

Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen

Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



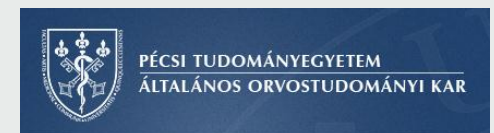
Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen
Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



Dr. Pongrácz Judit

Háromdimenziós szövettenyésztés és „tissue
engineering” – 5. Előadás

BIOREAKTOROK (1)



Statikus sejt kultúrák

- Leggyakrabban alkalmazott sejtenyésztési módszer
- Petricsészékben vagy szövettenyésztő flaskákban
- Adherens sejtek: egyrétegű kultúrák
- Szuszpenzióban növekvő sejtek: viszonylag alacsony sejtsűrűség

Előnyei: nem igényel speciális felszereltséget, viszonylag olcsó és egyszerű technika

Hátrányai: alacsony sejtsűrűség, alacsony metabolikus ráta

Statikus sejt kultúrák hátrányai

- Vaszkularizáció (erezettség) hiánya
- A tápanyagellátás korlátozott
- Oxigénellátás korlátozott
- Anyagcsere-termékek eltávolítása nehézkes
- Gyakori és rendszeres passzálás szükséges
- Gyakori médiumcsere szükséges
- In vivo a dinamikus szöveti és sejtes környezet a fiziológiás

Bioreaktorok: dinamikus sejt környezet

- Folyamatos és dinamikus tápanyag- és oxigénellátás
- 3D szövetkultúra létrehozására alkalmas
- Sejt-sejt kontaktus lehetősége nő
- Sejtkultúrák mechanikai stimulációja lehetséges
- A sejtdifferenciációt a kívánt irányba segítheti elő
- Jóval nagyobb sejtsűrűség érhető el
- A nagyobb sejtsűrűség lehetővé teszi a sejtkultúrák nagyméretű ipari felhasználását

Az anyagtranszport nehézségei 3D szövetkultúrákban

Oxigén és tápanyagok diffúziója:

- A statikus médiumtól a felszíni sejtekhez
- A felszíni sejtektől a mélyebben lévő struktúrákhoz

A tenyésztett sejt/szövetkonstrukció fontos tulajdonságai:

- Porozitás
- Tekeredettség

A **szövet vastagsága** statikus körülmények között nem haladhatja meg a $100 \mu\text{m}$ -t

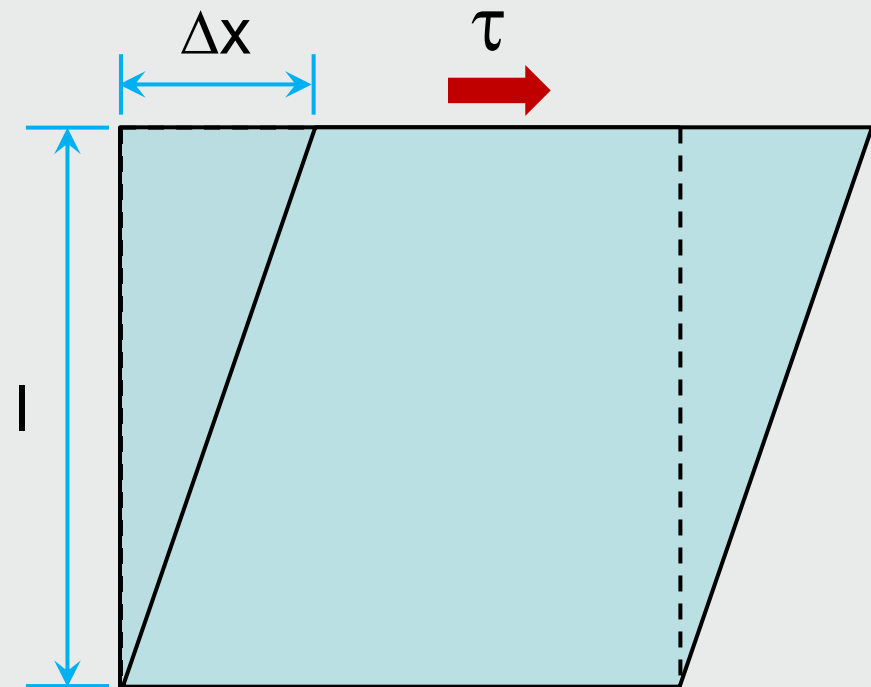
Nyíróerők dinamikusan mozgó folyadékokban

A nyíróerő mértékegysége:

dyn/cm²

1 dyn = 10mN

A nyíróerő, τ (tau) a terhelés alatti anyag belsejéből képzeletben kivágott kis kocka szögelfordulását (torzulását) okozza



Bioreaktorokban fellépő nyíróerő

- A bioreaktorokban fellépő nyíróerők eloszlása nem egyenletes
- A mozgó edény illetve szövetkonstrukció sarkainál és élei mentén nagyobb nyíróerő jön létre
- A bioreaktorok tervezésénél fontos szempont az edényben kialakuló nyíróerő mértékének csökkentése
- A nyíróerők egyenlőtlen eloszlása befolyásolja a sejtek túlélését, sűrűségét, szaporodását, stb.
- Az emlős sejtek által elviselt maximális nyírófeszültség $2,8 \text{ dyn/cm}^2$

Sejteloszlás dinamikus környezetben

- 3D szövetkonstrukciókban a sejtek egyenlőtlenül oszlanak el
- A sejtsűrűség fokozatosan csökken a konstrukció közepe felé
- Sejtek kirakásának nehézségei
- Diffúziós problémák
- Életképes 3D szövetek létrehozása kihívást jelent

Bioreaktorok tervezési követelményei I.

A bioreaktorok alkalmazásának elsődleges célja a statikus sejttenyésztés hátrányainak kiküszöbölése.

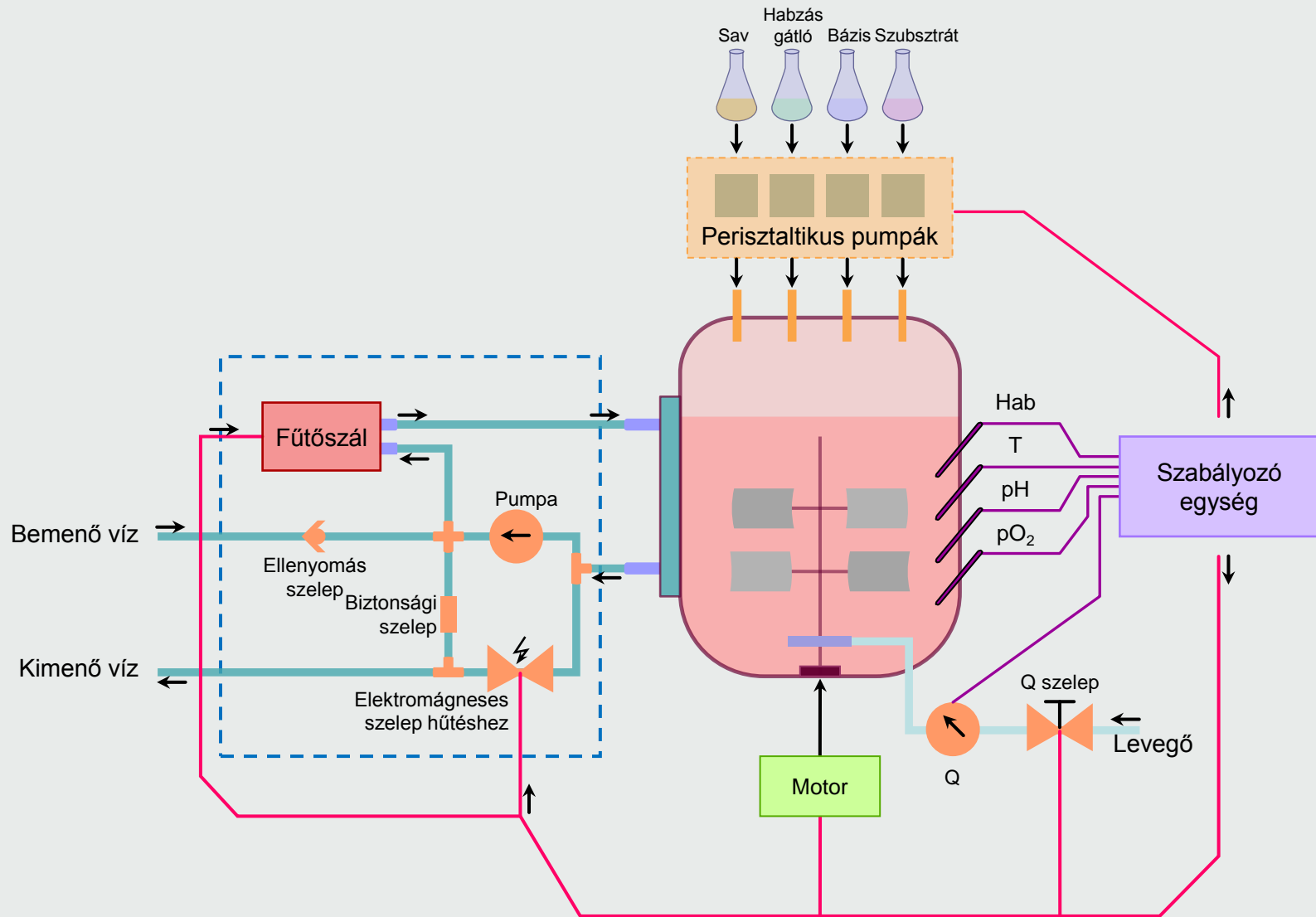
A bioreaktoroknak az alábbi követelmények közül legalább egynek meg kell felelniük:

1. Megfelelő tápanyag– és oxigénkoncentráció fenntartása 3D konstrukciókban
2. Anyagtranszport serkentése 3D kultúrákban
3. Egyenletes sejteloszlás elősegítése 3D konstrukciókban
4. Megfelelő mechanikai stimulusok alkalmazásának lehetősége
5. Információt nyújtson a 3D szövet kialakulásáról

Bioreaktorok tervezési követelményei II.

- A tervezésnél fontos szempont az egyszerűség és könnyen tisztíthatóság
- Mélyedések kialakításának kerülése (fertőzés veszélye, tisztítási nehézségek)
- Egyszerű és gyors össze- illetve szétszerelhetőség
- Biokompatibilis vagy biológiailag inert anyagok használata (krómötvözetek és rozsdamentes acél kerülése)
- Hő- illetve alkoholos sterilizálásnak, magas páratartalomnak ellenálló anyagok alkalmazása
- Alapvető műszerek biztosítása (pl. hőmérő, pH mérő, pumpa, forgatómotor, stb.)

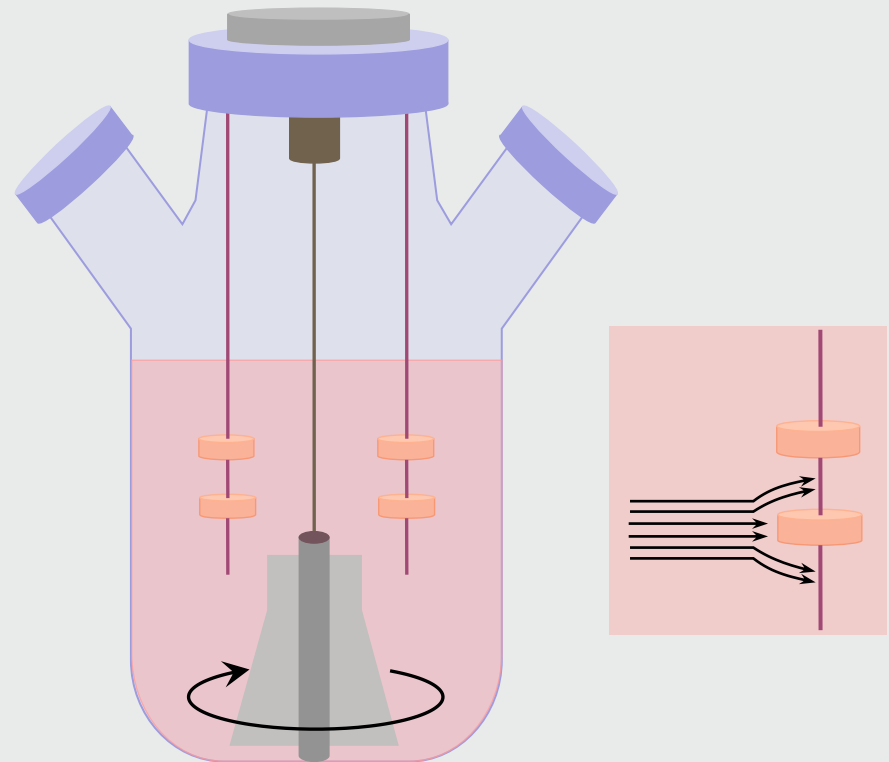
Ipari bioreaktor felépítése



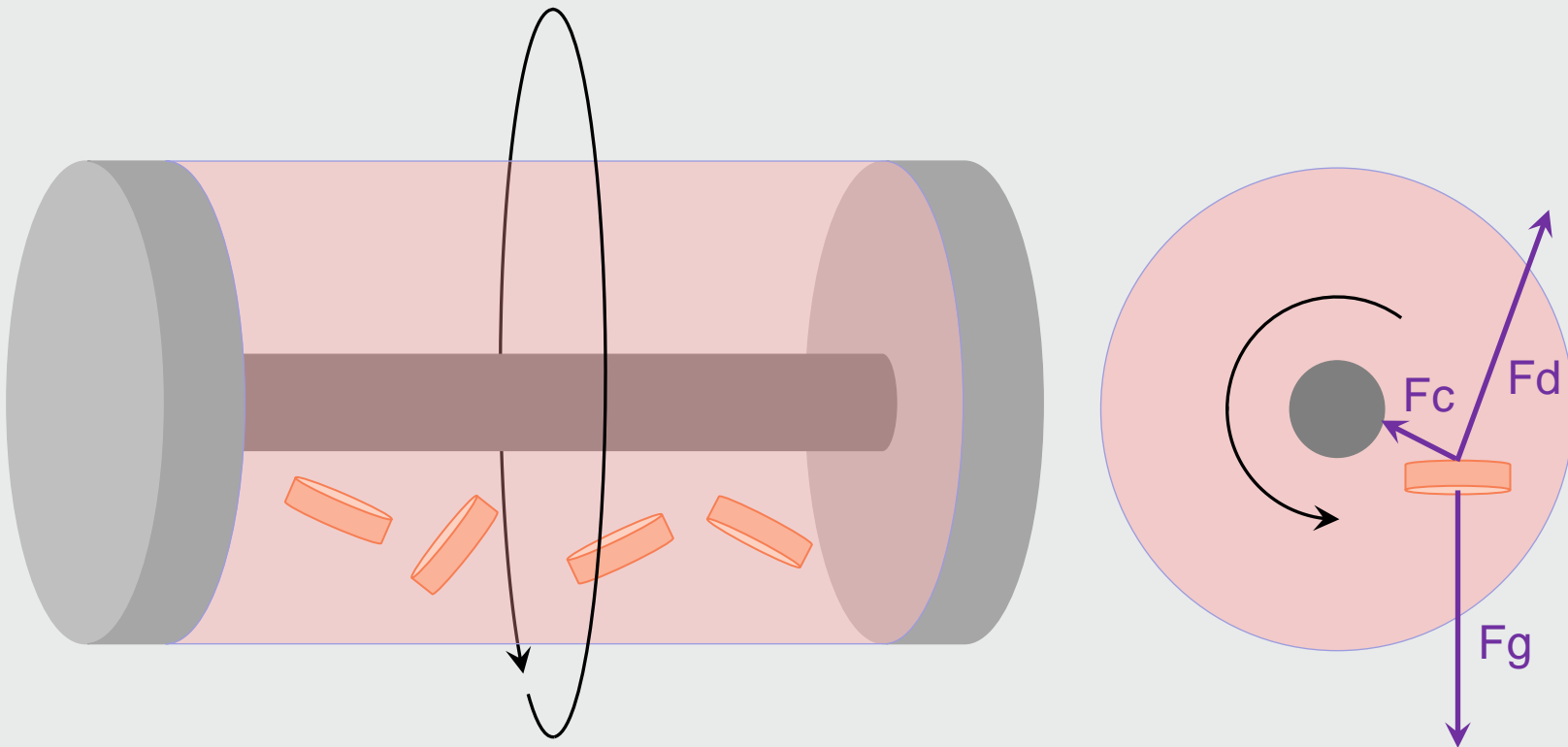
Kevertetett bioreaktorok

- Kevertetett folyadék, szuszpendált sejtek, rögzített „scaffold”-ok
- A „scaffold”-ok szélei körül turbulens áramlás jön létre
- Ez elősegíti a transzportfolyamatokat a „scaffold”-ok belseje felé
- A kevertetés sebessége általában 60-80 rpm, a médium térfogata 120-8000 ml, aminek 50% -át kell cserélni kétnaponta
- TE porcszövet ezen körülmények között akár a 0,5mm vastagságot is elérheti

Kevertetett bioreaktor



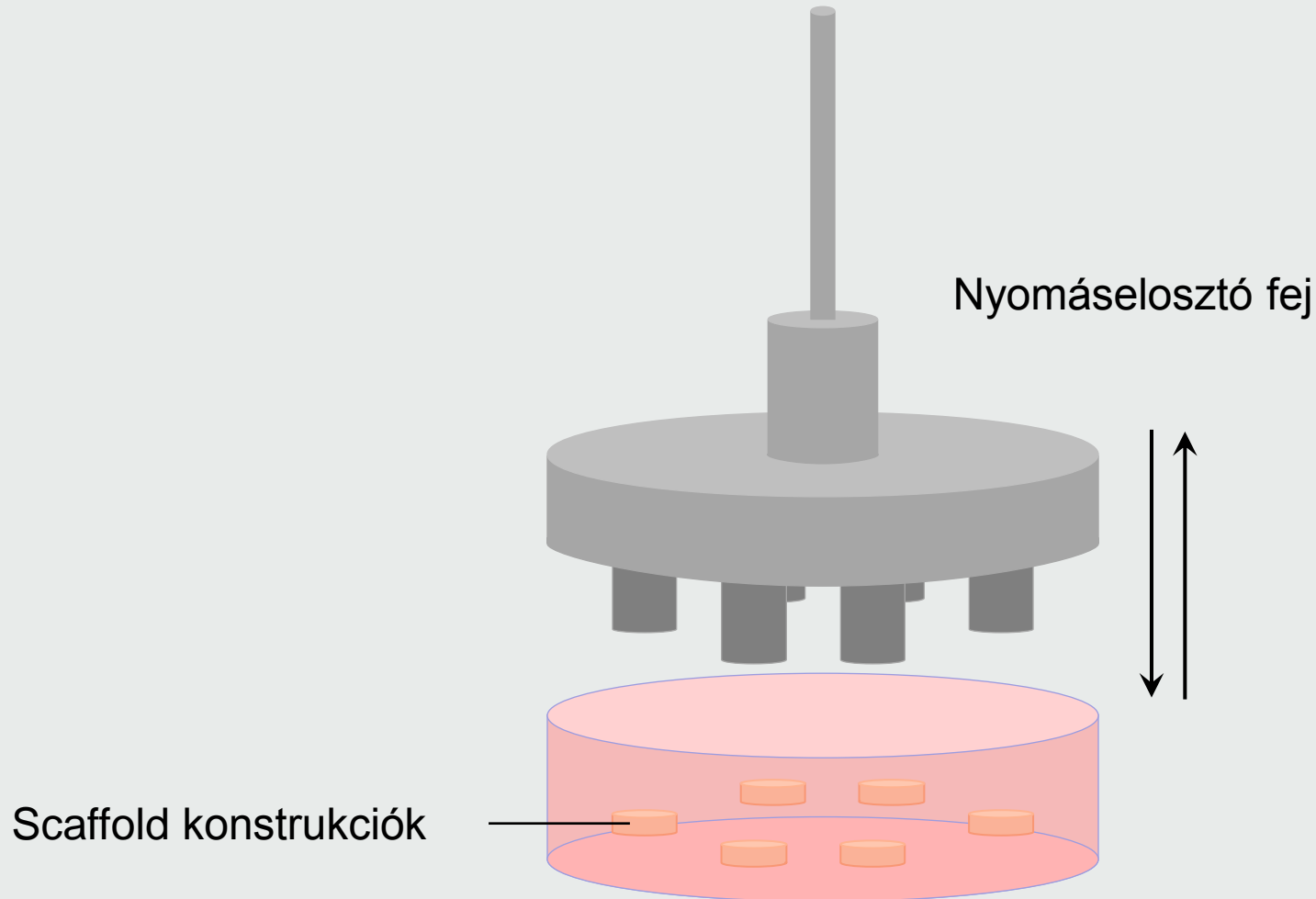
Forgó bioreaktorok I.



Forgó bioreaktorok II.

- Eredetileg a NASA fejlesztette ki arra a célra, hogy a sejtkultúrák vizsgálata nagy gravitációs terhelés mellett is (az űrhajók fel- és leszállásakor) kivitelezhető legyen
- Széleskörű alkalmazás a Földfelszínen
- A „scaffold”-ok szabadon mozognak a médiumban
- Az edény állandó szögsebességű forgómozgást végez a hossz tengelye körül
- A hidrodinamikus felhajtóerő ellensúlyozza a gravitációs erőt, így a „scaffold” gyakorlatilag lebeg a médiumban
- A médiumcsere folyamatos (pumpa), vagy a forgás ideiglenes megszakításával történhet
- Az anyagtranszport a kevertetett bioreaktorhoz hasonló mértékű, a sejtek eloszlása a „scaffold”-okon egyenletesebb a forgó bioreaktorokban

Kompressziós bioreaktorok I.



Kompressziós bioreaktorok II.

- Elsősorban porcszövetek előállításához
- Állandó illetve dinamikusan változó nyomóerő alkalmazása
- Lineáris nyomóerőt létrehozó motor
- Jelgenerátor segítségével kontrollálható lineáris erőtovábbító rendszer
- A „scaffold”-okon tenyésztő sejtekre az erőátvitel sima felületű lemezekén át történik
- A terhelés egyenletes eloszlása kritikus fontosságú
- A porckonstruksiók esetén a megfelelő nyomóerők kialakításához speciális hidrosztatikus kompressziós bioreaktorok használhatók

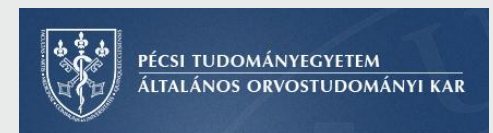
Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen
Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



Dr. Pongrácz Judit

Háromdimenziós szövettenyésztés és „tissue
engineering” – 6. Előadás

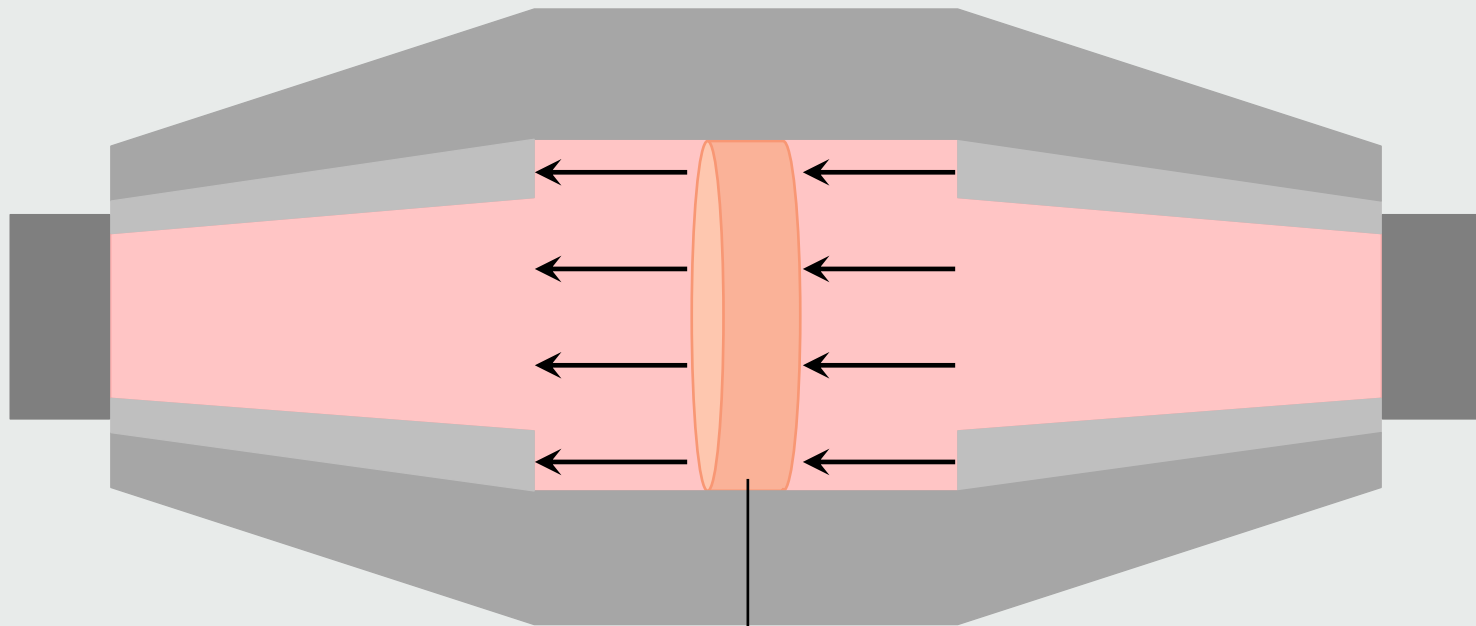
BIOREAKTOROK (2)



Húzó-feszítő bioreaktorok

- Ín, szalag, csont, porc, szívizomszövet
- Állandó vagy pulzáló erőátvitel
- A „scaffold”-okat rugalmas gumimembránhoz csatlakoztatják, amely kapcsokon keresztül rögzül az erőátviteli rendszerhez
- A húzóerő a gumimembránon át a szövetkonstrukcióra tevődik át

Perfúziós bioreaktorok I.



Scaffold rajta
tenyésztett sejtekkel

Perfúziós bioreaktorok II.

- Az anyagtranszport az in vivo feltételekhez hasonló
- A perfúciónak köszönhetően, a diffúzió mellett a folyadékáramlás is részt vesz az oxigén szállításában
- Az anyagtranszport nagyobb távolságokra is megfelelő mértékű
- A médium perfúziója a sejtek kirakására is felhasználható

Porc: szöveti jellemzők és regeneráció

- A porcszövet ECM-ban gazdag, a porcsejtek kondroitin-szulfátot, kollagént, rugalmas rostokat termelnek
- Érmentes szövet, a tápanyagellátás kizárólag diffúzió révén történik
- A porcsejtek anyagcseréje alacsony szintű, súlyos károsodás esetén nem állítható helyre érmentes szövetben
- A porc gyógyulása gyenge mechanikai tulajdonságokkal bíró fibrotikus porcot eredményez
- In vivo a testtömeg valamint az ízületek mozgása dinamikus terhelést jelent a hyalin-porccal borított ízületi felületeknek

TE porcszövet előállításra használt kompressziós bioreaktorok I.

- Statikus kultúrában növesztett porcszövet-aggregátum belső nyomási együtthatója (modulus) a natív szövet mindössze 40%-a
- A mesterségesen előállított porcszövet belső nyomási együtthatója dinamikus terhelés alkalmazásával közel a fiziológias szintig emelhető
- A dinamikus terhelés fokozza a porcsejtek ECM termelését
- Növekedési faktorok hozzáadása (TGF- β) szintén elősegíti a porcsejtek differenciálódását
- A kompressziós terhelés a TGF- β -nál hatékonyabban serkenti a porcsejtek differenciálódását

TE porcszövet előállításra használt kompressziós bioreaktorok II.

- A funkcionálisan teherbíró szövetek, például csont- és porcszövet előállításához megfelelő mechanikai terhelést kell alkalmazni a bioreaktorban
- Ez a terhelés a nyomásérzékeny Ca^{2+} csatornák megjelenéséhez, a citoszkeleton átrendeződéshez, sőt a mezenchimális őssejtek differenciálódásának irányításához is szükséges
- Hátránya, hogy a különböző szerkezeti részek növelik a fertőzés lehetőségét
- A „scaffold”-oknak szintén ellen kell állniuk az alkalmazott mechanikai terhelésnek, ezért - az egyébként nem preferált - masszív és lassan degradálódó scaffold-ok használhatóak

Csontregenerációban alkalmazott „Tissue Engineering”

- Csontkárosodások, valamint forradás nélkül gyógyuló törések
- A folyamat felgyorsítása
- Autológ vagy allogén csontgraft-ok
- Xenograft tesztek

A módszerek hátránya a donor szempontjából:
megnövekedett morbiditás, krónikus fájdalom,
betegség átvitele, fertőzések

Csontszövet előállítás során alkalmazott perfúziós bioreaktorok

- A forgó illetve kevertetett bioreaktorokhoz képest a perfúziós bioreaktorok alkalmasabbak a csontszövet előállítására
- Alkalikus foszfátáz, oszteokalcin és Runx2 expresszió magasabb
- A „scaffold” ásványosodási foka jobb
- Az áramlási sebesség körültekintő beállítására van szükség a nagy nyíróerők kedvezőtlen hatásainak elkerülése miatt
- A váltakozó sebességű áramlás kedvezőbb, mint az állandó sebességű

Kétkamrás bioreaktorok

- Két különálló kamra
- Különböző sejtípusok egyidejű tenyésztése
- Alkalmazás: humán légcső előállítása

A bioreaktor-tervezés legújabb eredménye

TE humán beültethető légcső:

- A donorsejtektől megtisztított légcső külső felszínére a recipiens autológ porcsejtjeit, belsejébe pedig légúti epitélisejteket ültettek
- A térben elkülönült két „kamra” így lehetővé tette különböző sejtek egyidejű tenyésztését
- Tuberkulózis miatt légcsőszűkületben szenvedő betegbe ültették

A jelenlegi bioreaktorok hátrányai

- Rendkívül munkaigényes technológia
- A jelenlegi bioreaktorok nagyon specializált berendezések
- Bonyolult össze- és szétszerelhetőség
- A megfelelő számú sejt növesztése lassú, és nem elég hatékony
- A bioreaktorban fejlődő szövet szerkezetének és egyéb tulajdonságainak valós-idejű monitorozása nem megoldott