom človeku už od narodenia po celý jeho život. Sú uložené v tkanivách vo forme „spiacich“ buniek a pri poškodení tkaniva sa stimulu-

je ich delenie. Predpokladá sa, že na každých desiatich buniek pripadá jedna kmeňová bunka. Vytvoria také isté bunky ako sú samé (self-renewal) a tiež také bunky, ktoré boli poškodením stratené. Po regenerácii sa opäť vrátia do pokojového štádia. Na rozdiel od embryonálnych kmeňových buniek je ich schopnosť diferencovať sa obmedzenejšia. Sú multipotentné. Ich schopnosť tvoriť iné typy buniek sa viaže na ich pôvod – bunky pochádzajúce z mezenchýmu sú schopné vytvoriť bunky kostí a svalov. Za určitých podmienok však môžu byť preprogramované a začnú produkovať bunky iného typu, než na aký sú „zadané“. Je to spôsobené pravdepodobne tým, že ASC prechádzajú z miesta v tkanive, v ktorom sa nachádzajú, do iného, a tam sa pôsobením iných signálnych molekúl môžu reprogramovať. Preto môžeme z ASC mezenchymálneho pôvodu vypestovať široké spektrum buniek.

Ďalším spôsobom využitia dospelých kmeňových buniek je použiť ich ako „dopravný prostriedok“ na transport liečiv k poškodenému alebo chorému orgánu. V prípade nádorových ochorení sa predpokladá, že MSC (*mesenchymal stem cells*, *mezenchýmové kmeňové bunky*) sú schopné migrovať k nádorom a metastázam nádorov. Ak do bunky vložíme gén pre tvorbu cytostatika, takáto bunka bude prednostne putovať k nádoru, usídli sa tam a začne produkovať dané liečivo, čím cieľene zlikviduje nádor bez toho, aby poškodila okolité tkanivo. Tento spôsob terapie rozpracováva skupina okolo prof. Altanera na Onkologickom ústave sv. Alžbety v Bratislave.

Na Slovensku sa liečbe dospelými kmeňovými bunkami venujú viaceré pracoviská. Združená tkanivová banka v Košiciach sa zaoberá izoláciou a prípravou MSC z kostnej drene i z tukového tkaniva a používa ich pri kostných a chrupavkových ochoreniach. Kolektív profesora Vojtaššáka z Lekárskej fakulty Univerzity Komenského ich používa na liečenie diabetickej nohy, rázštepov pier, inkontinencie a na spevnenie čelustných kostí. V súčasnej dobe sa zriadilo spojené pracovisko – centrum na liečbu Alzheimerovej choroby kmeňovými bunkami. V Centrálnej tkanivovej banke pri Klinike popálenín v Bratislave už päť rokov prebieha liečba pacientov limbálnymi kmeňovými bunkami. V prípade poškodenia oka (poleptaním alebo popálením) sa odoberie niekoľko kmeňových buniek z limbálnej oblasti zdravého oka. Je to oblasť okolo rohovky, kde sa kmeňové bunky vyskytujú. Tieto sa pomnožia v laboratórnych podmienkach a následne aplikujú pacientovi. Výsledky liečby sú veľmi sľubné. Uvažuje sa aj o použití kmeňových buniek z tukového tkaniva pri liečbe pacientov s defektmi po popáleniach alebo s inými defektmi vyžadujúcimi plastické operácie.

Veľmi atraktívnym použitím kmeňových buniek je ich aplikácia v skrášľovacej chirurgii (namiesto silikónových implantátov by sa pacientke implantovali jej vlastné tukové bunky) a pri rôznych iných kozmetických operáciách.

S využívaním dospelých kmeňových buniek nie sú spojené nijaké etické a morálne problémy. Výhodou je i to, že nie je problém pripra-

viť pacientovi jeho vlastné (autológne) dospelé kmeňové bunky v dostatočnom množstve. Tým odpadajú všetky problémy s imunitnou reakciou príjemcu.

**Reprogramované bunky.** Sú to somatické bunky (teda nie kmeňové), ktoré dokážeme vrátiť do štádia kmeňovej bunky. Je to možné buď použitím vektora, ktorý do bunky vnesie špecifický gén, ktorý bunku vráti do štádia kmeňovej bunky, alebo zmenou kultivačných podmienok tak, že sa bunka sama mení na kmeňovú.

Reprogramovanie ľudských buniek do embryonálneho štádia bez pomoci vektora popísali na myšiach Dr. K. Takahashima a Dr. S. Yamana prvýkrát v roku 2006 a v roku 2007 reprogramovali aj ľudské fibroblasty. Kinam Ko a spol. zistili, že u buniek získaných zo semenníkov dospelých myší dochádza za určitých podmienok kultivácie k spontánnemu reprogramovaniu buniek na kmeňové pluripotentné bunky, a to bez použitia vírusového vektora (transfekcie). To isté sa podarilo i s bunkami semenníka človeka. Zatiaľ je tento výskum otáznym najmä z hľadiska možnosti navodenia tumorigenicity (schopnosti vyvolať nádorové ochorenie u príjemcu).

**Regenerácia tkanív u niektorých živočíchov.** U niektorých živočíchov dochádza k spontánnemu „dorastaniu“ poškodenej končatiny. Vedci zistili, že v embryonálnom štádiu sa na tvorbu svalového tkaniva používajú gény, ktoré sa v neskoršom vývojovom štádiu vypnú. Na regeneráciu sa v dospelosti používa iná skupina génov. U niektorých mlokov a jašteríc však je možné tieto gény podľa potreby „zapnúť“ aj v dospelosti. Ak pochopíme, ako dochádza k expresii génov zodpovedných za dorastanie orgánu u týchto zvierat, mohli by sme v budúcnosti regenerovať poškodené tkanivo (orgán) z „vlastných“ zdrojov.

Kmeňové bunky existujú i u rastlín v meristémovom pletive. Na rozdiel od živočíšnych buniek sa u rastlín totipotencia zachováva po celý jej život. Preto z izolovaných buniek rastových vrcholov rastliny môžeme získať veľké množstvo jedincov identických s pôvodnou rastlinou. Toto sa bežne využíva pri produkcii rastlín pre poľnohospodárstvo.

## ZÁVER

Hoci metódy TI a RM dnes predstavujú obrovské možnosti ako vyliečiť mnohé ochorenia alebo zlepšiť kvalitu života pacientom, doteraz sa nepodarilo vytvoriť plne funkčnú náhradu tkaniva alebo orgánu. Príčin je niekoľko: nesmierna komplexnosť jednotlivých tkanív alebo orgánov (napríklad u kože ani jeden z doteraz vytvorených a používaných konštruktov neobsahuje vlasové folikuly, potné žľazy, nervové vlákna a kapiláry), neexistujúce cievné zásobenie, ktoré spôsobuje odumieranie pripraveného konštruktú, nevieme doteraz vytvoriť funkčnú nervovú sieť.

Dôležité je uvedomiť si i to, že ani aplikácia najdokonalejšieho konštruktú nebude úspešná, ak neodstránime príčinu ochorenia. Ak by sme

totiž pacientovi aplikovali ten najdokonalejšie pripravený transplantát, ale neodstránili danú chorobu, skôr či neskôr sa i tento nový transplantát stane obeťou nevylicenej choroby.

Všetky snahy vedcov v danej oblasti by však mali mať určité etické pravidlá. Nemôžeme pod rúškom pojmu „pre väčšie dobro“ zastierať aj také skutočnosti, ako je kozmetická regenerácia pleti starnúcej ženy embryonálnymi bunkami pochádzajúcich zo stimulovaných potratov afrických alebo ázijských chudobných žien. Podobne je otáznym výskum zameraný na embryonálne kmeňové bunky. Ak vieme, že môžeme pripraviť vlastné kmeňové bunky pacienta, že ich môžeme pripraviť v dostatočnom množstve a diferencovať ich na potrebný typ buniek, ak vieme, že týmto odpadá problém s imunitnou odpoveďou príjemcu, je zarážajúce, prečo sa podporuje prioritne kontroverzný výskum ESC, najmä, ak nie je vyjasnený ich tumorigénny potenciál [11].

### Literatúra

- [1] BLEHA, B. - VAŇO, B.: *Prognóza vývoja obyvateľstva do roku 2025*. Inštitút informatiky a štatistiky, výskumné demografické centrum SR 2007.
- [2] GREENWOOD, H. L. - THORSTEINSDOTTIR, H. - PERRY, G. - RENIHAN, J. - SINGER, P.A. - DAAR, A. S.: In: *Internat. J. of Biotechnology*. 2006, roč. 8, č. 1 - 2, s. 60 - 77.
- [3] *Katechizmus katolíckej cirkvi*, Trnava, Spolok svätého Vojtecha 1999.
- [4] KIM, B. S. - BAEZ, C. E. - ATALA, A.: In: *World Journal of Urology*. 2000., roč. 18, č. 1, s. 2.
- [5] KUBA, D.: *Odberová a transplantačná aktivita v SR*. Martin, SCOT SZU, 2012.
- [6] MALÍŠKOVÁ, L.: *Historický vývoj protéz dolných končetín* (diplomová práca). Zlín, Fakulta multimediálnych komunikácií UTB, 2011.
- [7] OBERPENNING, F. - MENG, J. - YOO, J. J. - ATALA, A.: In: *Nat. Biotechnol.* 1999, roč. 17, s. 149 - 155.
- [8] PETROVIC, V. - STANKOVIC, J. - STEFANOVIC, V.: In: *The Scientific World Journal* 2011, roč. 11, s. 1479 - 1488.
- [9] RANJAN, A. - KUMAR, U. - HARDIKAR, A. A. - PODDA, P. - NAIR, P. - HARDIKAR, A.: *Human Blood Vessel-Derived Endothelial Progenitors for Endothelialization of Small Diameter Vascular Prosthesis*. <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0007718>>
- [10] TONDRA, F.: *Stanovisko k problému transplantácií*. 25. 4. 1998. Komisia pre otázky bioetiky KBS.
- [11] URI, B.-D. - NISSIM, B.: In: *Nature Reviews Cancer* 2011, roč. 11, s. 268 - 277.

*Mgr. Jana Dragúňová, CSc., pracuje ako odborná asistentka v Centrálnej tkanivovej banke pri Klinike popálenín a rekonštrukčnej chirurgie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Je odborníčka v oblasti kultivácie rôznych druhov somatických i kmeňových buniek a podieľa sa na riešení viacerých grantov, súvisiacich s rôznymi oblasťami tkanivového inžinierstva, najmä s prípravou limfálnych kmeňových buniek a kožných náhrad pre popálených pacientov Kliniky.*