

Lidské tkáně a buňky

Tkáňové zařízení

Rita Pacasová/ Simona Michlíčková

Transplantace

♦ transplantace

- orgánů - v podvědomí veřejnosti
- tkání - méně známá
- buněk - v povědomí veřejnosti ve spojení s onkologií

♦ transplantace tkání a buněk = denně používaná metoda v mnoha oborech medicíny

♦ transplantuje se tzv. tkáňový nebo buněčný štěp (graft nebo transplantát)

♦ část tkáně anebo buňky jsou odděleny z jejich původního místa a jsou přeneseny na jiné místo (tkáně) nebo na stejné místo v jiném čase (buňky i tkáně)

Transplantace - typy

Dělení dle dárce a příjemce

- ♦ **autologní** transplantace je přenos štěpu (tzv. autologní štěp) v rámci jednoho jedince (dárce je totožný s příjemcem)
- ♦ **alogenní** transplantace je přenos štěpu (tzv. alogenní štěp) mezi dvěma jedinci téhož druhu (dárce je jiný jedinec téhož druhu)
- ♦ **xenogenní** transplantace je přenos štěpu mezi dvěma jedinci rozdílného druhu (např. prasečí nebo bovinní chlopeč pro použití u člověka).

Transplantace tkání a buněk

📄 Konzervace a skladování tkání/ buněk po určitou dobu:

Chladová konzervace

- krátkodobé skladování při teplotě +2 až +8°C
- vhodná zejména pro zachování buněčné viability (krvetvorné buňky, rohovka)

Konzervace hlubokým zmrazením

- dlouhodobé uskladnění při teplotě - 40°C a nižší
- nejobvyklejší metoda konzervace kostních štěpů, vazů a šlach, amniové membrány

Kryokonzervace

- přidání kryoprotektivní látky, dlouhodobé uložení při teplotě -150°C a nižší (páry N₂, nebo kapalná fáze N₂), zejména krvinečné buňky

Lyofilizace

- konzervace upravených kostních štěpů, např. čištěné spongiosy, pro konzervaci fascie, skléry.
- umožňuje dlouhodobé skladování při pokojové teplotě.

Transplantace - historie


📄 od pradávna = snaha o náhradu funkčně poškozené nebo ztracené části lidského těla (orgány, tkáně, části končetin nebo lidskou krev).


📄 transplantace v období starověku


- 2. století př. n.l. - záznam o **transplantaci tkání a orgánů**
 - čínští chirurgové Hua T' o a Pien Ch' iso
- Sushruta Shamhita, indický text v sanskrtu - popis **transplantace autologního kožního štěpu**
- 3. století n.l. - malba, znázorňující **transplantaci nohy** - svatý Kosmos a Damián (285 - 305), bratři, studovali medicínu v Sýrii, přisuzovány zázraky a léčivé schopnosti.

Transplantace - historie

 transplantace v západní medicíně:

 **16. století**, Gaspar Tagliacozzi (1547 - 1599) práce „O chirurgii zmrzačených částí pomocí transplantace“.

 **1668** holandský lékař Job van Meereken - popis první úspěšné transplantace kosti (xenogenní), defekt lebeční kosti ruského vojáka (rána šavlí), vyplnění tkáňovým štěpem z lebky psa, „nekřesťanský“ způsob léčby - exkomunikace pacienta z církve - žádost o vyjmutí štěpu (štěp již zhojen).

 **1867** francouzský chirurg a vědec L. Ollier - na základě zvířecích experimentů dokazuje **životnost autologních kostních štěpů**

Transplantace - historie

- 1820 první klinický přenos **autologní kosti** provedl německý lékař Philips von Walter (lebeční kosti)
- 1880 - první **alogenní transplantace kosti** - skot William MacEwen ve Skotsku, úspěšná rekonstrukce zanícené pažní kosti 4-letého chlapce štěpem získaným z holenní kosti amputované dolní končetiny dospělého muže
- 1915 kniha F. H. Albee „ **o chirurgii kostních štěpů**“, popis velkého množství klinicky úspěšných kostních transplantací, některé popsané techniky a nástroje používány dodnes. Následek => vzrostl počet kostních transplantací.
- 1908 Alexis Carrel (1873 - 1951) „ Výsledky transplantací krevních cév, orgánů a tkání“, s Claude Guthriem vyvinul metodu **jemného pokračovacího stehu spojovacího cévy** = počátek cévní chirurgie. Propagoval myšlenku o **zásobách tkání**, položil vědecký **základ metodám konzervací tkání**.

Transplantace - tkáňové banky

- zpočátku specializované podle druhu odebíraných tkání - oční banky, kostní banky apod.
- 30. léta 20. století - zahájení transplantačního programu tkání v Sovětském svazu. Zakladatel Dr. Filatov, **prvním transplantovaný kadaverózní štěp (rohovka)**.
- 50. léta 20. století vznik prvních „vícetkáňových“ banky.
- 1950 založena v USA založena Tkáňová banka Amerického vojenského námořnictva (US Navy Tissue Bank), orientace na odběry kadaverózních tkání, výzkum **konzervace a sterilizace tkání, nástin etických otázek** oboru.
- 1952 - první tkáňová banka v Evropě = tkáňová ústředna v **Hradci Králové** a také **tkáňová banka v Brně**.
- Od 50. let 20. století prudký rozvoj a postupný vznik samostatné legislativy

Legislativa TZ - EU

- Výrobu lidských tkání a buněk upravují 3 směrnice Evropského společenství
- 📄 2004/23/ES ze dne 31.3.2004 - o stanovení jakostních a bezpečnostních norem pro darování, odběr, vyšetřování, zpracování, konzervaci, skladování a distribuci LTB, novelizace 2010
- 📄 2006/17/ES ze dne 8.2.2006 - technické požadavky na darování, opatřování a vyšetřování LTB, novelizace 2015
- 📄 2006/86/ES ze dne 24.10.2006- sledovatelnost a oznamování závažných nežádoucích reakcí a událostí a technické požadavky na kódování, zpracování, konzervaci, skladování a distribuci LTB

Legislativa TZ - ČR

Zákon 100/2017 Sb., o darování, odběrech a transplantacích tkání a **orgánů** (transplantační zákon).

Zákon 296/2008 Sb. o lidských tkáních a buňkách
(platnost od 1.1.2009)

Novelizace: 2014, **2017**

Vyhláška 422/2008 Sb. o LTB
(platnost od 1.5.2008)

Novelizace: 2015, **2017**

Dohled státní autority

Zpracování LTB je možné provádět v TZ po získání

Rozhodnutí o povolení k činnosti TZ

Vydává Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) Praha

Provádí pravidelné kontroly činnosti - audits (2-letý interval)

Dárci tkání a buněk - žijící

Dárce LTB se může stát osoba, která

- ☐ s darováním vysloví svobodný, informovaný a konkrétní souhlas,
- ☐ splňuje kritéria pro výběr dárců (zdravotní způsobilost)

Autologní žijící dárce

- ☐ V případě že **osoba daruje tkáň sama sobě**
 - např. o odběr tkáně na kultivaci buněk pro vlastní léčbu pacienta-dárce nebo o odběr tkáně, její uschování a pozdější navrácení pacientovi-dárce.

Alogenní žijící dárce

- ☐ Nejčastější je **darování tkáně, odebrané při operaci** a která by byla zlikvidována
 - např. hlavice stehenní kosti při náhradě kyčelního kloubu endoprotézou, části kožní tkáně a tuková tkáň při rekonstrukčních a plastických operacích, darování placenty po porodu.

Dárci tkání - zemřelí

Dárcem se může v České republice stát zemřelá osoba, která

- ☞ za svého života **nevyslovila prokazatelný nesouhlas** s posmrtným odběrem tkání a orgánů,
- ☞ **splňuje kritéria pro výběr** dárců (zdravotní způsobilost)

Od zemřelé osoby lze odebrat a použít pro transplantaci

tkáně: oční,
muskuloskeletální,
kožní,
srdeční,
cévní.

Dárci tkání - zemřelí


☰ Nesouhlas s posmrtným odběrem tkání a orgánů se považuje za prokazatelně vyslovený, pokud

- je zemřelý evidován v Národním registru osob nesouhlasících s posmrtným odběrem tkání a orgánů,
- zemřelý nebo zákonný zástupce nezletilé osoby nebo zákonný zástupce osoby zbavené způsobilosti ještě **za svého života** přímo **ve zdravotnickém zařízení** před ošetřujícím lékařem a jedním svědkem prohlásí, že nesouhlasí s odběrem po své smrti,

registrace v Národním registru osob nesouhlasících s posmrtným odběrem tkání a orgánů najdete na stránkách registru.

www.nrod.cz

Dárci tkání - zemřelí

 **Kritéria, které vylučují zdravotní způsobilost alogenního dárce tkání:**

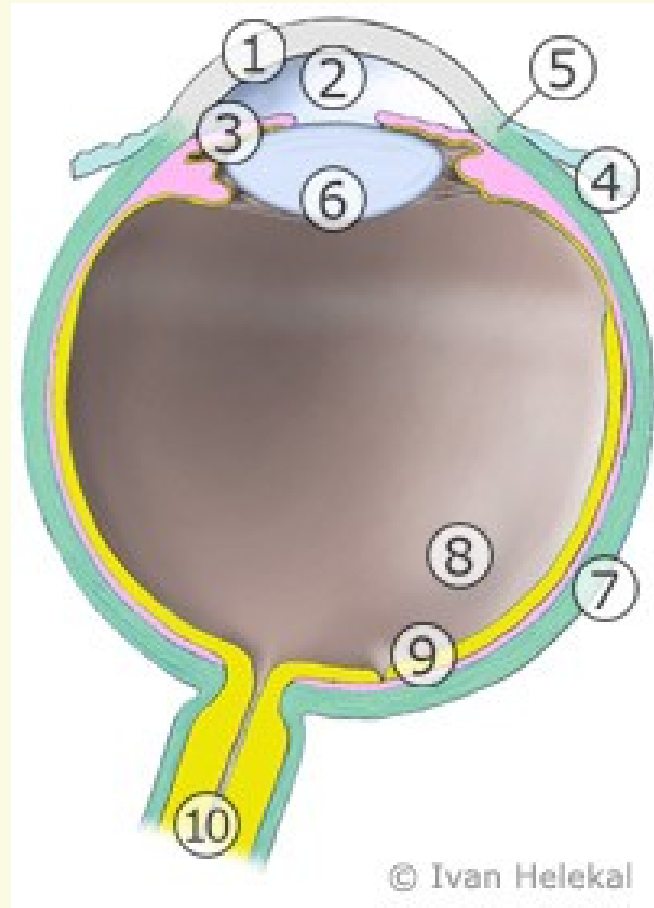
- infekční choroby: pozitivita na HIV nebo rizikové chování, sepse, virová hepatitida B, virová hepatitida C, syfilis, tuberkulóza, systémová mykóza,
- pozitivní virologické testy na HIV 1,2, HBsAg, HCV, syfilis,
- Creutzfeld-Jakobova nemoc nebo jiná prionová onemocnění nebo podezření na ně,
- maligní nádorová onemocnění (s výjimkou některých lokalizovaných nádorů a darování rohovek),
- systémová onemocnění se závažnými dopady na tkáně určené k transplantaci (autoimunitní choroby, neurodegenerativní choroby),
- chronická hemodialýza,
- intoxikace,
- smrt utonutím.

Typy tkání - oční

- 📄 Odběr očních bulbů (případně rohovek nebo sklér) se provádí od zemřelých dárců
- 📄 Transplantace rohovky (keratoplastika) je **nejčastěji prováděnou transplantací v humánní medicíně**. Zároveň je nejúspěšnější transplantací pevné tkáně.
 - u pacientů s příznivou prognózou (keratokonus, dystrofie rohovky) je úspěšnost vyšší než 95 %.
- 📄 **Transplantace skléry (bělimy)** - skléra je neprůsvitný ochranný obal vnitřní části oka, zaujímá zadních 5/6 jeho povrchu, v přední části oka přechází v rohovku.
- 📄 Skléra se připravuje ve sterilním prostředí v oční tkáňové bance, uchovává se ve vodném roztoku etanolu, v glycerolu, či se lyofilizuje (odpaření vody ze zmrazeného vzorku ve vakuu).

Oční tkáň

- 1 **rohovka** (cornea)
- 2 komorová voda (humoraquosus)
- 3 duhovka (iris)
- 4 spojivka (conjunctiva)
- 5 limbus (limbus)
- 6 čočka (lens)
- 7 **skléra** (sclera)
- 8 sklivec (corpus vitreum)
- 9 sítnice (retina)
- 10 zrakový nerv (nervus opticus)



© Ivan Helekal

Tkáně - oční lékařství

- Oční rohovka (skléra) v Eusolu



- Oční rohovka (skléra) ve ztenčovacím médiu



Typy tkání - muskuloskeletální

☰ k transplantaci se používají především **kostní štěpy** - tyto se standardně používají již od 50 let a tvoří **největší podíl** ze všech **transplantovaných tkání**.

- **Velké kostní štěpy - kortikální**
zejména diafýzy (tj. těla dlouhých kostí) - součástí je kost, chrupavka a ligamenta.
- **Spongiozní a kortikospongiozní kostní štěpy**
zejména femorální hlavice a kondyly, tibiální kondyly, spongioza z pately, čištěná spongiosní kost různých tvarů, čištěná spongiosní kost drcená, demineralizovaný kostní prášek, apod.

☰ Dalšími používanými muskuloskeletálními tkáňovými transplantáty jsou:

- **vazy** (ligamenta),
- **šlachy a fascie** (konkrétně fascia lata),
- **chrupavka**.
- **meniskus**.

Kost

- 1 kostní trámčina
(substantia spongiosa)
= „spongioza“
- 2 kostní dřeň (medulla
ossium)
- 3 kostní tkáň hutná
(substantia compacta)
= „kortika“
- 4 okostice (periosteum)



Tkáně - ortopedie, chirurgie



Tkáně - ortopedie, chirurgie

Achilova šlacha



Tkáně - ortopedie, chirurgie

Fascia lata



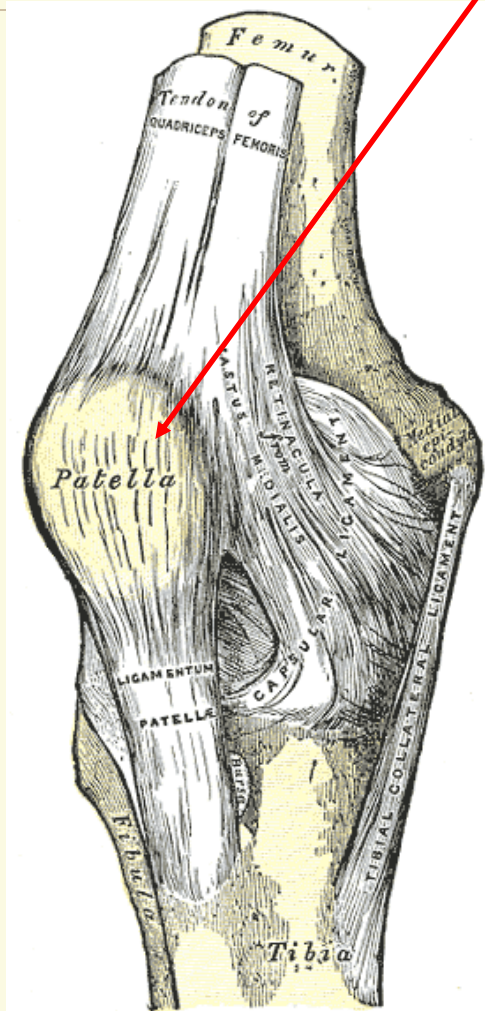
Meniskus



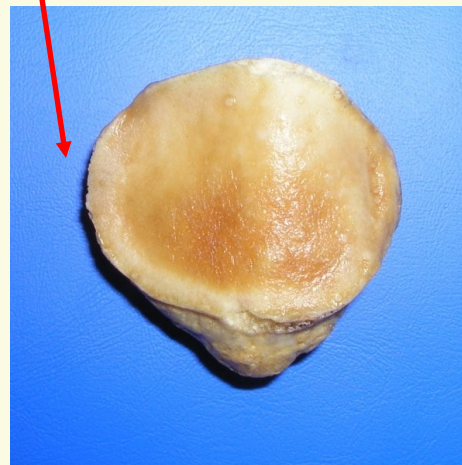
Svalová šlacha



Patella (čéška)



- Je největší sezamskou kostí (tzn. kostí volně uloženou ve šlaše) v těle
- tvoří přední část kolenního kloubu
- je vsunutá do šlachy čtyřhlavého stehenního svalu



Tkáně - ortopedie, chirurgie

Ligamentum patellae (dva kostní bloky s patelárním vazem)



Typy tkání - muskuloskeletální

- ☞ **MSA - muskuloskeletální autotransplantát = kalva, fascie**
- ☞ Odběr při **dekompresivní kraniotomie** (neurochirurgická operace) odstranění části klenby lebeční s následnou plastikou tvrdé pleny, což umožní expanzi mozkové tkáně mimo mozkovnu (extrakraniálně).
- ☞ Indikací je patologické zvýšení nitrolebečního tlaku ve spojitosti
 - s pórakovým edémem mozku u extracerebrálního subdurálního hematomu
 - po kontuzi mozku.
 - nezvladatelný nárůst konzervativně léčeného otoku mozku u rozsáhlých mozkových ischemií nebo po operacích objemných mozkových tumorů.

Po odeznění mozkového edému je pacientovi odebrána autologní tkáň (mozková ploténka) replantována (ve FN Brno 35-45% odebraných kalv)

Typy tkání - kožní

☞ Alogenní dermoepidermální transplantáty

☞ = nejkvalitnější dočasné kožní kryty.

- jde o tenkou vrstvičku kůže, která je odebrána od pacienta (při autologním přenosu) nebo žijícího nebo zemřelého dárce (při alogenním přenosu) dermatomem v tloušťce cca 0,3 mm. Pokud není kůže ihned přenesena v rámci operační procedury (autologní přenos), je kultivačně vyšetřena, antibakteriálně ošetřena (dekontaminována), konzervována a uskladněna pro pozdější použití.

Chladová konzervace

- ke krátkodobému skladování při teplotě 2-8°C.
- konzervace ve vysoce koncentrovaném glycerolu umožňuje dlouhodobé uskladnění při teplotě 2-8°C, glycerol působí též antimikrobiálně.

Kryokonzervace a **lyofilizace** (mrazová sublimace) s následnou sterilizací

Typy tkání - srdeční

Alogenní aortální a pulmonální chlopně (chlopenní transplantáty)

- široké použití k rekonstrukci chlopenních lézí a to jak u vrozených malformací, tak u získaných vad srdečních chlopní.
- výhoda oproti chlopním umělých nebo zvířecím - jde o tkáň lidskou, dobře organismem přijímanou a netrombogenní, není třeba dlouhodobé antikoagulační léčby.

Chlopně jsou po odběru laboratorně zpracovány a kryokonzervovány v tekutém dusíku nebo jeho parách

Typy tkání - placenta (amniová membrána)

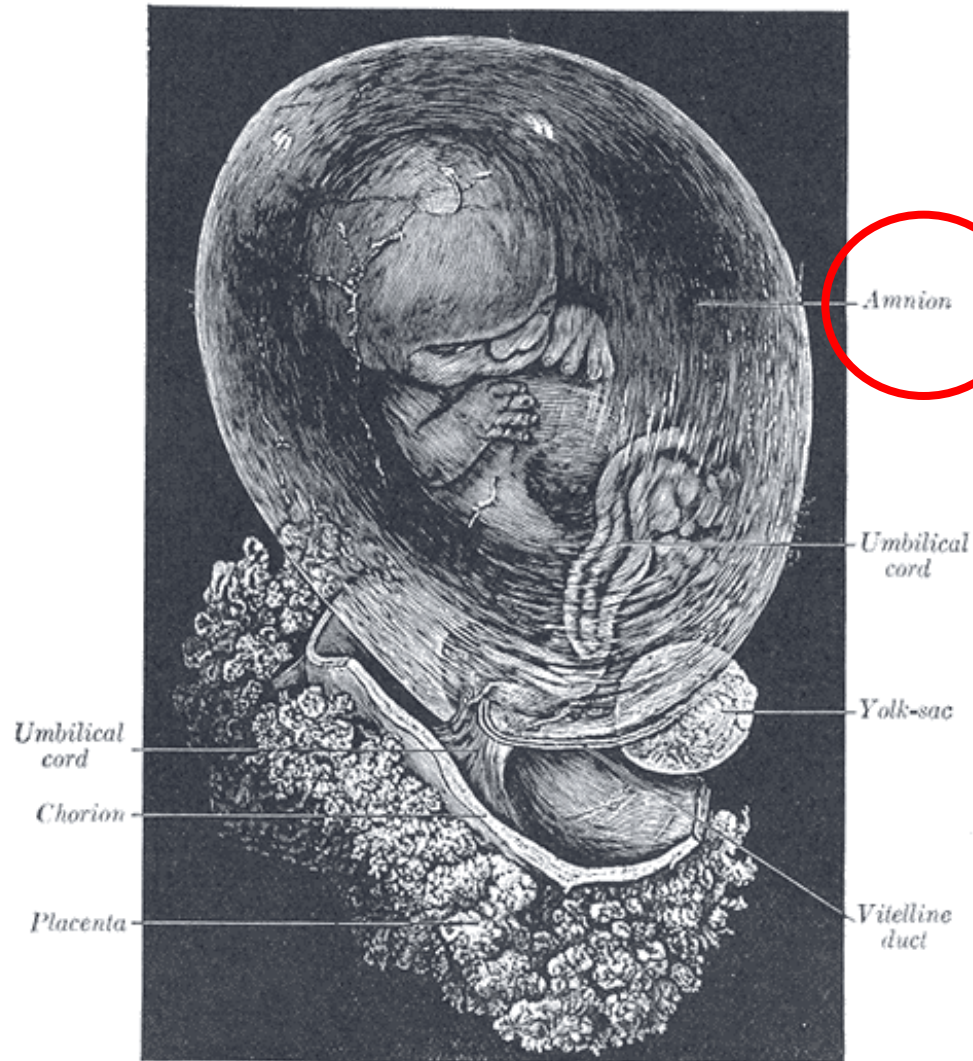
Odběr placenty se provádí **od alogenních žijících dárkyň** při porodu císařským řezem

☰ Placenta je do 2 hodin od odběru zpracována a je oddělena amniová membrána, která je následně zmražena nebo lyofilizována

☰ **Transplantace amniové membrány se využívá**

- v očním lékařství (náhrady některých tkání oka)
- v neurochirurgii (překrytí mozku při úrazech).
- hojení chronických ran (amnioderm)

Amnion/ placenta



Zárodečné buňky

- 📄 Uložení **spermatu** u onkologických pacientů - indikace
 - u mužů v reprodukčním věku:
 - s diagnostikovaným maligním onemocněním před započítím chemoterapie nebo radioterapie
 - s gametotoxickou léčbou
 - s diagnostikovaným poraněním míchy
 - u pediatrických pacientů mužského pohlaví:
 - s diagnostikovaným maligním onemocněním před započítím chemoterapie nebo radioterapie
- 📄 Postup **FN Brno** - Zacházení s reprodukčními buňkami onkologických pacientů ve FN Brno (sperma) -> definuje i **reprodukční věk u muže** - pro účely tohoto postupu se jedná o věk maximálně **do 65 let**
- 📄 Uchování při teplotě -150°C a nižší - desítky let
- 📄 Uložení pro budoucí darování mezi partnery (IVF)

Krvetvorné buňky

☞ Řešení hematologických malignit

☞ Hematopoetické kmenové a progenitorové buňky se pro účel transplantace získávají:

- Z kostní dřeně (**BM**, bone marrow)
- Z periferní krve (**PBSC**, peripheral blood stem cells) po mobilizaci
- Z pupečnickové krve (**CB**, cord blood)

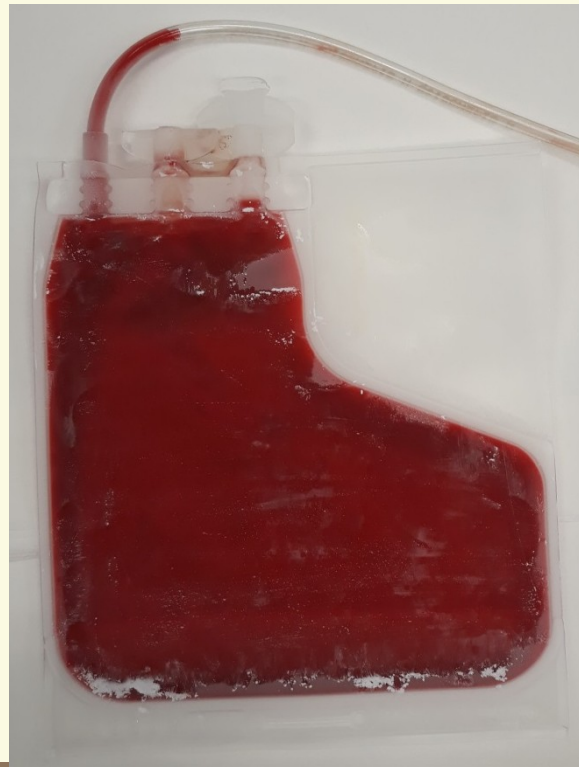
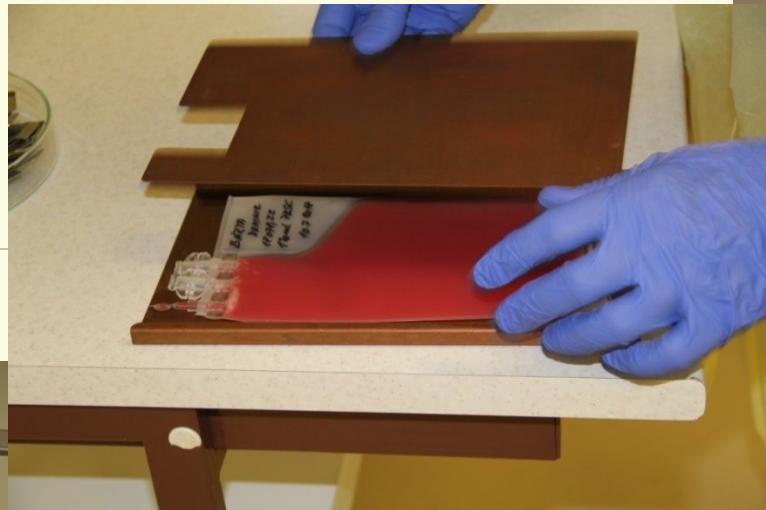
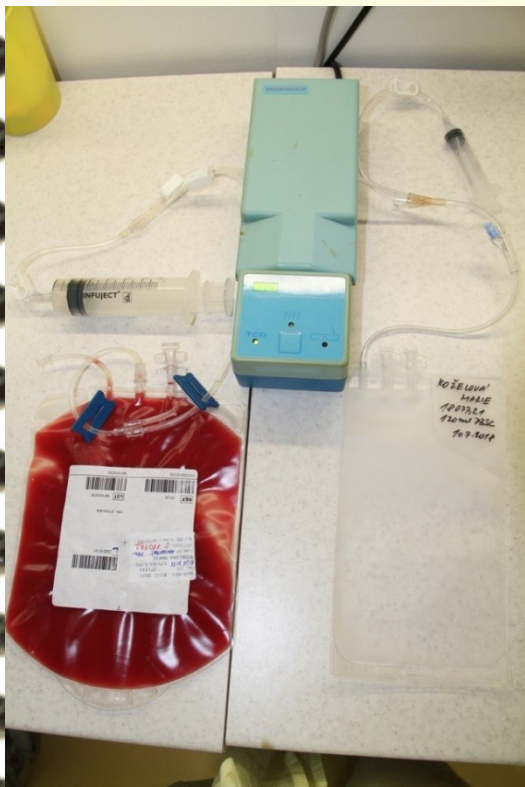
☞ Uchování

- Při snížené teplotě (+4°C) - vitální po několik dnů (72 hodin)
- Při teplotě -150°C a nižší - desítky let

☞ Transplantace kmenových a progenitorových buněk = infuze do krve příjemce

☞ Velmi složitý předtransplantační režim (diagnostika onemocnění, výběr dárce, příprava příjemce)

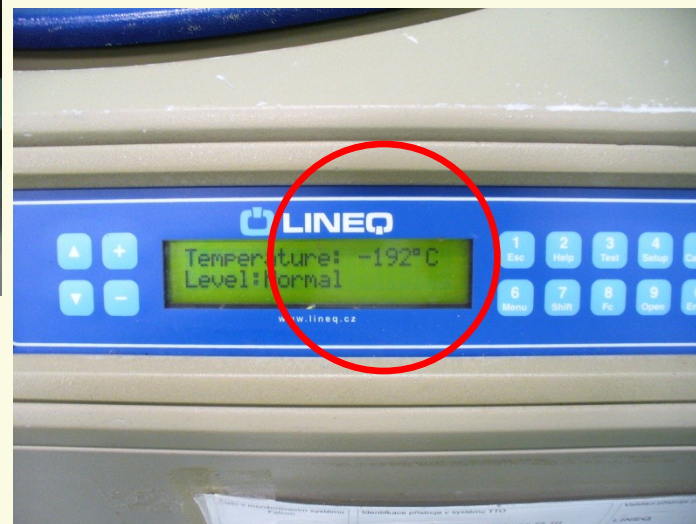
Zpracování na TTO

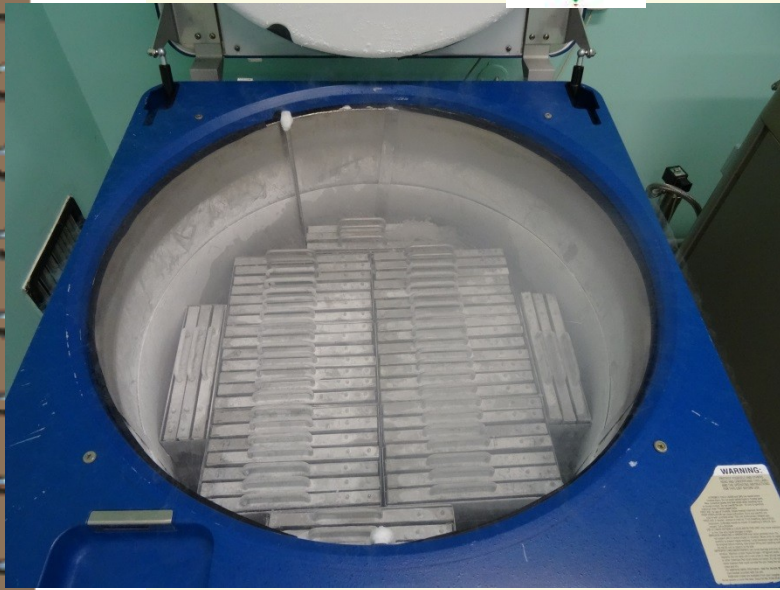


Krvetvorné buňky



Zařízení pro řízené mražení buněk

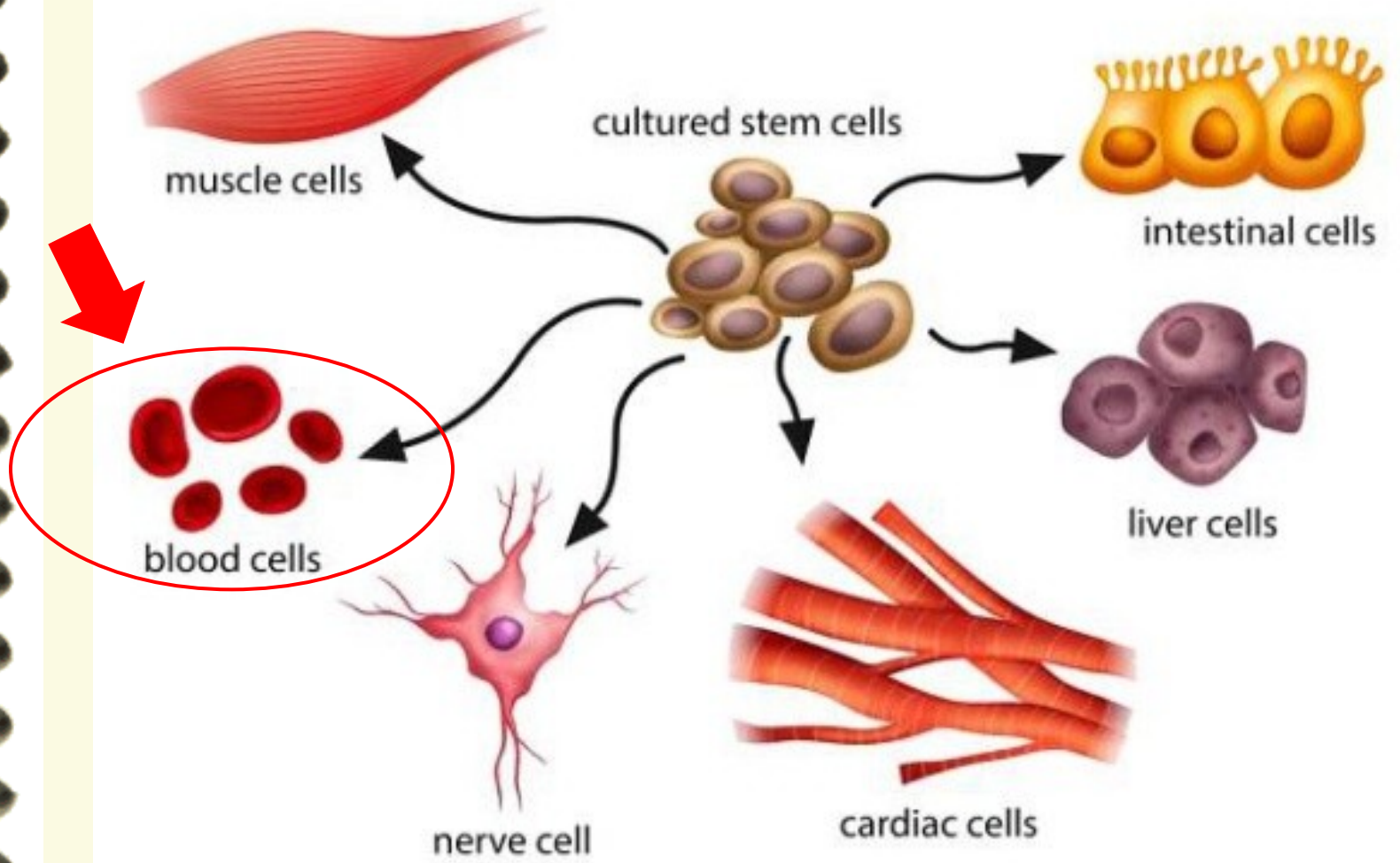




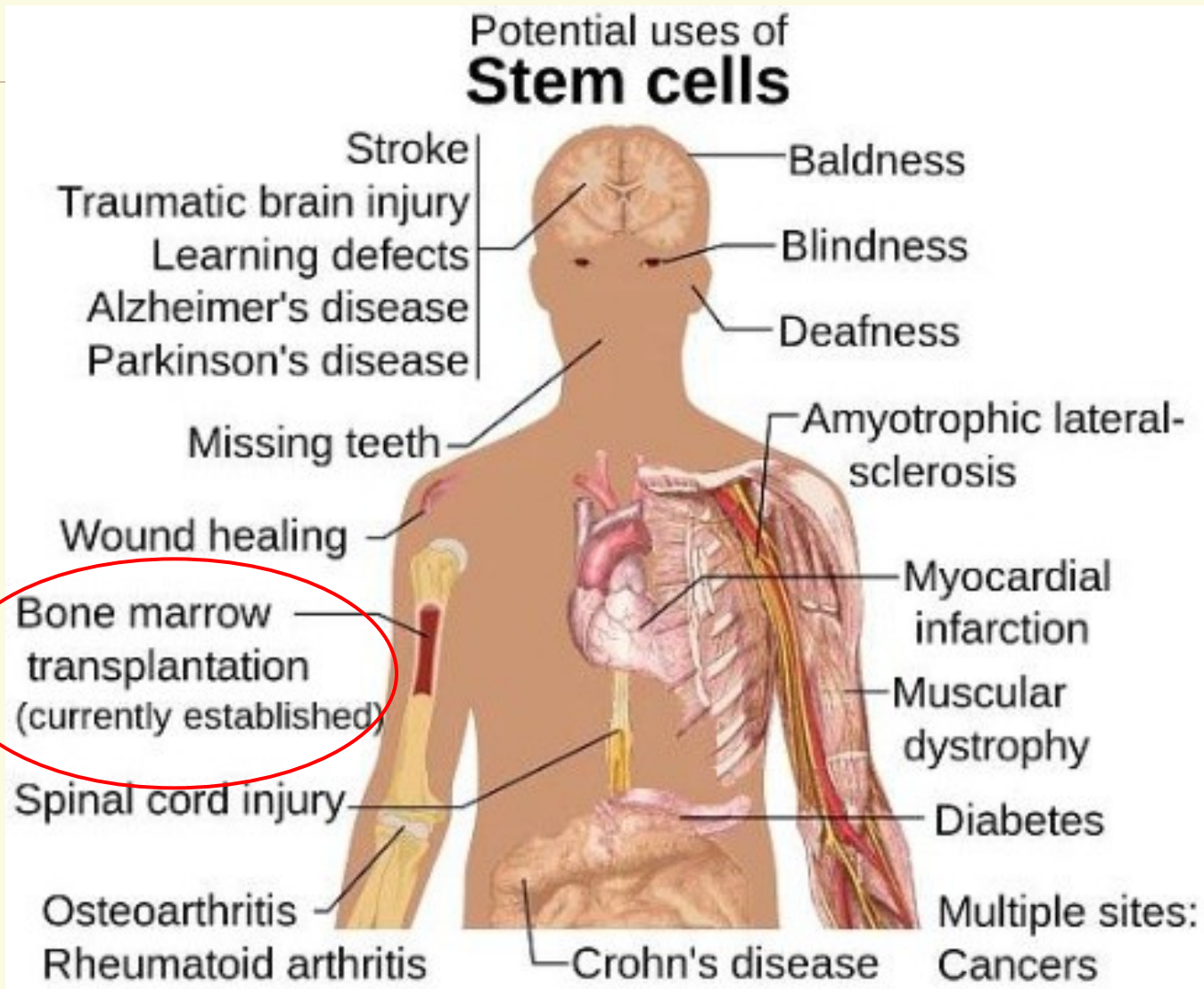
Kmenové buňky

- ☞ Regenerace poškozených tkání
- ☞ Kmenové buňky se pro účel kultivace s cílem diferenciací do různých tkání nejčastěji získávají:
 - Z tukové tkáně (**ASC, adipose stem cells**)
 - Z tkáně pupečníku nebo z pupečnickové krve (**MSC, mesenchymal stem cells**)
- ☞ Mají vysoký potenciál množení a jsou schopné přeměnit se na různorodé buňky anebo tkáně v lidském organismu (například buňky a tkáně kosti či chrupavky, nervy, hladké svaly, buňky srdečního svalu, kůže nebo jater)
 - ověřuje se léčba u onemocnění jako např. cirhóza jater, roztroušená skleróza, dětská mozková obrna, cukrovka, popáleniny, ale i diabetická noha.
- ☞ Uchování jejich unikátní vlastnosti lze uchovat hlubokým zamražením (teplota -80°C a nižší) prakticky napořád.

Kmenové buňky



Kmenové buňky



Kmenové buňky

