

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



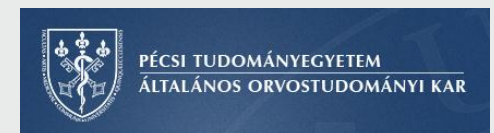
Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen
Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



Dr. Pongrácz Judit

Háromdimenziós szövettenyésztés és „tissue
engineering” – 13. Előadás

SZABÁLYOZOTT HATÓANYAG-LEADÁS



Szabályozott hatóanyag-leadás scaffold-okból

- Hatóanyag-leadás mátrix-degradáció során
- Hatóanyag-leadás diffúzióval
- A hatásos helyi koncentráció hosszú távú fenntartása
- Helyi hatás biztosítása
- Szisztémás, egész szervezetet érintő hatások korlátozott fellépése

Ideális scaffold

- 3-dimenziós átlátható mikroszerkezetű
- Egymással kapcsolatban levő pórusok hálózata
- A mechanikai tulajdonságok hasonlóak az eredeti szövetéhez
- Biokompatibilis és biodegradábilis
- Szabályozott lebomlás és felszívódás
- Bioaktív faktorok helyi tárolása és szabályozott, specifikus leadása
- A szöveti regeneráció folyamatának irányítása és serkentése

A scaffoldok mint az ECM helyettesítői

- Az ECM az a természetes közeg ahol a sejtek proliferálnak, differenciálódnak és vándorolnak
- Az ECM nagyfokúan rendezett dinamikus biomolekuláris környezet, ahol a sejtek viselkedését irányító faktorok és jelek folyamatosan keletkeznek és tárolódnak
- A jelmolekulák leadása lokális és sejtes ingerek hatására történik
- A leadás a mindenkori szükségletnek megfelelően történik, ahogy az őket ECM-hez kapcsoló kötőhelyek degradálódnak

Az ECM és a növekedési faktorok

- A növekedési faktorok lokálisan tárolódnak az ECM molekuláihoz kötődve
- A tárolás oldhatatlan vagy inaktív formában történik
- Specifikus kötődés glükóz-aminoglikánokkal (pl. heparinok)
- Csak felszabadulásuk esetén mutatnak biológiai aktivitást
- Az ECM kötődés koncentrációgrádiensét is biztosít amely fontos pl. a morfogenezisben

Az ECM funkciók mimikálása

- A jövő TE scaffold-jainál szükséges a bioaktivitás és a funkciók kiterjesztése
- A szintetikus bio-scaffoldok ECM-hez hasonlító funkciókat közvetítenek
- A bioaktív molekulák kontrollált leadásának képessége lehetővé teszi a sejtviselkedés kontrollját és a sikeres regenerációt

Mátrixban elosztatott jelmolekulák

- A hidrogéleket (természetes vagy szintetikus) széles körben sikeresen használják a bioaktív fehérjék kontrollált leadására.
- A bioaktív molekulákat egyszerűen összekeverték a polimerrel és így ezek a mátrixba ágyazódnak a geláció során
- Mind természetes (kollagén, fibrin, hyaluronsav) mind szintetikus hidrogélek (PEG-alapú vagy peptid-alapú) hidrogélek széles körben használhatók erre a célra
- A hatóanyag-leadási tulajdonságok a gélekben egyszerűen változtathatók bizonyos keresztkötéseket képző anyagok hozzáadásával
- A szilárd scaffold-ok esetében a gyártás/előállítás módszerének kíméletesnek kell lennie, mert a bioaktív molekulák (pl. fehérjék) denaturálódva elveszíthetik biológiai aktivitásukat

Jelmolekulák immobilizációja a scaffold-ban

- A scaffold-ot alkotó polimerek kémiai módosításával lehet elérni a jelmolekulákkal való szorosabb interakciót
- Az scaffold-hoz kötött, immobilizált jelmolekulák felszabadulása időben elnyújtott
- Mind reverzibilis mind irreverzibilis kötődés lehetséges a polimerhez
- A leadás vagy a polimer mátrix vagy a hatóanyag kötődését biztosító csoport lebomlása során következik be
- A kötődő jelmolekulák mennyiségét és a felszabadulási profilt befolyásolja:
 - A kötőhelyek száma
 - A jelmolekula affinitása a kötőhelyhez
 - A scaffold anyagának degradációs sebessége

Élő sejtekből származó jelmolekulák

- A célfehérjét kódoló nukleinsavak (NS) transzfekeciója a sejtekbe
- A transzfekecióval módosított sejtek kiválasztják a célfehérjét
- Antisense oligonukleotidok alkalmazásával gátolható és tetszés szerint szabályozható az abnormálisan magas géneexpresszió
- Az adhéziós helyeket (pl. RGD motívum) tartalmazó szintetikus polimerek nagyobb hatékonyságúnak bizonyultak a plazmid sejtekbe való bejuttatásában

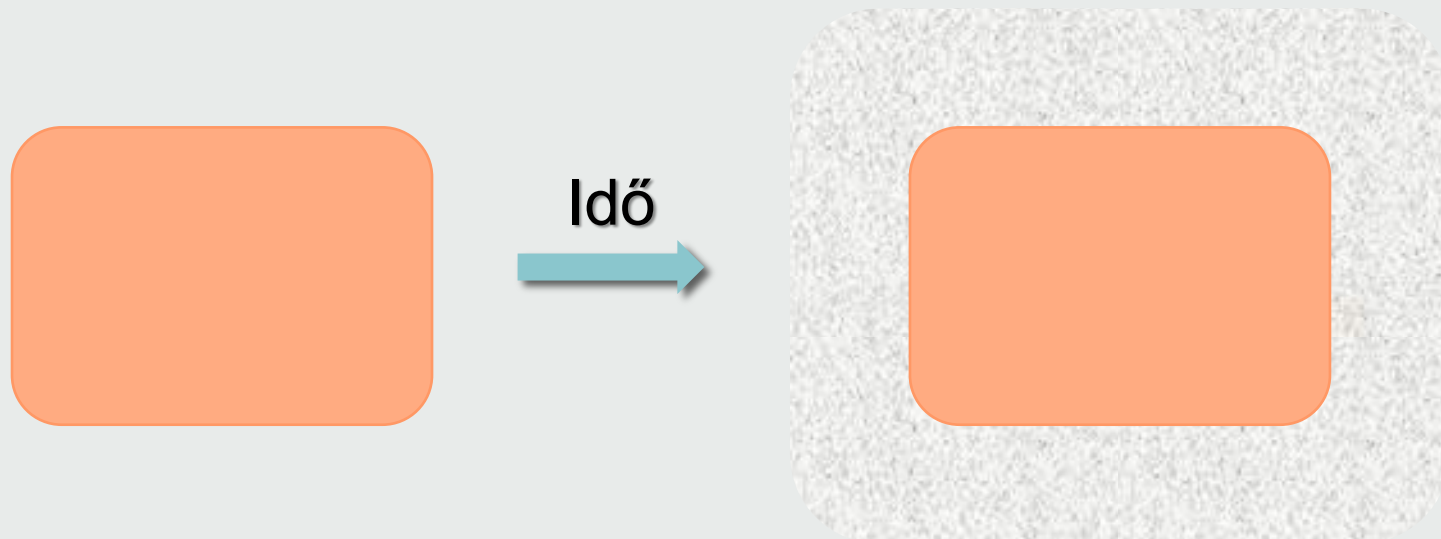
Fehérjék szabályozott leadását végző rendszerek

- A szabályozott leadó-rendszernek meg kell akadályoznia a fehérje inaktivációt vagy degradációt
- A leadási profil finomhangolása a hordozó polimer összetételének, alakjának és szerkezetének a változtatásaival végezhető
- Folyamatos vagy szakaszos leadási profilok
- Biodegradábilis vagy nem-degradábilis rendszerek

Nem-biodegradábilis rendszerek

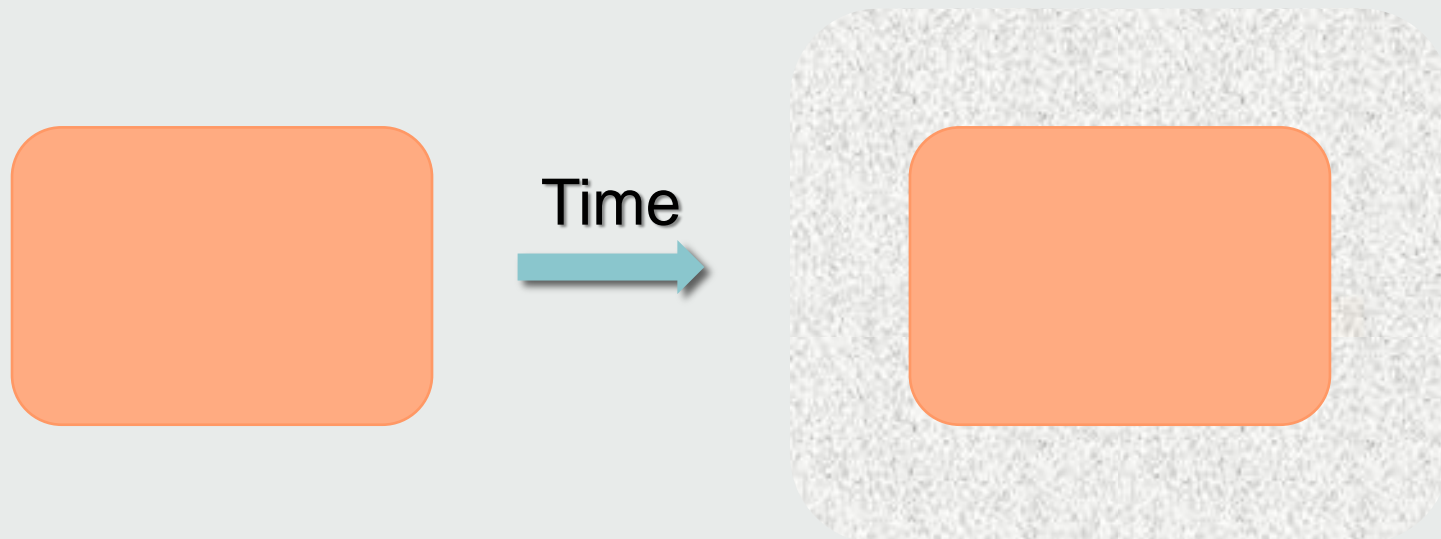
Etilén-vinil -acetát kopolimerek (EVAC) és szilikonok:

- A porózus polimerszerkezeten keresztüli transzport az egyetlen sebességmeghatározó lépés
- Lehetséges alkalmazás sejtek enkapszulációjában, így akadályozva meg az immunrendszer által való felismerést



Biodegradábilis rendszerek

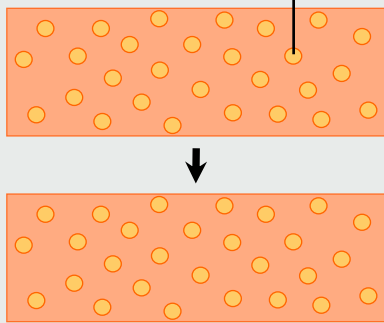
- A PLGA nagyon rugalmasan és széleskörűen alkalmazott alapanyag
- A poli-ortho észterek újabban kerültek az érdeklődés középpontjába (nem szükséges hevítése vagy toxikus oldószerek alkalmazása, injektálható polimerek)
- A polianhidridek általában felszíni erózió útján degradálódnak amelynek a kinetikája kedvezőbb



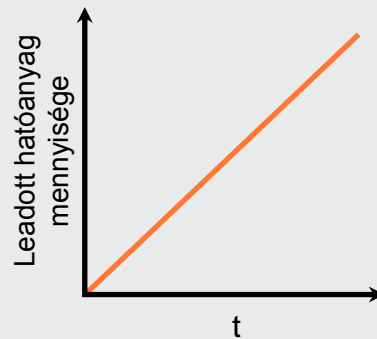
Szabályozott hatóanyag-leadási profilok egyes biodegradábilis rendszerekben

Felületi erózió

Fehérje vagy kismolekulájú hatóanyag

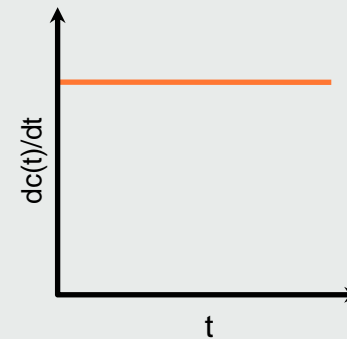


Tipikus leadási profil



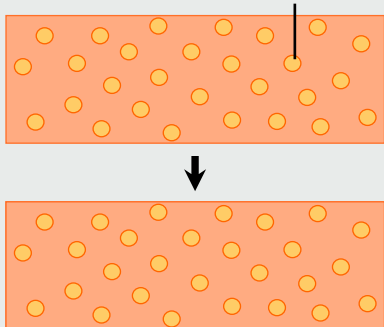
Aktuális összmennyiséghez viszonyítva

Leadási arány

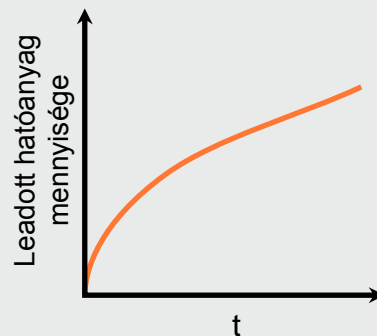


Belső erózió

Fehérje vagy kismolekulájú hatóanyag

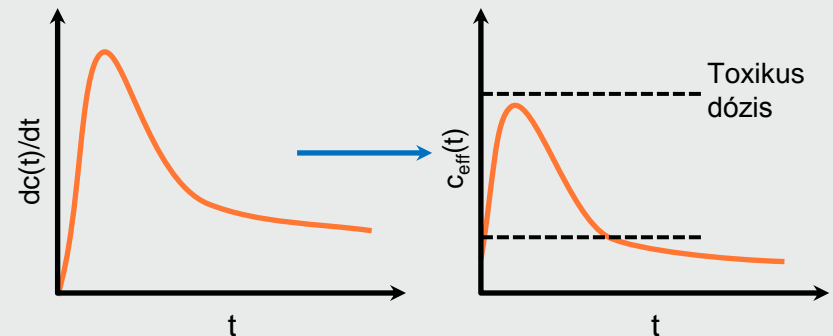


Tipikus leadási profil



Aktuális összmennyiséghez viszonyítva

Leadási arány



On-off hatóanyag-felszabadító rendszerek

- Fehérjék és peptidek szakaszos felszabadítása
- Gyors és átmeneti felszabadítása egy adott mennyiségű hatóanyagnak rövid időn belül egy előre meghatározott leadási szünet után
- Csoportosítás: **programozott** és **indukálható hatóanyag-felszabadító rendszerek**
 - Programozott rendszerek: Rendszerbe beépített belső mechanizmus által szabályozott hatóanyag-leadás
 - Indukálható rendszerek: A hatóanyag-felszabadítást a szervezet élettani változásai vagy más, külső stimulusok szabályozzák
- Külső stimulusok lehetnek hőmérsékleti, változások, elektromos vagy mágneses mező változásai, ultrahang vagy más besugárzás

Programozott és indukálható hatóanyag-leadási rendszerek

- Speciálisan tervezett szintetikus polimerek képesek programozott hatóanyag-leadásra
- Mind felszíni-, mind belső eróziós rendszerek alkalmazhatóak erre a célra.
- A glükóz-érzékeny inzulin-leadás iránt van legnagyobb piaci érdeklődés
- Az „intelligens” rendszer immobilizált glükóz-oxidázt tartalmaz, pH-érzékeny hidrogélt alkotó polimerben
- A gélben inzulin van elvegyítve
- Ha a gélbe glükóz diffundál, a glükóz-oxidáz glukonsavvá alakítja és így a pH csökken
- A pH csökkenése a gél fokozott duzzadását és inzulin-felszabadulást okoz

Hatóanyagok scaffold-okba foglalása

Antibiotikumokkal (általában aminoglikozidok) **töltött poli-metil-metakrilát (PMMA) gyöngyök** :

- Ortopédiai vagy baleseti sebészeti alkalmazás
- Krónikus csontvelőgyulladás és/vagy fekélyek kezelése
- A csontokban és ízületekben a szisztémás antibiotikum-kezelés általában nem képes elérni a hatékony hatóanyag-koncentrációt a korlátozott vérellátás miatt
- A PMMA gyöngyök fokozatosan szabadítják fel az antibiotikumokat
- Magas helyi hatóanyag-koncentráció
- Kedvező szisztémás mellékhatás-profil

Bioaktív fehérjék scaffold-ba foglalása

A VEGF szerepe a szöveti vaszkularizációban:

- Hipoxiás szövetekben levő sejtek VEGF-t szekretálnak
- VEGFR expresszió endotel-sejteken
- A VEGF serkenti az endothelsejtek proliferációját
- Irányítja az endothelsejtek migrációját
- A TE szövetkonstrukciók tápanyag- és oxigénellátása kritikus a túlélés és a növekedés szempontjából
- A VEGF szabályozott leadása emiatt a TE kutatások fókuszában szerepel

A VEGF serkenti a TE szövetek vaszkularizációját

Szabályozott VEGF leadás alginát mikrogöngyökből:

- Alginát keresztkötések kialakítása kettős töltésű kationok segítségével
- A VEGF enkapszulációs hatékonysága a kationtól függ (Ca^{2+} vagy Zn^{2+})
- A Zn^{2+} -ionok kizárólagos alkalmazása toxikusabbnak mint a Ca^{2+} ionoké
- A Ca^{2+} és a Zn^{2+} ionok vegyes alkalmazása bizonyult a legjobbnak

A szöveti differenciálódás serkentése bioaktív fehérjék segítségével

BMP-2:

- A BMP-2 kulcsfontosságú szerepet játszik az oszteoblaszt differenciációban
- Rekombináns hBMP-2 feloldása polietilén-oxid (PEO) vizes oldatában
- A rhBMP-2 oldatot ezek után hozzáadják a scaffold anyagához
- A scaffold-ok lehetnek selyem fibroin, PCLA, PEG, PLGA, kollagén, stb.

Kísérleti eredmények szabályozott hatóanyag-leadású scaffoldokkal – VEGF

- A VEGF fél-életideje csupán 50 perc, ezért elkerülhetetlen a szabályozott hatóanyag-leadású rendszerek alkalmazása
- A szabályozott hatóanyag leadás a VEGF esetében az elektrosztatikus interakciókon alapul (savas zselatin, IEF=5,0) és VEGF (IEF=8,6)
- A zselatin scaffold kereszt kötéseinek mennyisége is befolyásolja a leadási sebességet
- A teljes VEGF mennyiség 90%-a 30 napon belül, a 80%-a az első 5 napban szabadult fel a szubkután implantátumokból.

Klinikai eredmények szabályozott hatóanyag-leadású scaffoldokkal – BMP-2

- A BMP-2-vel töltött kollagén szivacsokat alkalmaznak a csontgyógyulás és fúzió elősegítésére a gerinc degeneratív betegségeinek műtétei után
- A BMP-2 kezelést kapott betegek gyógyulása szignifikánsan gyorsabb, az önellátási képesség és a mobilitás visszanyerése gyorsabb, és a műtét után is kevesebb fájdalmat tapasztalnak
- A hangulati és érzelmi stabilitás is nagyobb a BMP-2 kezelt betegeknél, mint a kezelésben nem részesült kontrollcsoportban

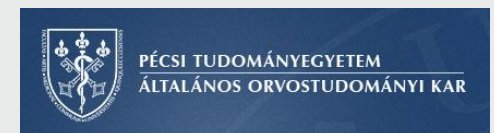
Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen
Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



Dr. Pongrácz Judit

Háromdimenziós szövettenyésztés és „tissue
engineering” – 14. Előadás

BIOSZENZOROK

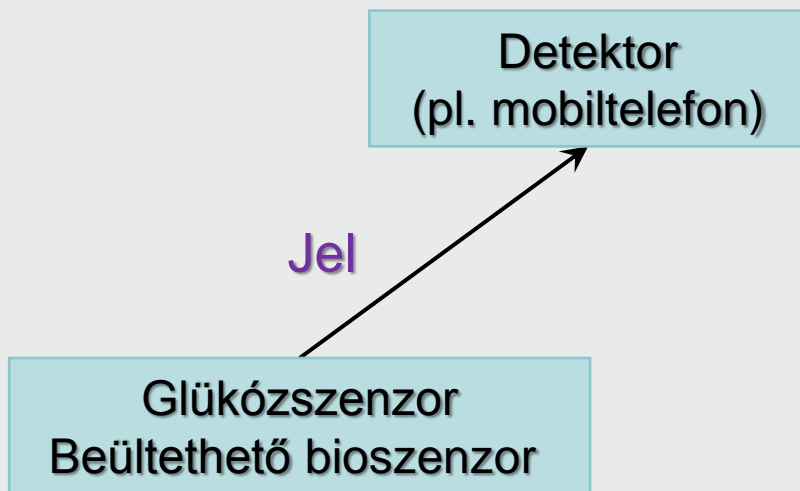


Definíció

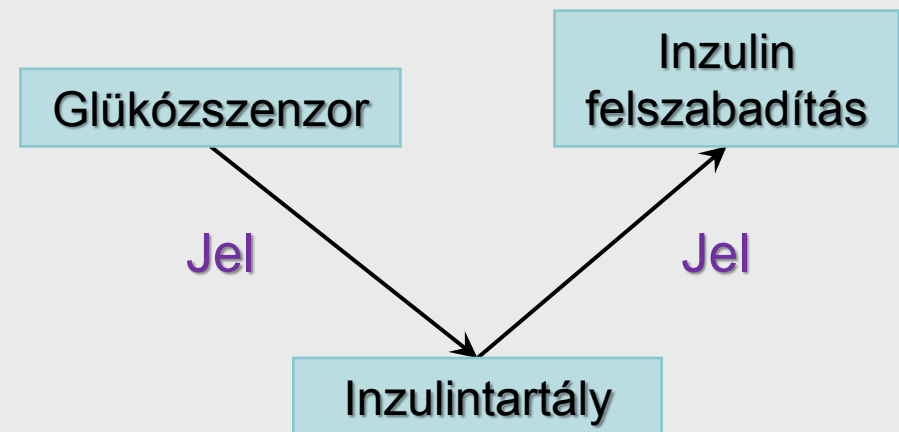
A bioszenzor egy olyan készülék, amely egy biológiai jelet érzékel vagy alakít át egy jobban érzékelhető jellé.

Beültethető glükóz-szenzor koncepció

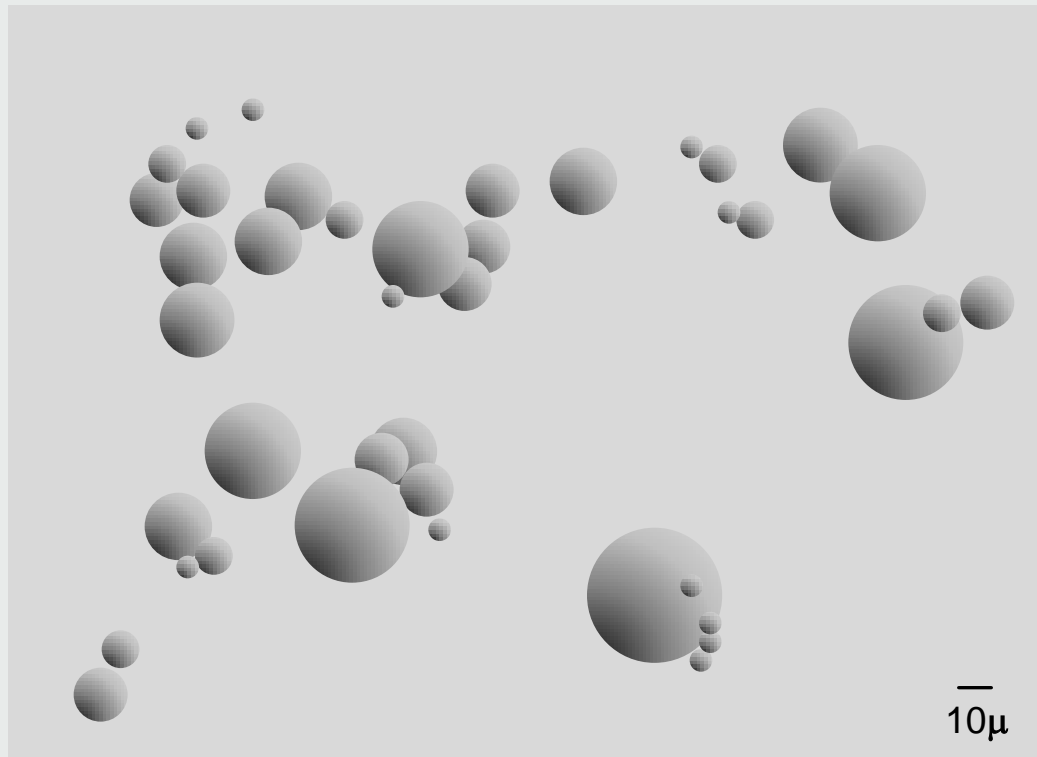
I-es típus



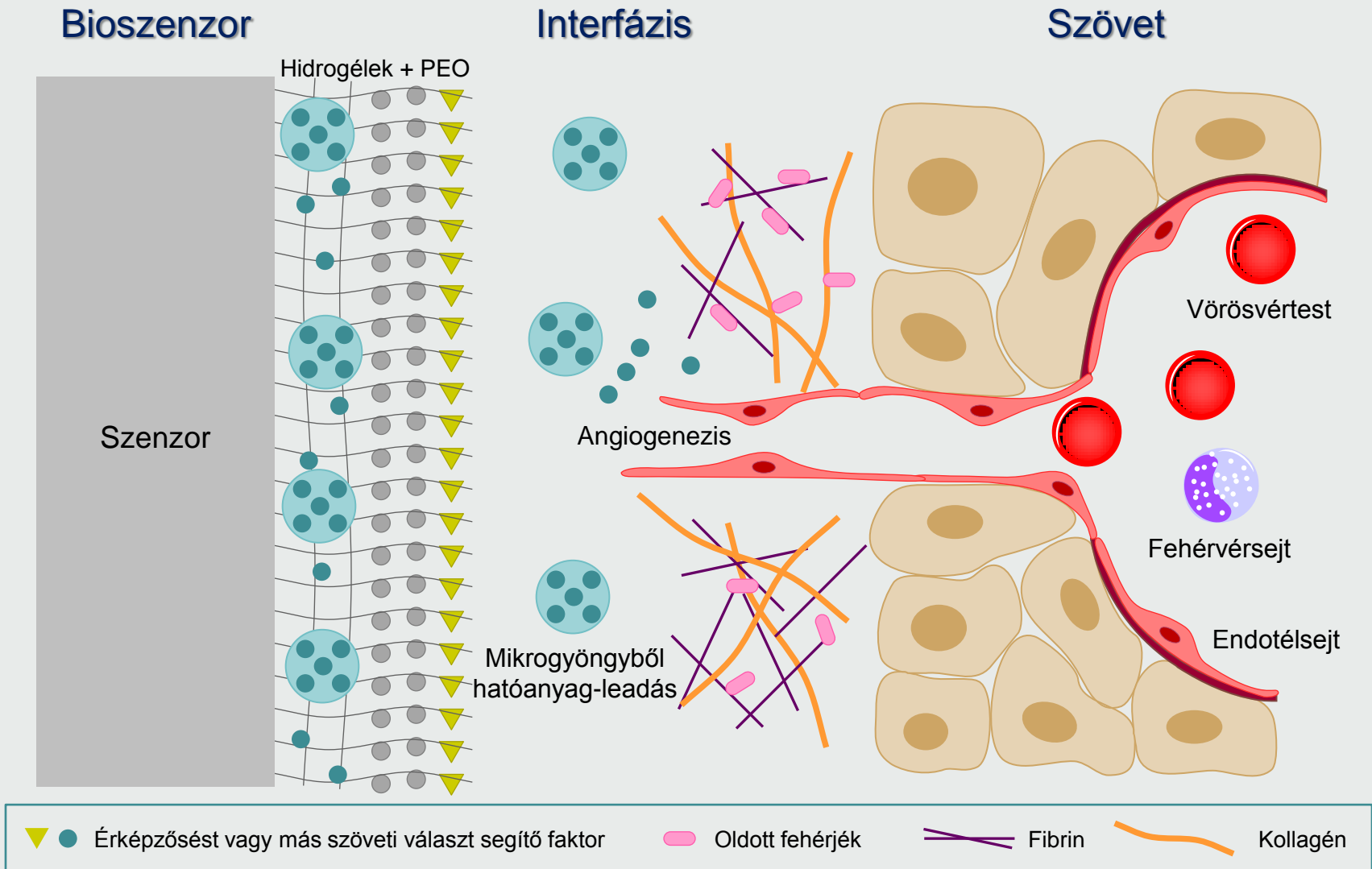
II-es típus



Dexamethasonnal töltött PLGA mikrogöngyök



Bioszenzor-szövet interakció



Az“intelligens” rendszer

- pH-reszponzív polimer hidrogélből, a gélben immobilizált glükóz-oxidázból, valamint telített inzulin oldatból áll.
- A glükóz a hidrogélbe diffundál, a glükóz-oxidáz glükonsavvá alakítja, ami a membrán mikrokönyezetében a pH csökkenéséhez vezet.
- Az alacsony pH hatására inzulin szabadul fel.

Megbízható glükóz bioszenzor kifejlesztéséhez szükséges:

1. Új elektródák szükségesek az implantálható bioszenzor invazivitásának csökkentésére;
2. Bioaktív borítás szükséges a beültethető bioszenzor élettartamának növelésére;
3. Elektroszövással előállított bioaktív nanoszálak borítások kialakítása a bioszenzorok számára;
4. A szöveti válaszok nagyobb részletességű ismerete szükséges a fiziológiásabb bioszenzor-válasz kialakításához;
5. Szükséges a glükóz-szenzor körüli érzékelés serkentése, hogy a vércukor szintjének mérése gyorsabban és könnyebben létrejöhessen;
6. Új, biológiailag stabil és kompatibilis kollagén bioszenzorok kialakítása szükséges.