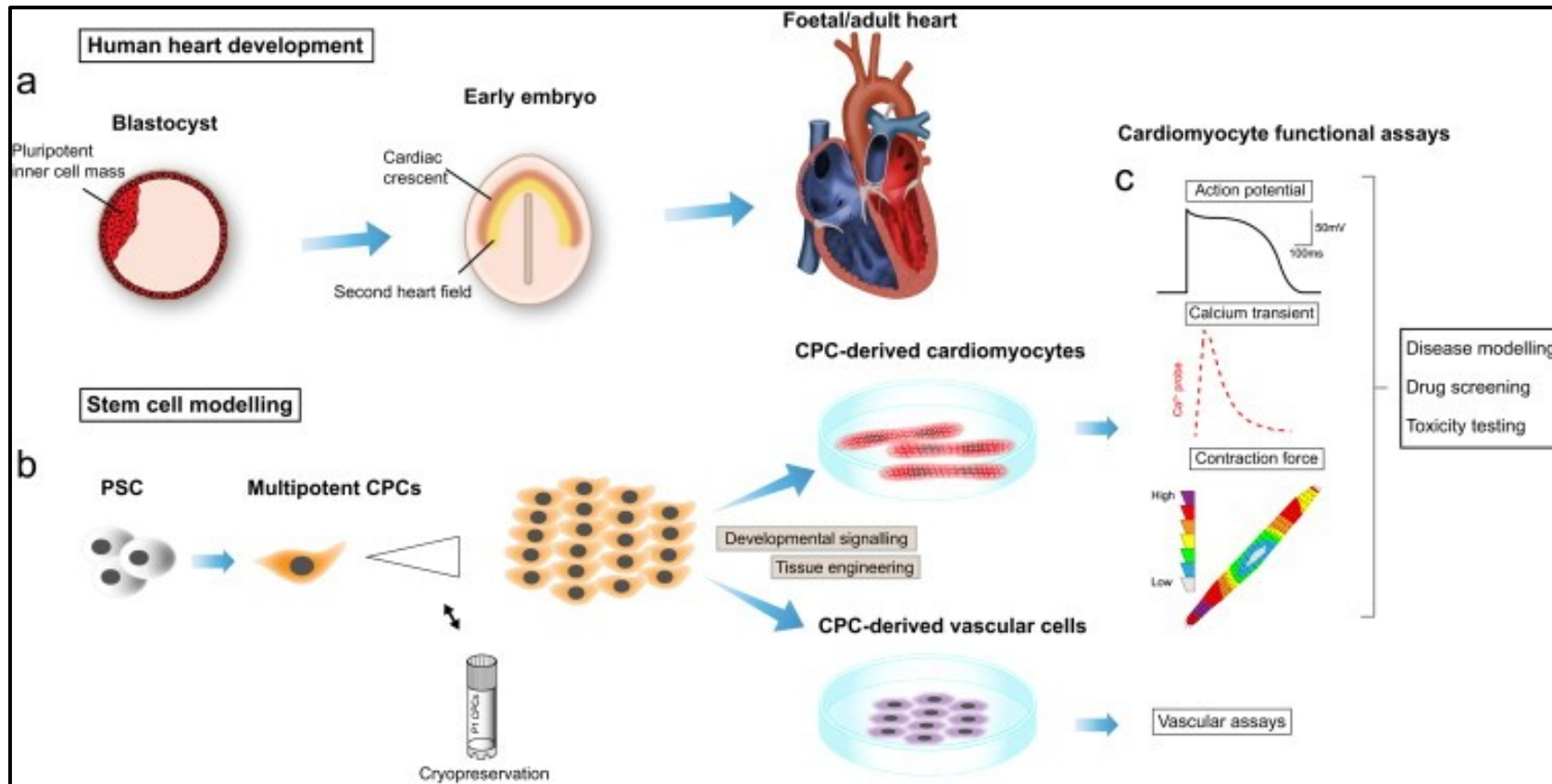


# Příprava kardiomyocytů

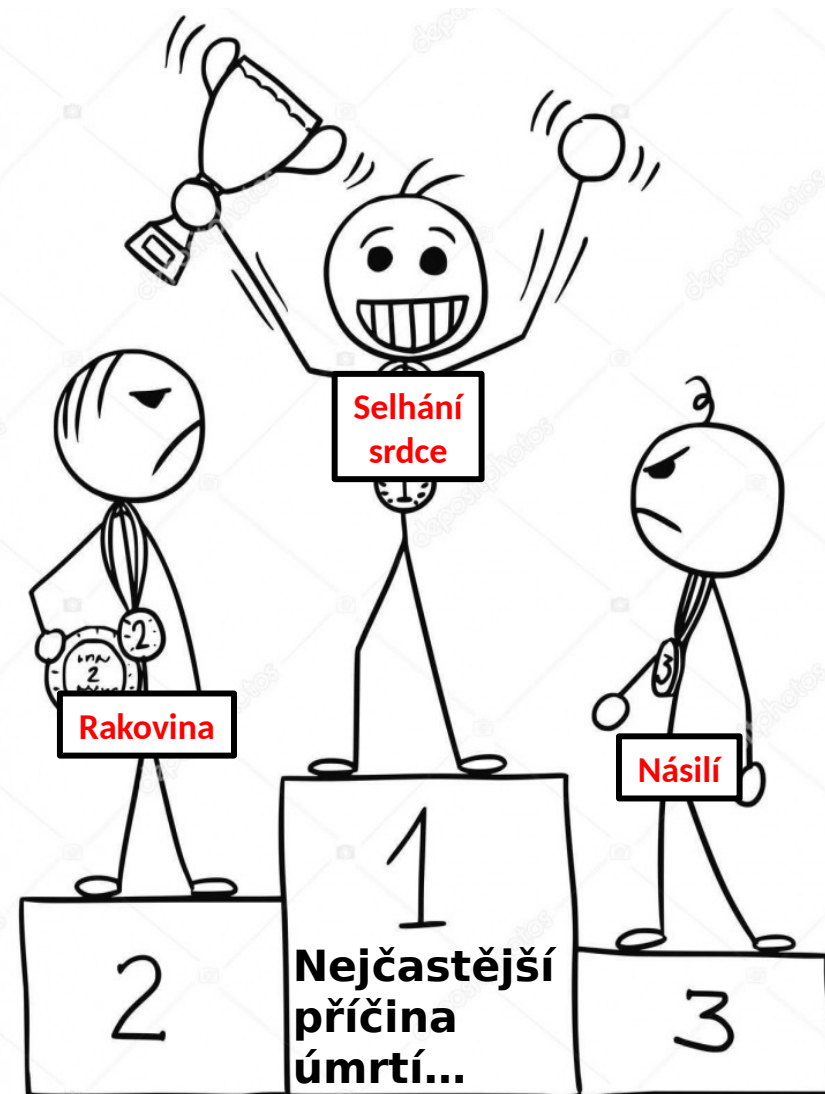
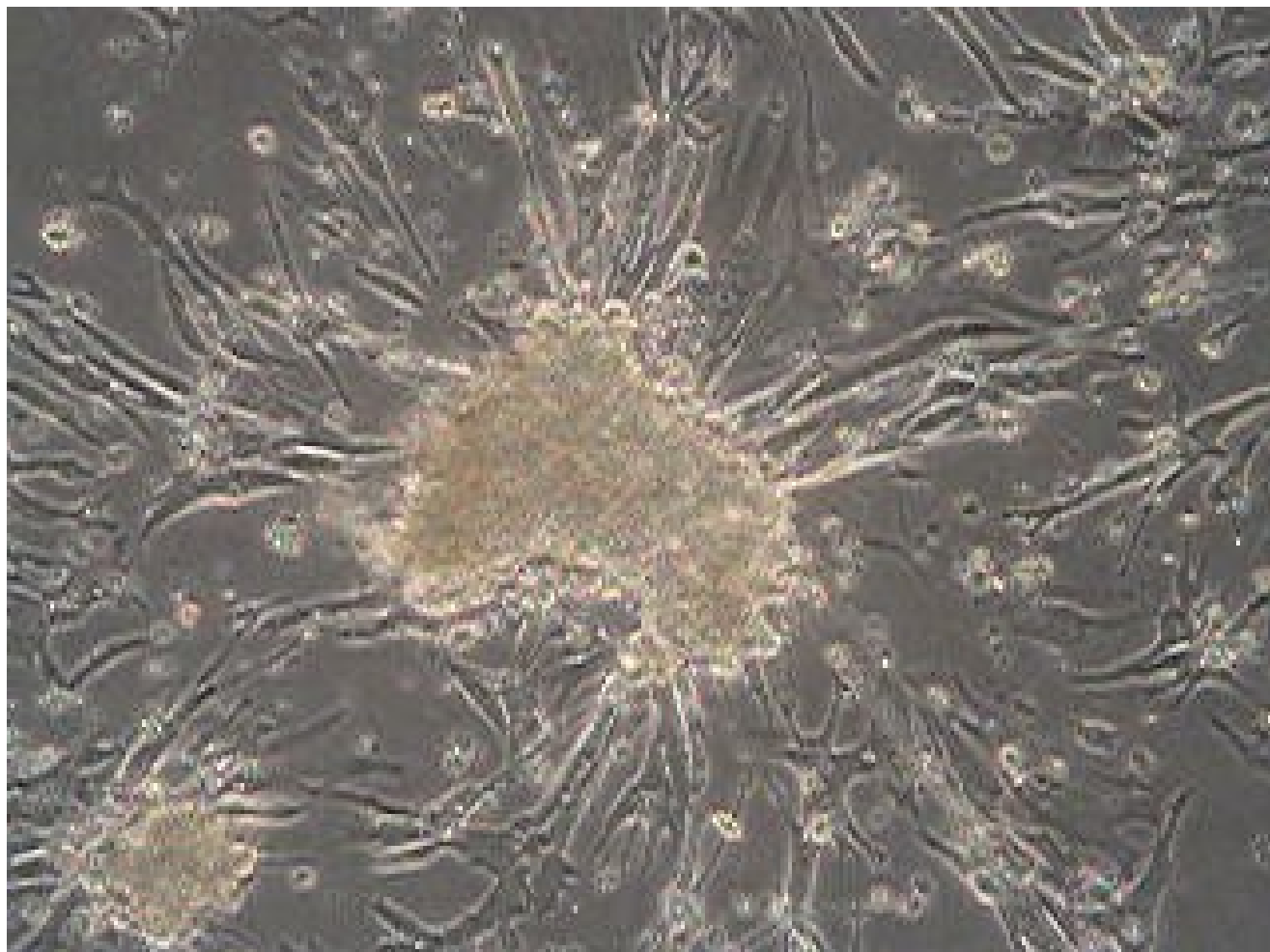
## a

# studium kardiomyogeneze

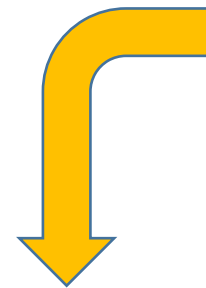
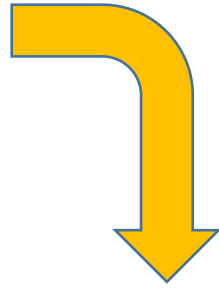
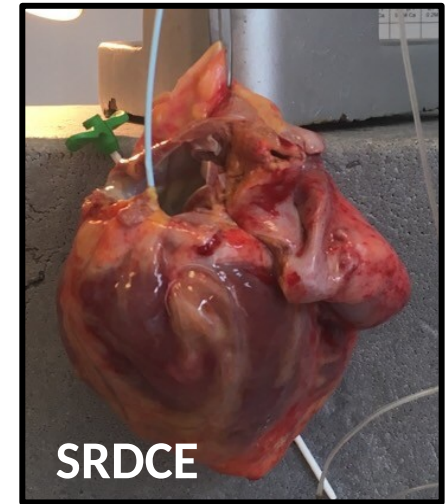
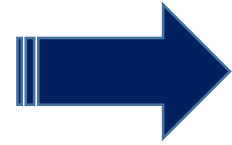
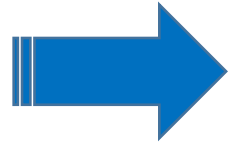
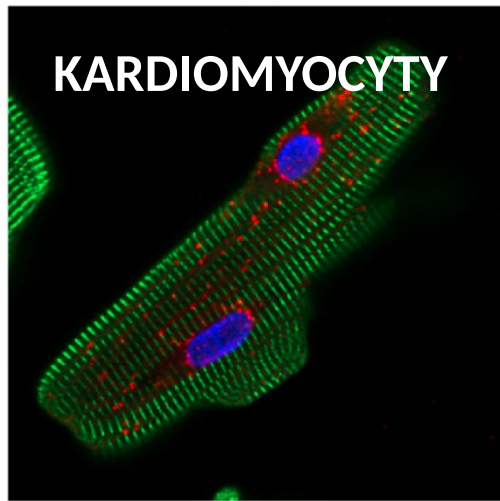


Co děláme:

Tvoříme kardiomyocyty in vitro z kmenových buněk



Proč:



Transplantace

Testování farmak

Pochopení mechanismů vývoje

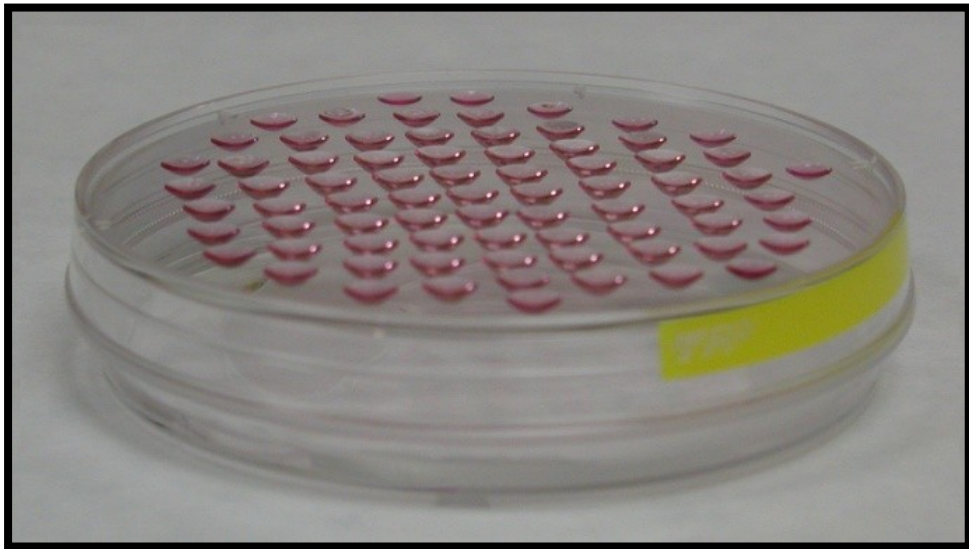
Studium fyziologických zákonitostí

Studium patofyziologie srdce/myokardu

A další...

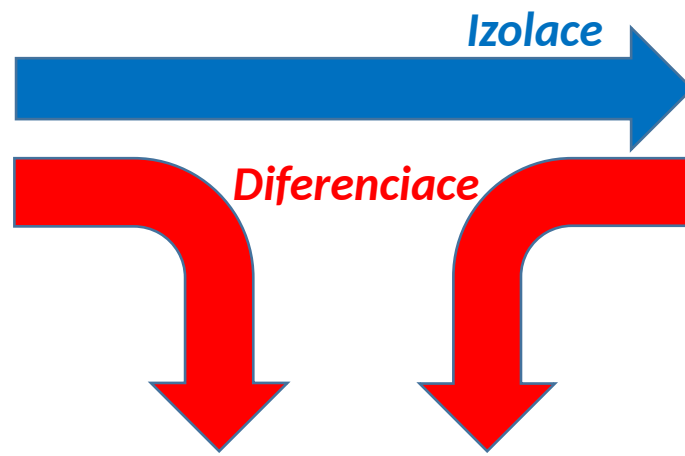
Jak to děláme:

-> Na miskách, in vitro, techniky tkáňových kultur a molekulární biologie

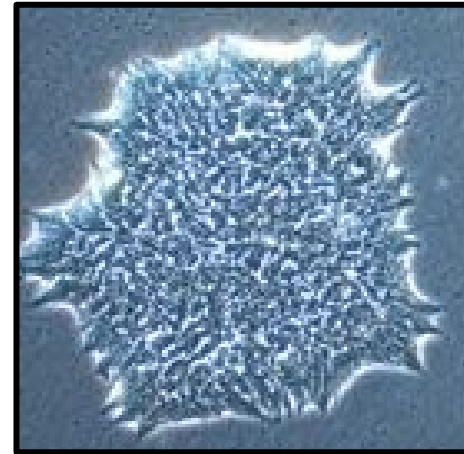


Jak to děláme:  
Příprava kardiomyocytů

**A) z pluripotentních kmenových buněk**



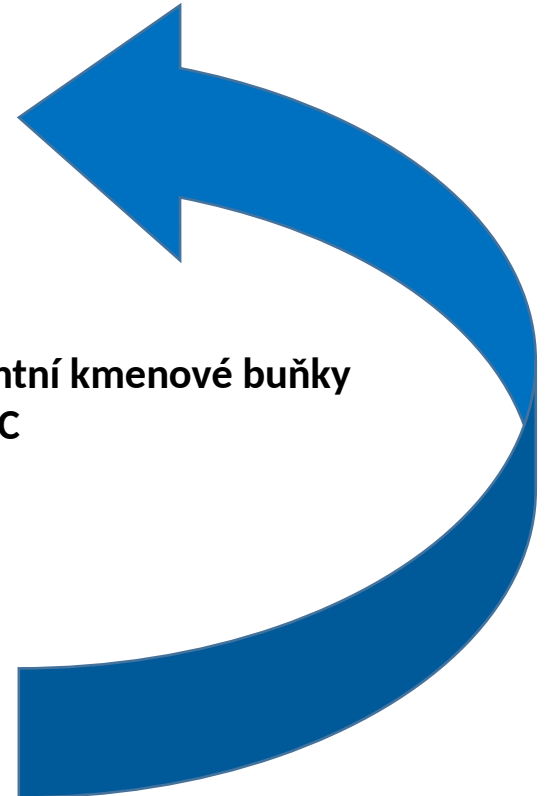
Embryonální kmenové buňky  
ESC



Indukované pluripotentní kmenové buňky  
iPSC



*Izolace*

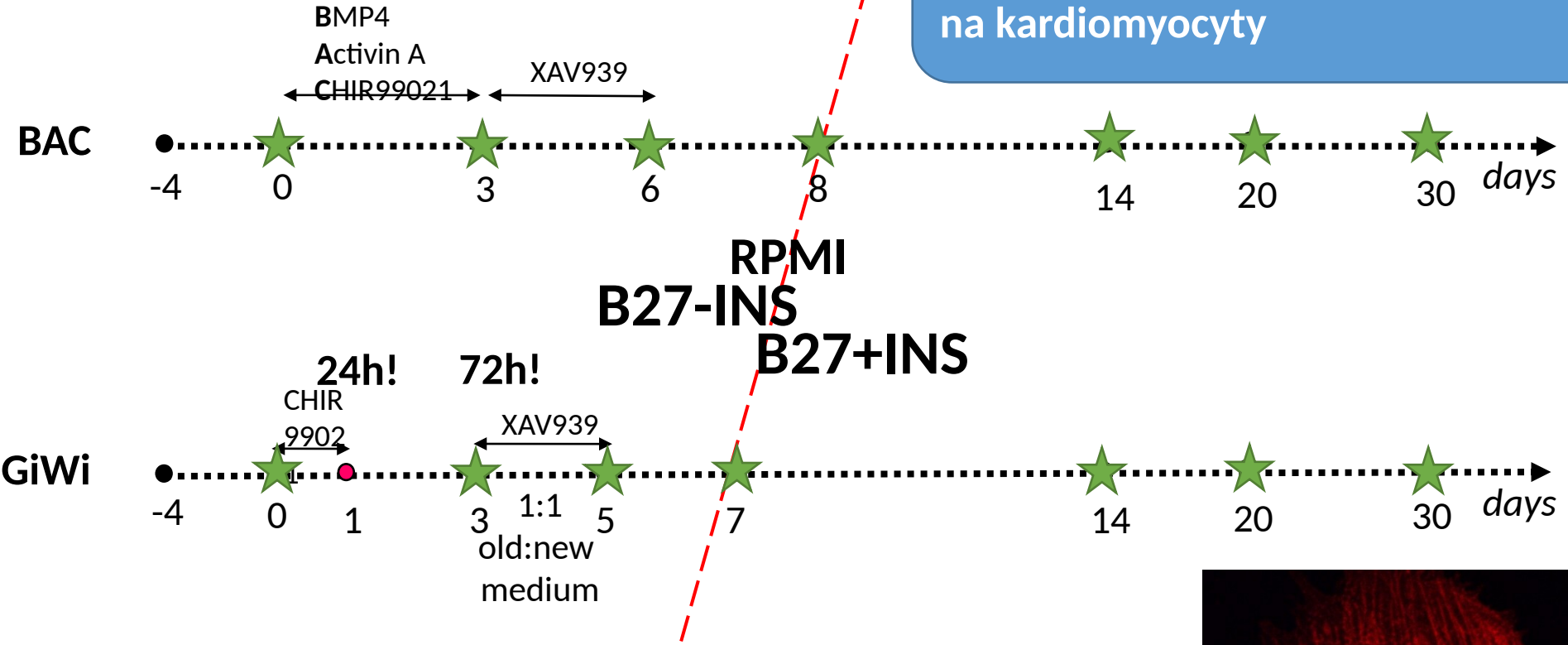


**Reprogramování**

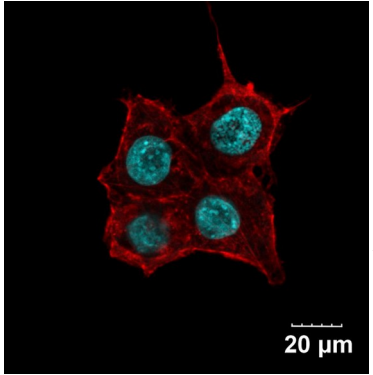
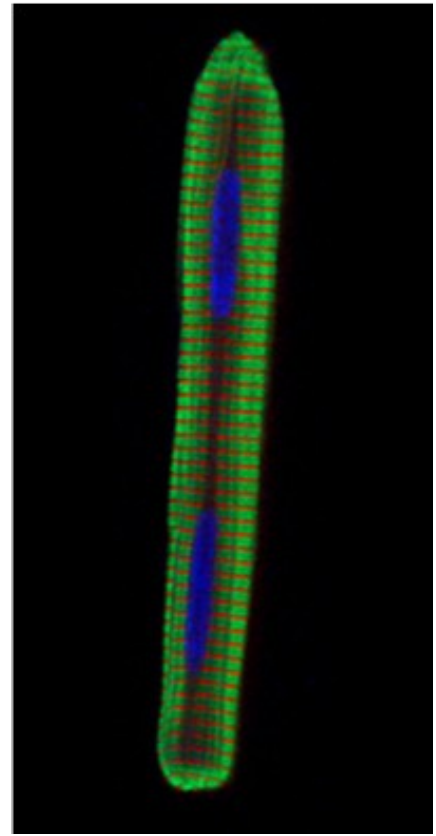
Yamanakovy faktory  
(Oct4, Klf4, Sox2, c-myc)

Jak to děláme:

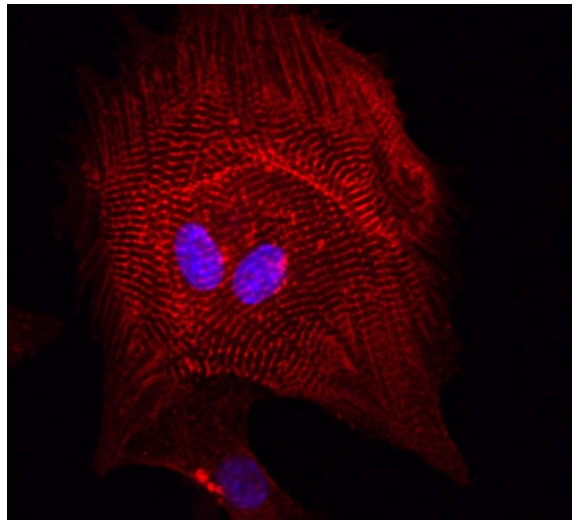
Příklad základních protokolů přeměny pluripotentních kmenových buněk na kardiomyocyty



Zralý kardiomyocyt



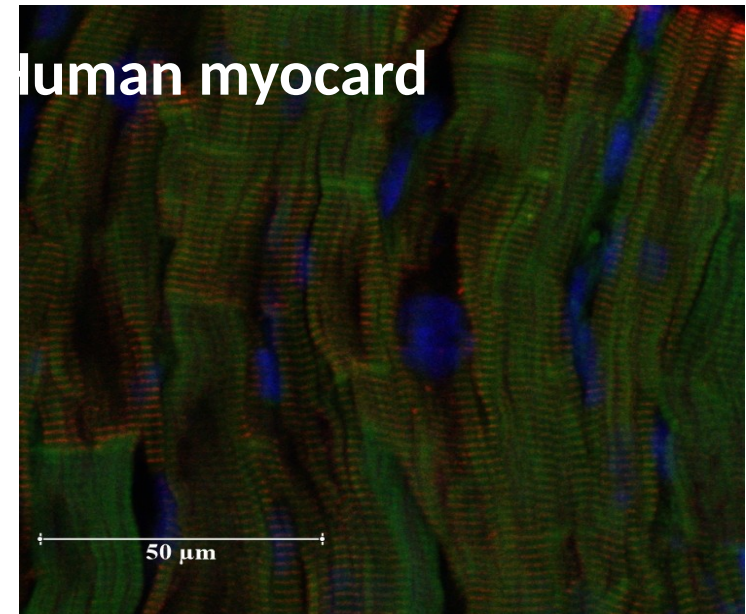
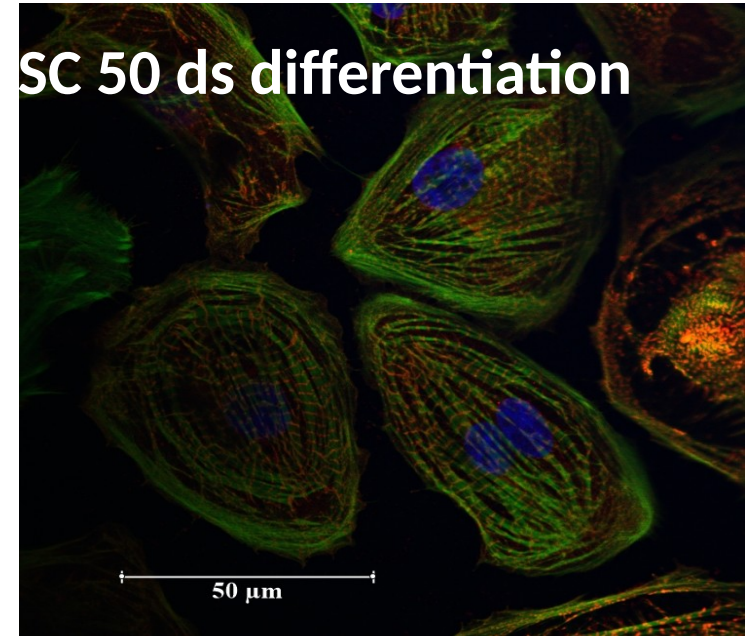
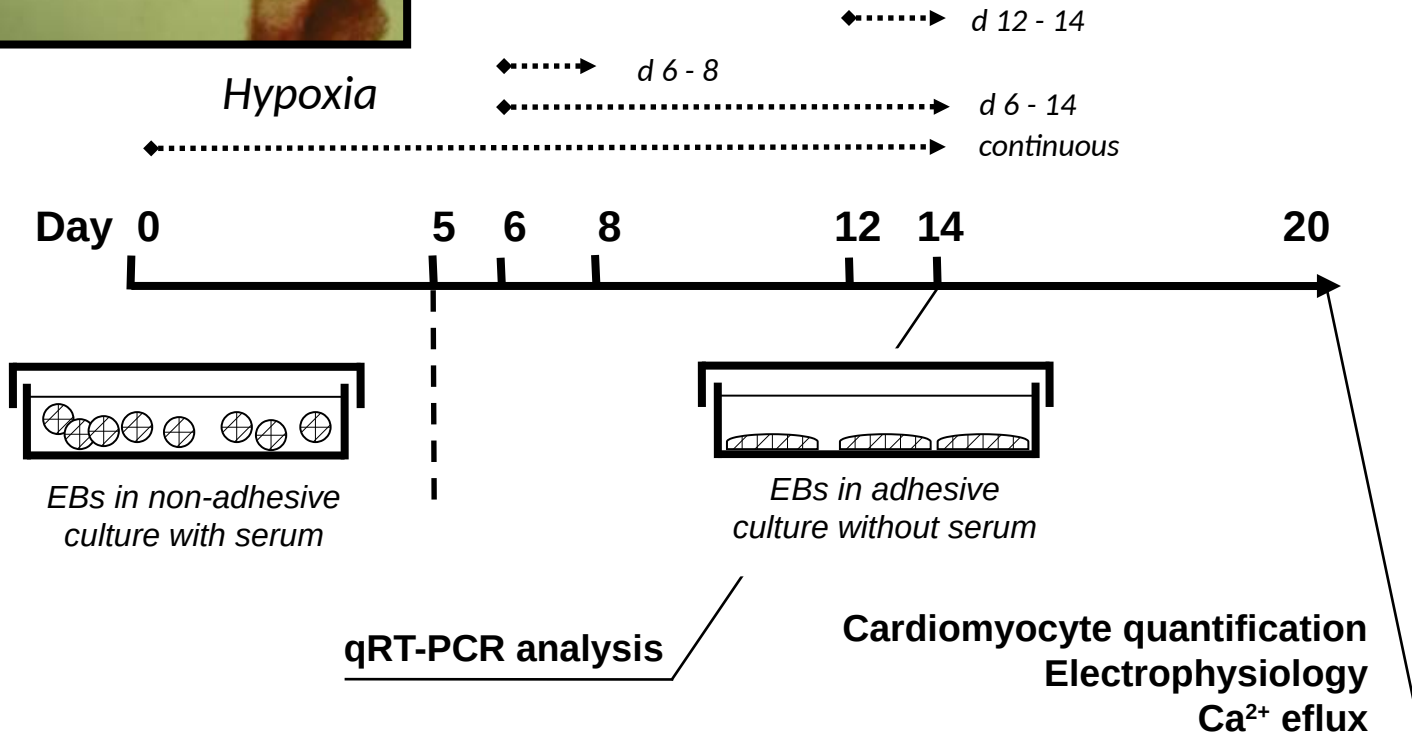
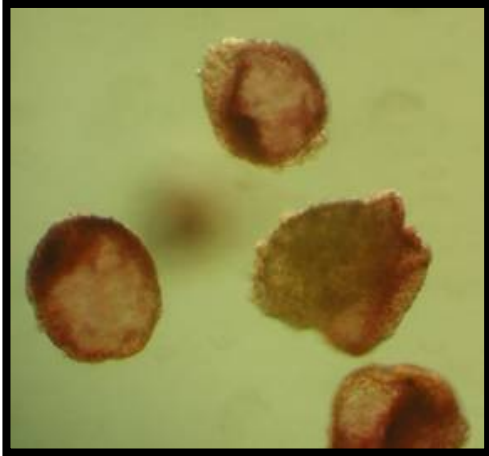
Pluripotentní kmenové buňky



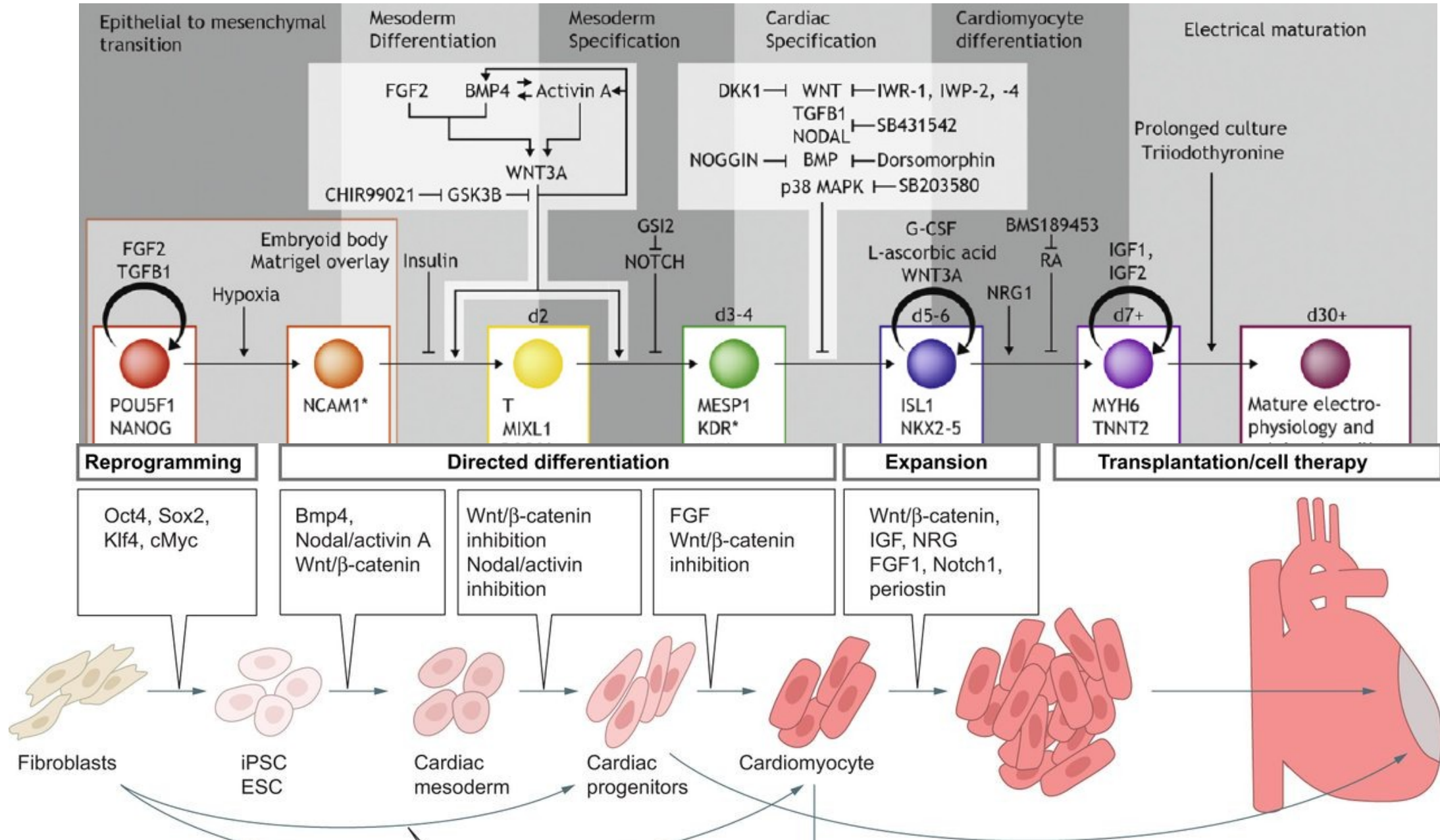
Nezralé kardiomyocyty

Jak to děláme:

Příklad základních protokolů přeměny pluripotentních kmenových buněk na kardiomyocyty

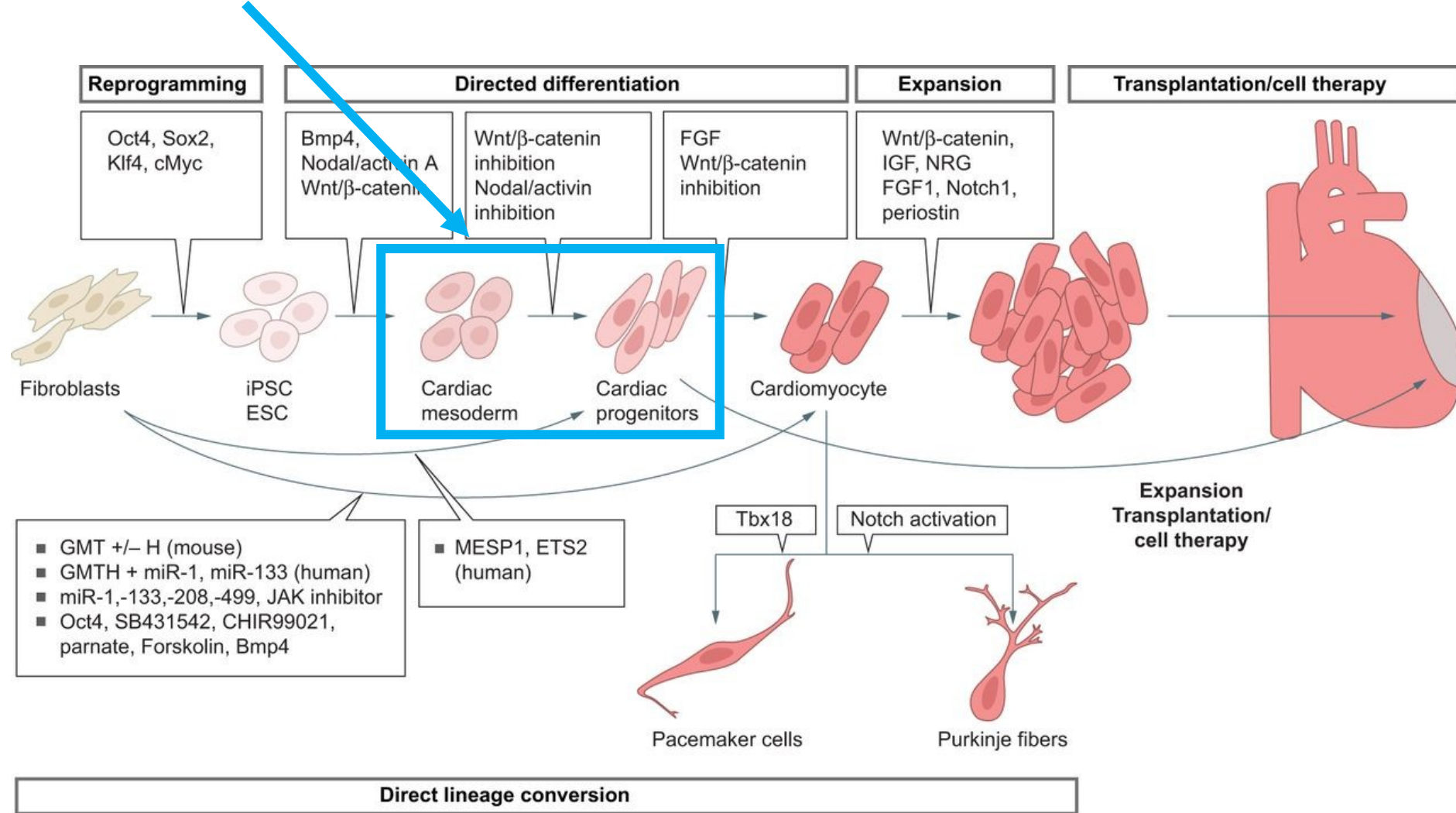


# Protokoly kardiomyogeneze u pluripotentních buněk mimikují podmínky *in vivo* vývoje

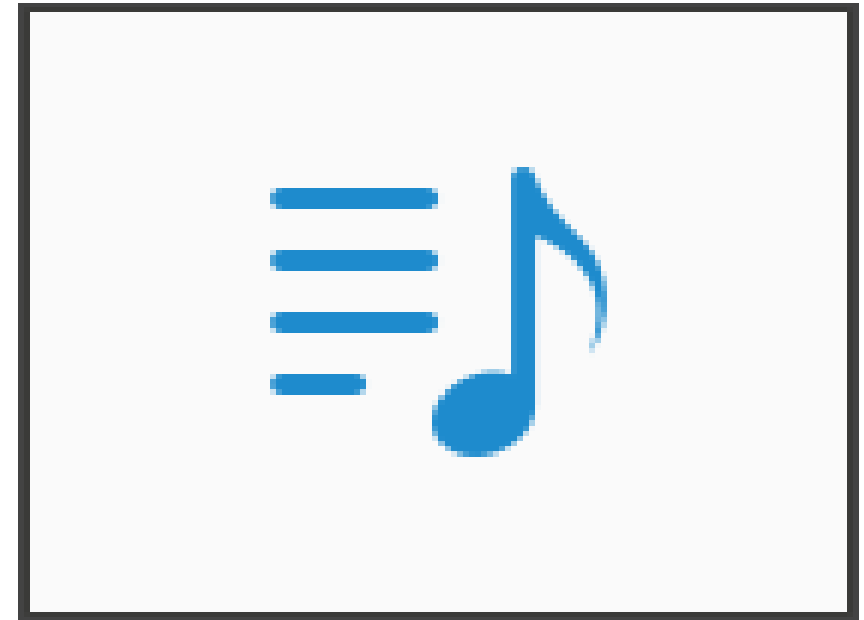




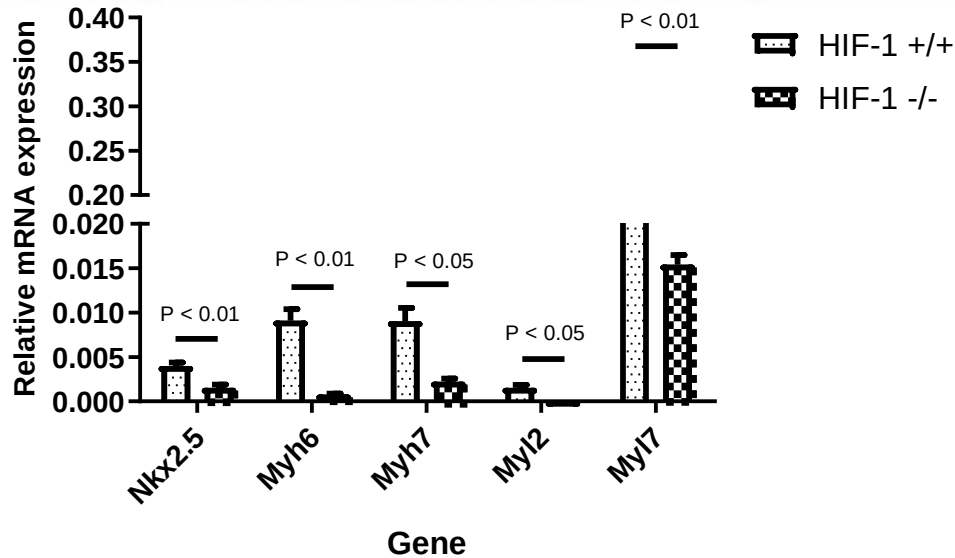
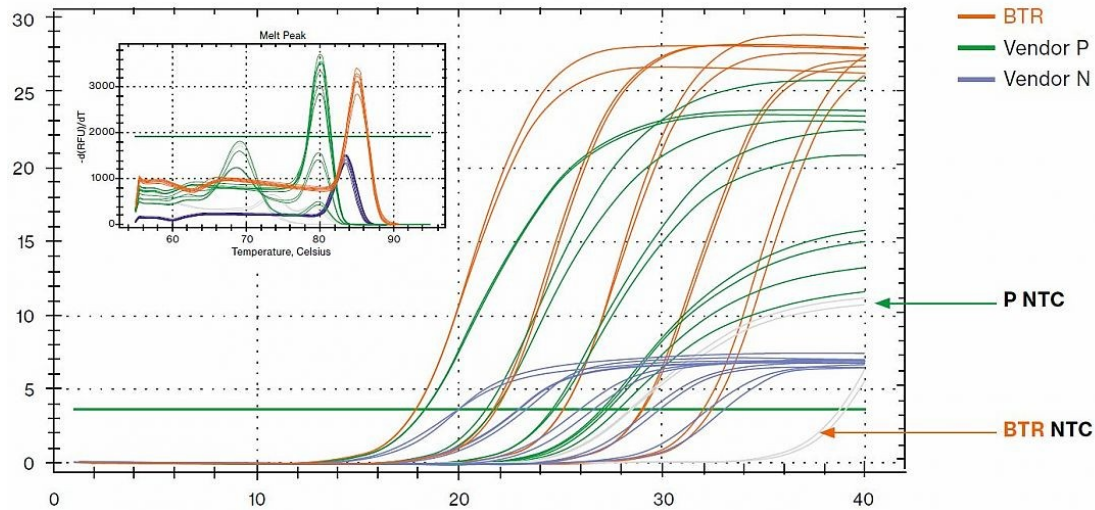
# B) z kmenových buněk myokardu (zatím hypotetické)



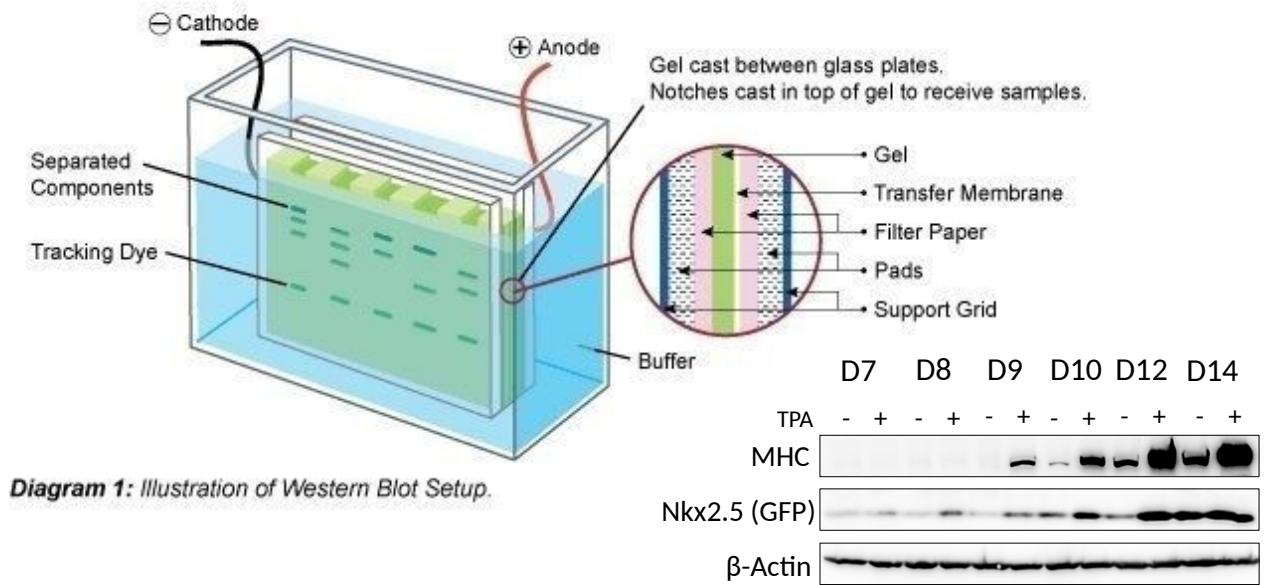
# Metody - I. fenotyp



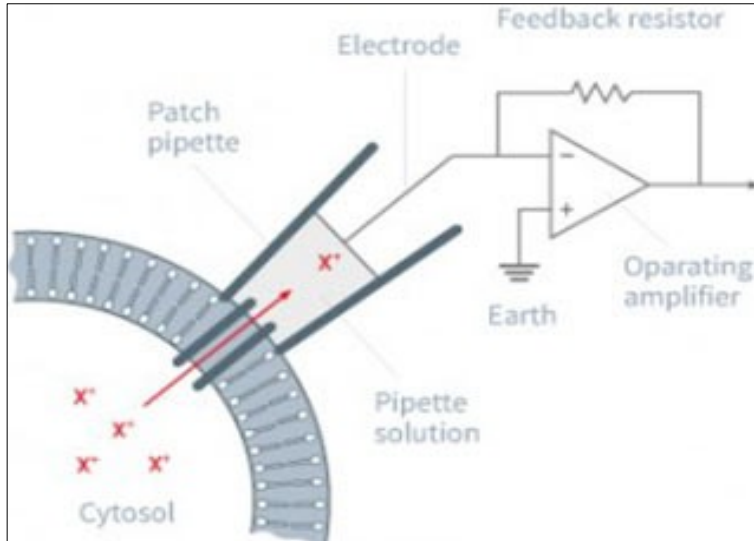
## qRT-PCR Immunocytochemistry



## Western blot Western Blot Setup

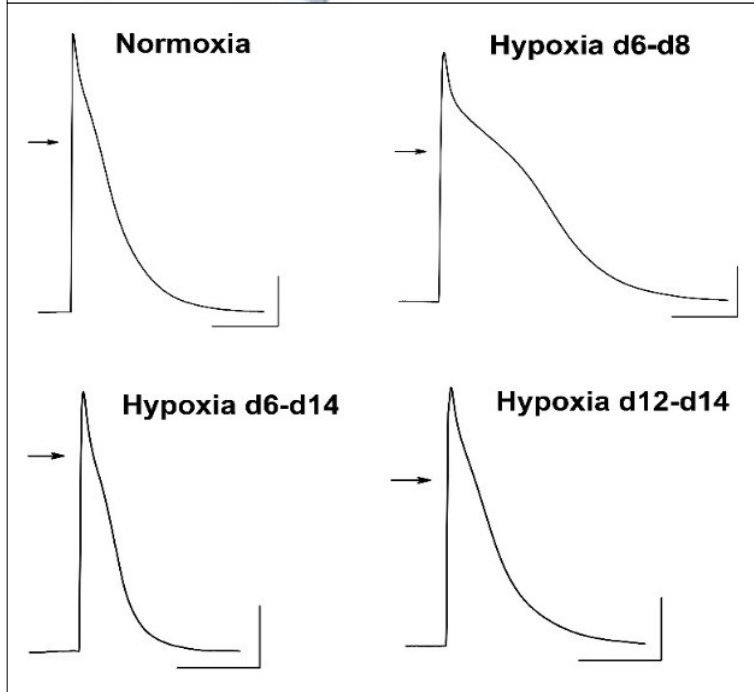


# Metody - IIa. funkce



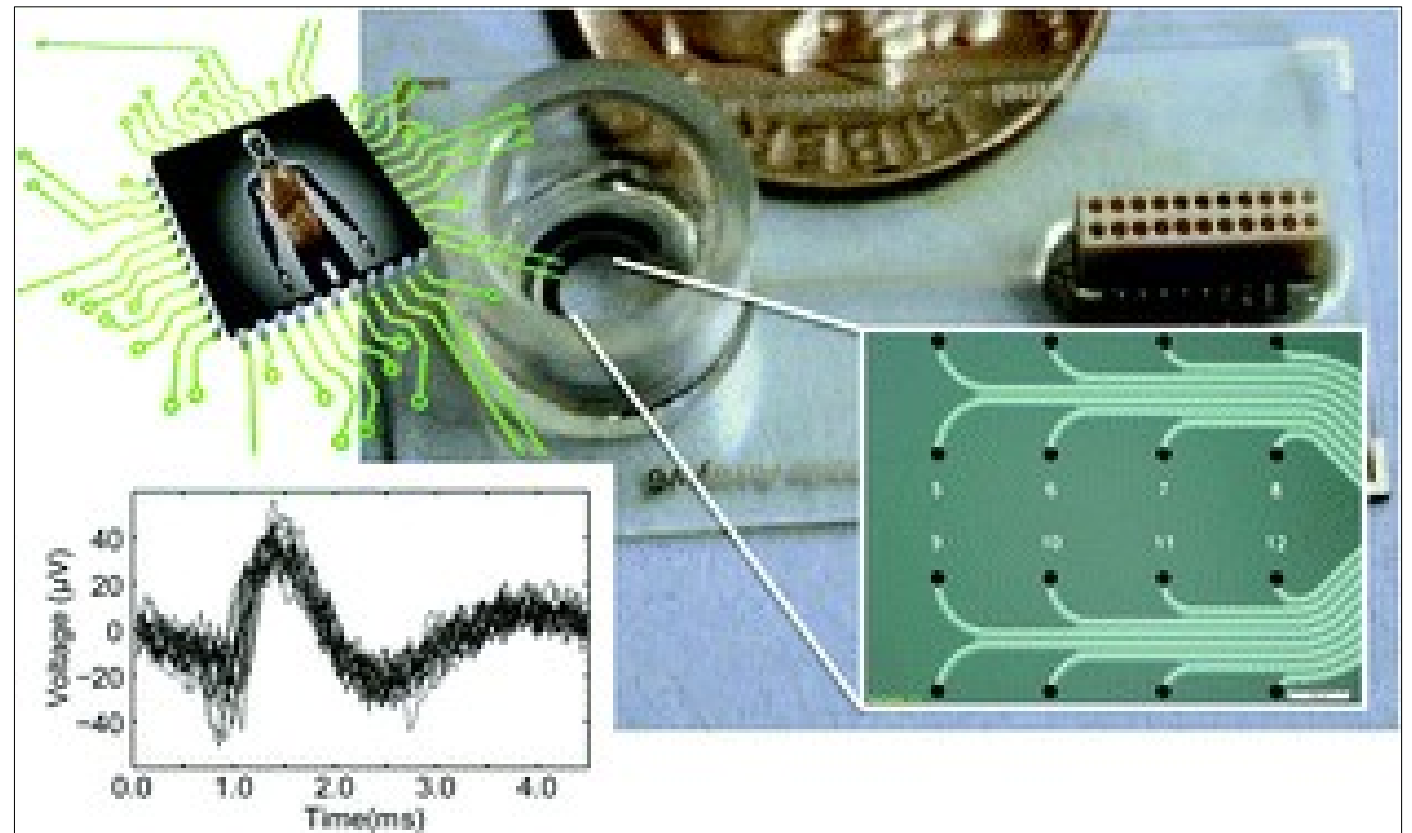
## Patch clamp

- analýza dynamiky depolarizace membrány

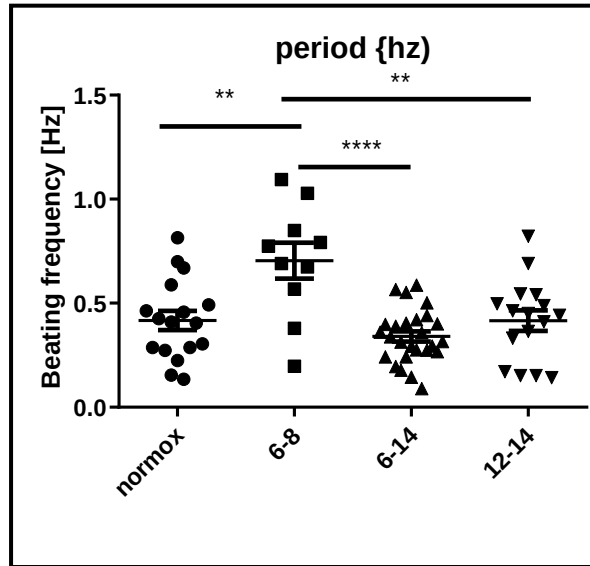


## Multielectrode array - MEA

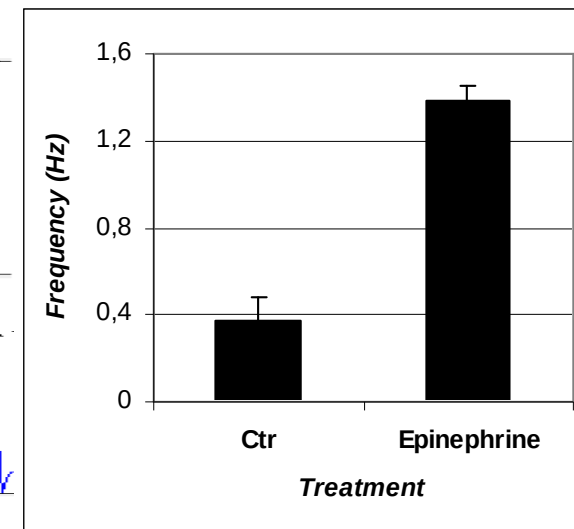
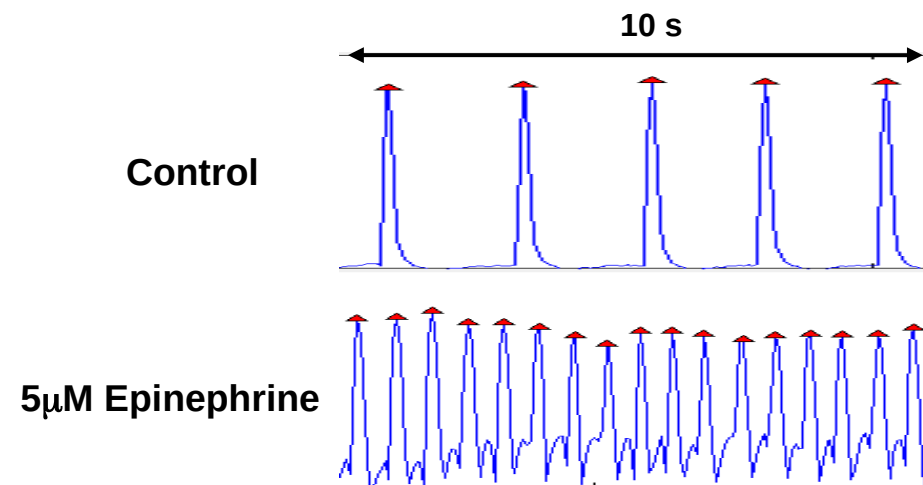
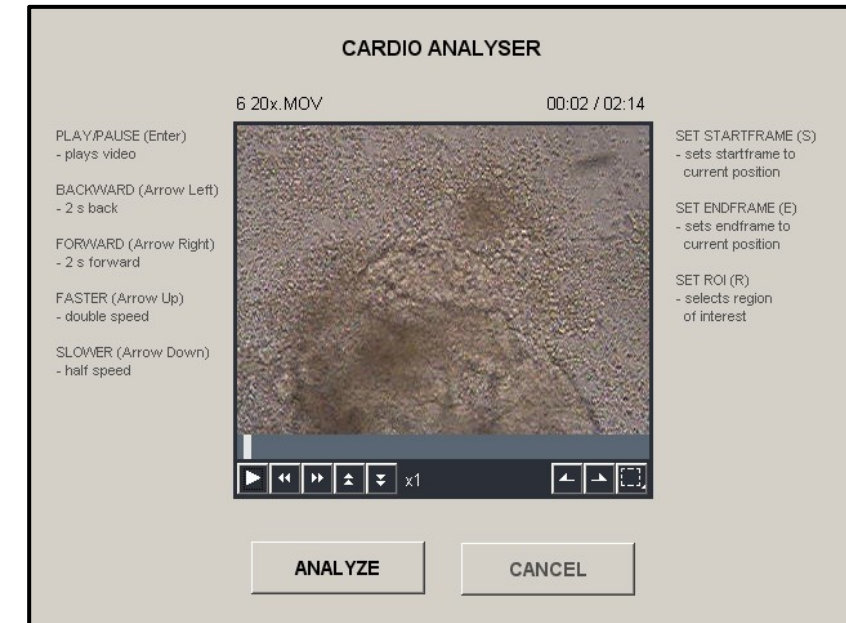
- změny v povrchovém napětí



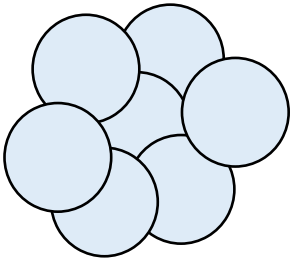
# Metody - Ib. funkce



## Video analýza

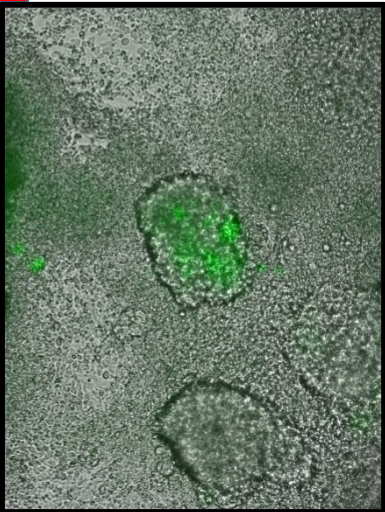
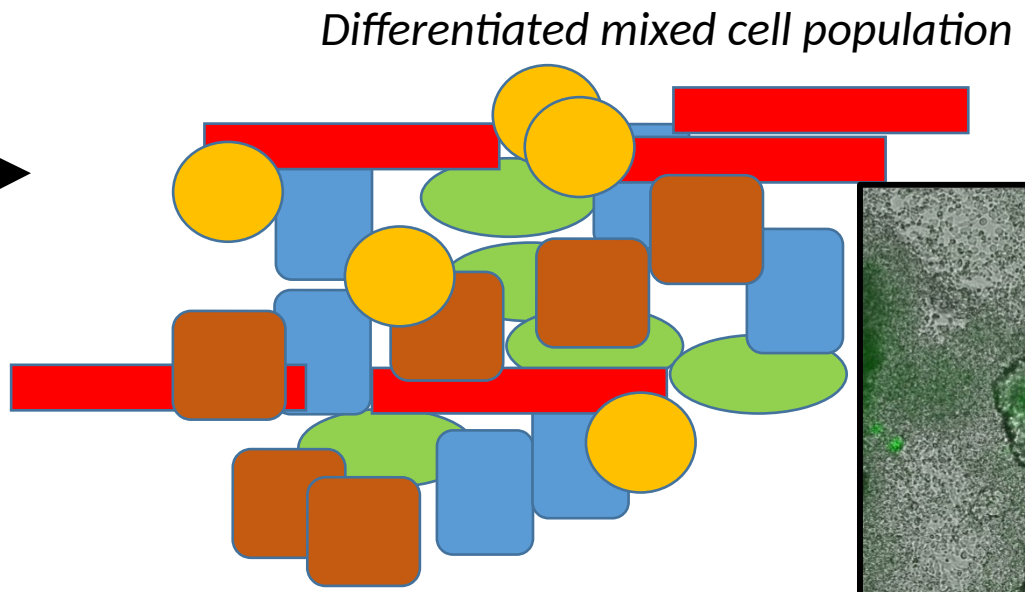


# Problémy => Efektivita a čistota protokolů - vznikají i jiné typy buněk než požadujeme

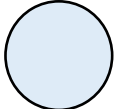
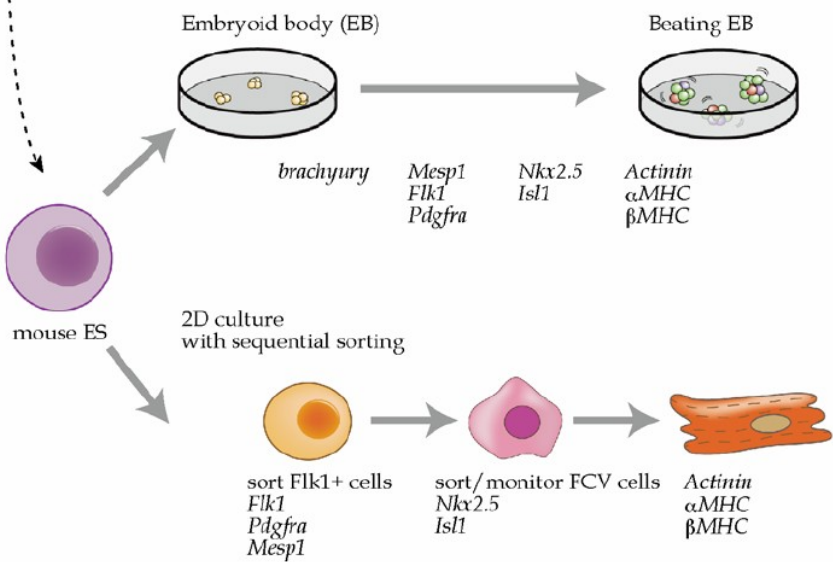
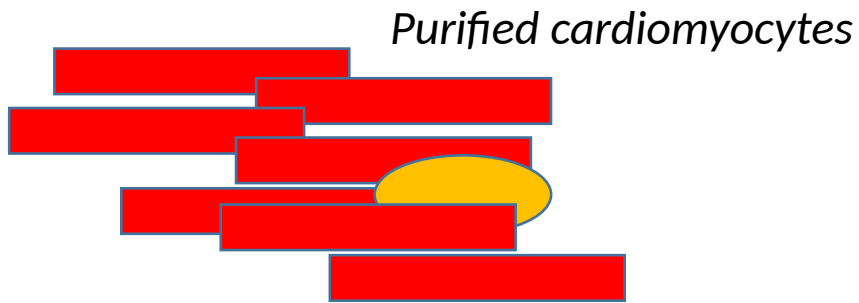


## Differentiation

E3.5	E6.5	E7	E7.5	E8	E8.5
blastocyst	Primitive streak	Lateral Plate Mesoderm	cardiac crescent	heart tube	looping heart



Purification ?  
Improved protocol ?



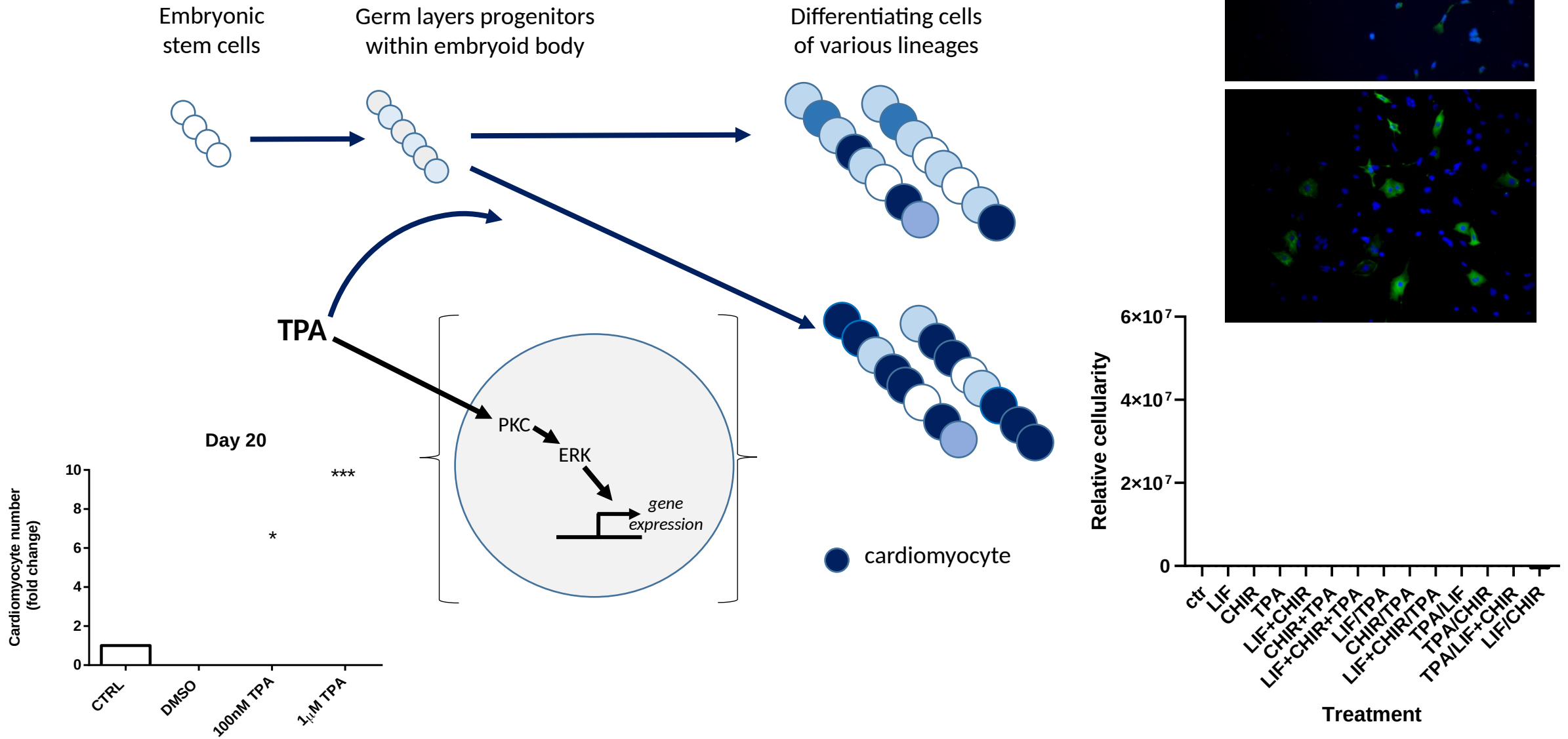
Pluripotent stem cell



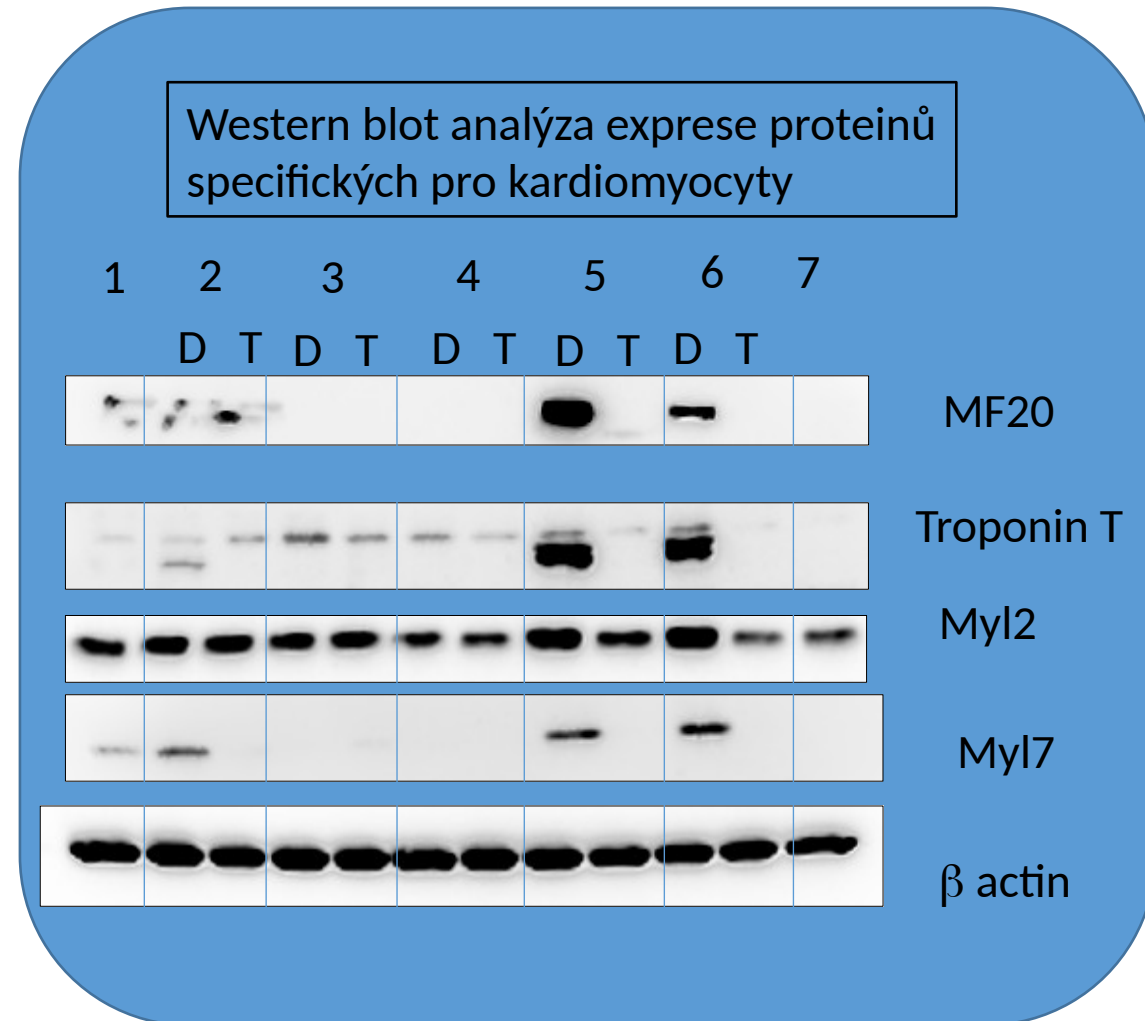
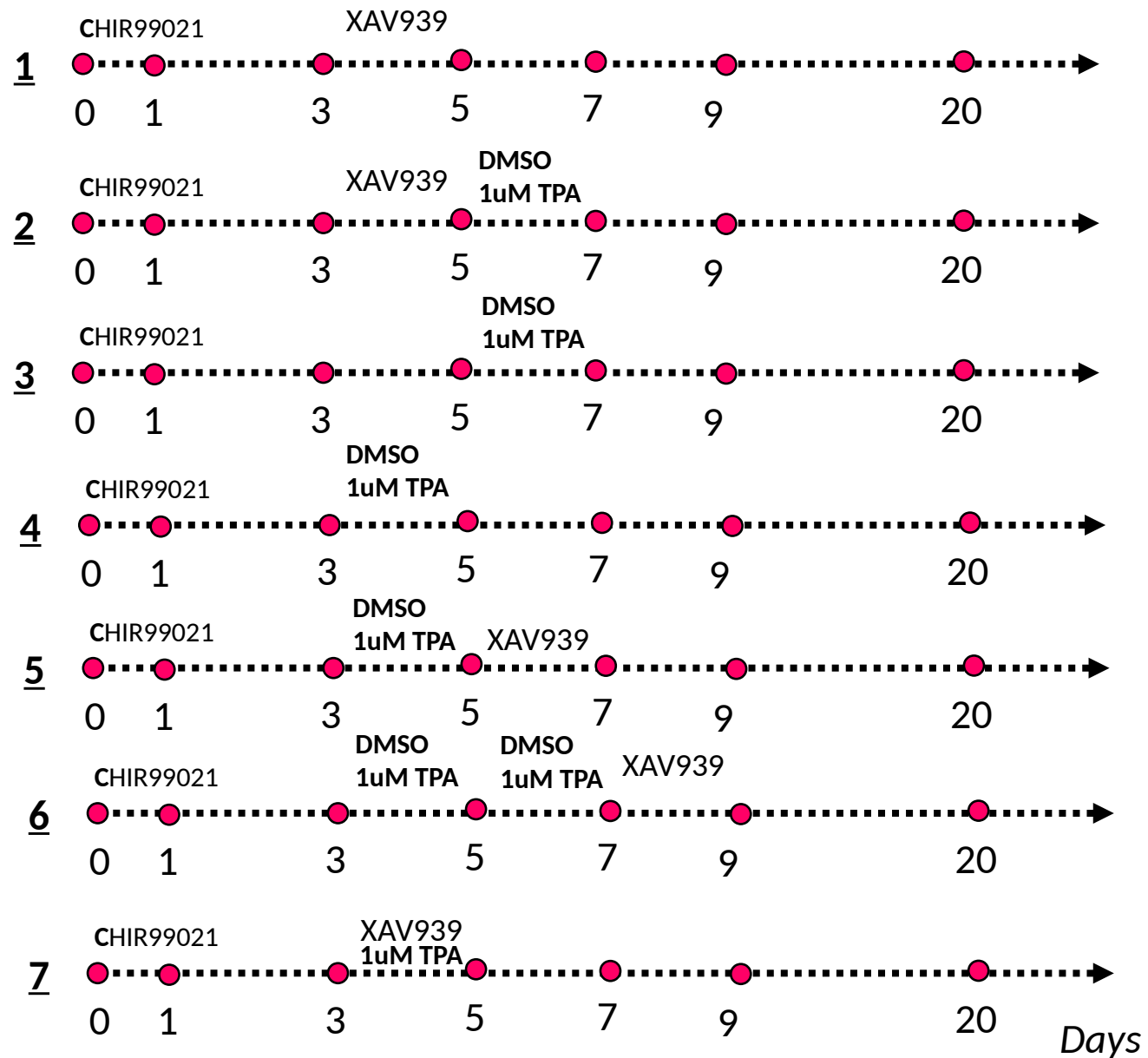
cardiomyocyte

# Příprava kardiomyocytů

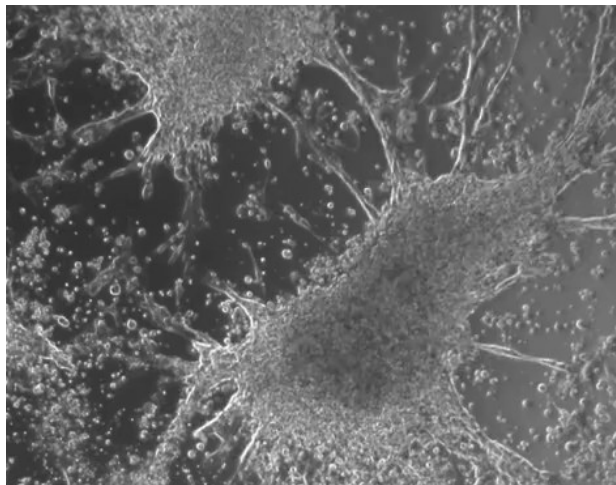
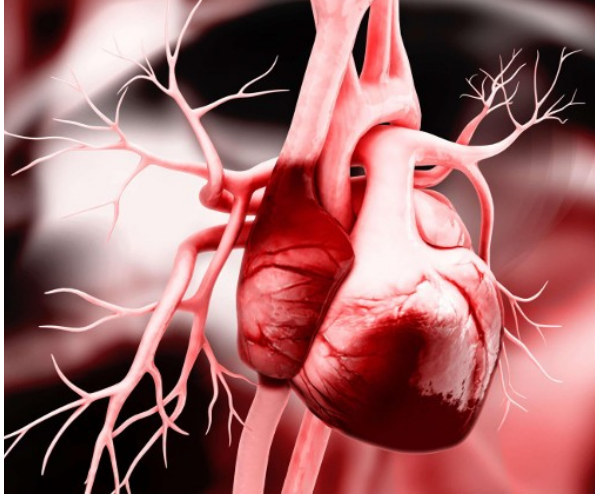
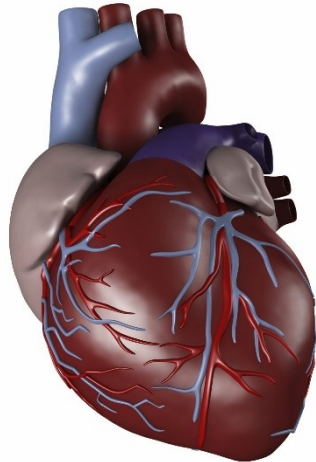
## - hledání látek vedoucí k proliferaci kardiomyogenních progenitorů



# Jak vylepšit efektivitu kardiomyogeneze => vliv různých biologicky aktivních látek



Problémy => **Zralost kardiomyocytů – in vitro připravené kardiomyocyty steží dosahují zralosti embryonálních kardiomyocytů**

	iPSC	Fetální srdce	Adultní srdce
<b>BUŇKY</b>			
<b>Vlastnosti</b>			
<b>Morfologie</b>	menší, oválné, jednojaderné	menší, oválné, jednojaderné	velké, podlouhé, (vicejaderné)
<b>Sila kontrakce</b>	0.1–0.5 mN/mm <sup>2</sup>	cca 0.4 mN/mm <sup>2</sup>	10–50 mN/mm <sup>2</sup>
<b>Kontrakce</b>	spontánní, asynchronní	spontánní, asynchronní	indukovaná, synchronní
<b>Vápníkové kanály</b>	T-typ/L-typ	T-typ/L-typ	L-typ
<b>Mitochondrie</b>	malé, neuspořádané, <b>bez kríst</b> , v menším počtu	malé, okrouhlé, neuspořádané, <b>bez kríst</b>	oválne, uspořádané, <b>s krístami</b> , zabírají 35% objemu buňky
<b>Substrát pro výrobu ATP</b>	glukóza	glukóza	mastné kyseliny

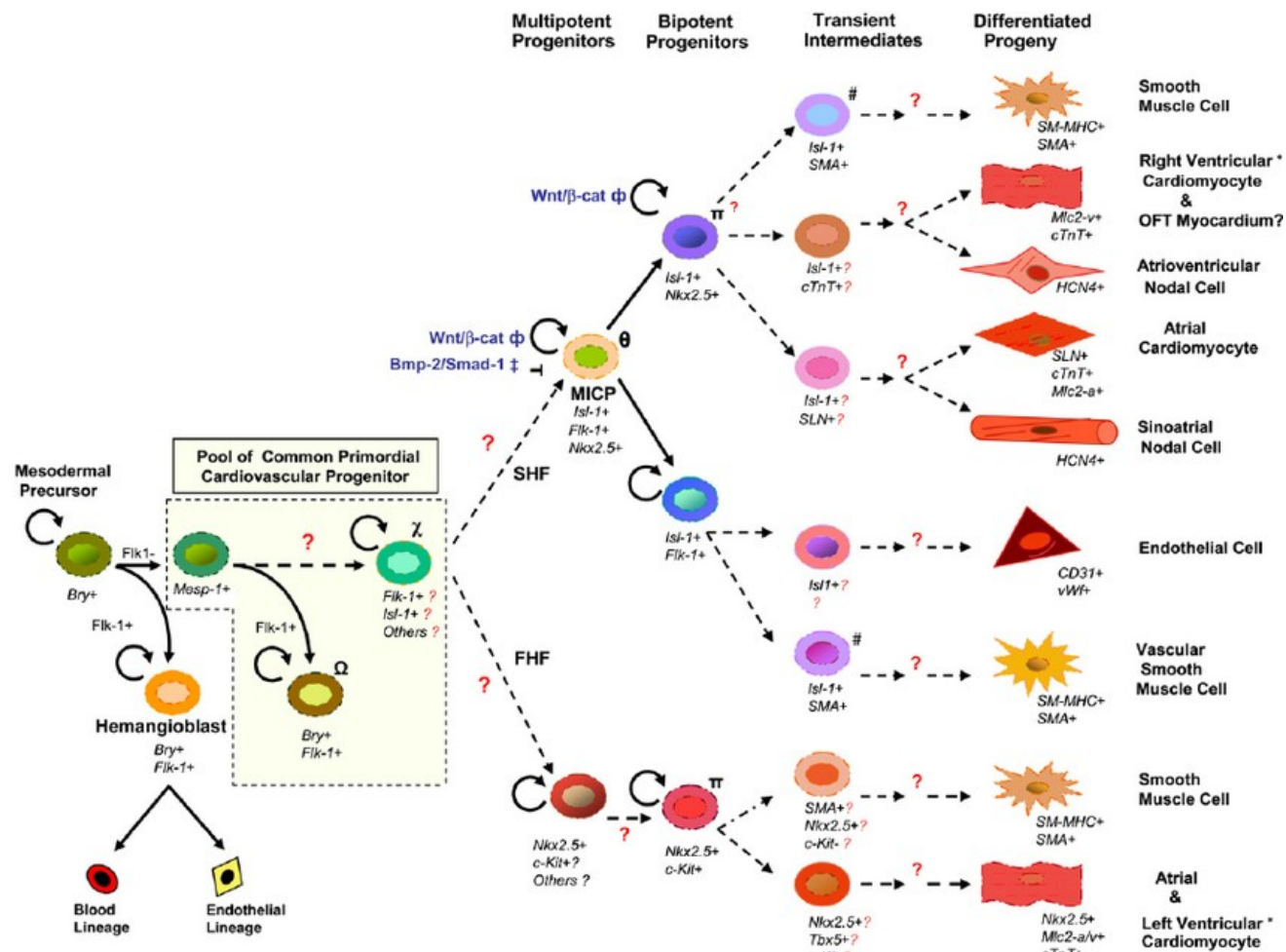
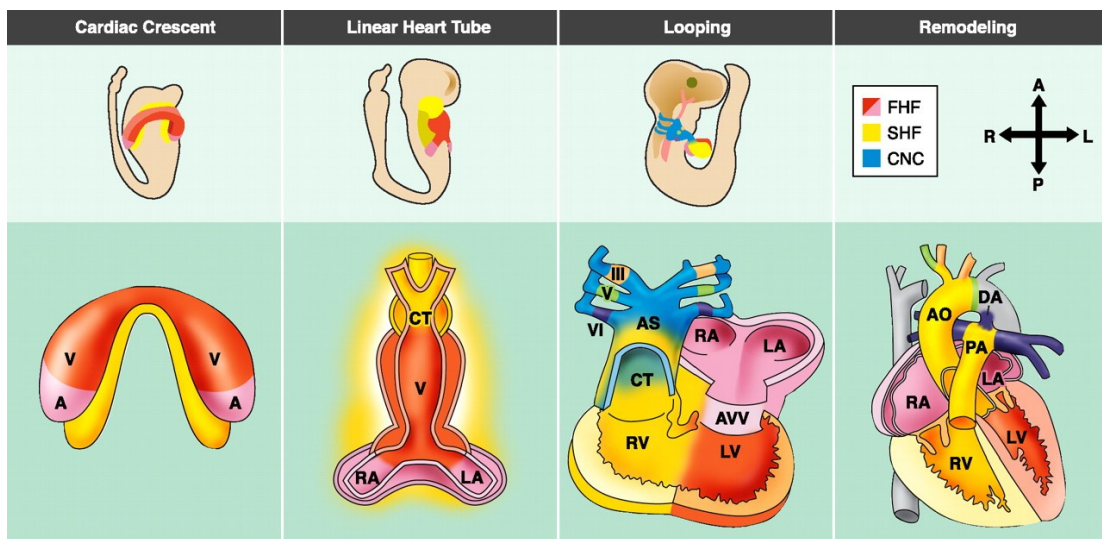


# Problémy => Specifita kardiomyocytů - není kardiomyocyt jako kardiomyocyt, vzniká směs různých typů kardiomyocytů

... tvořený mnoha typy buněk

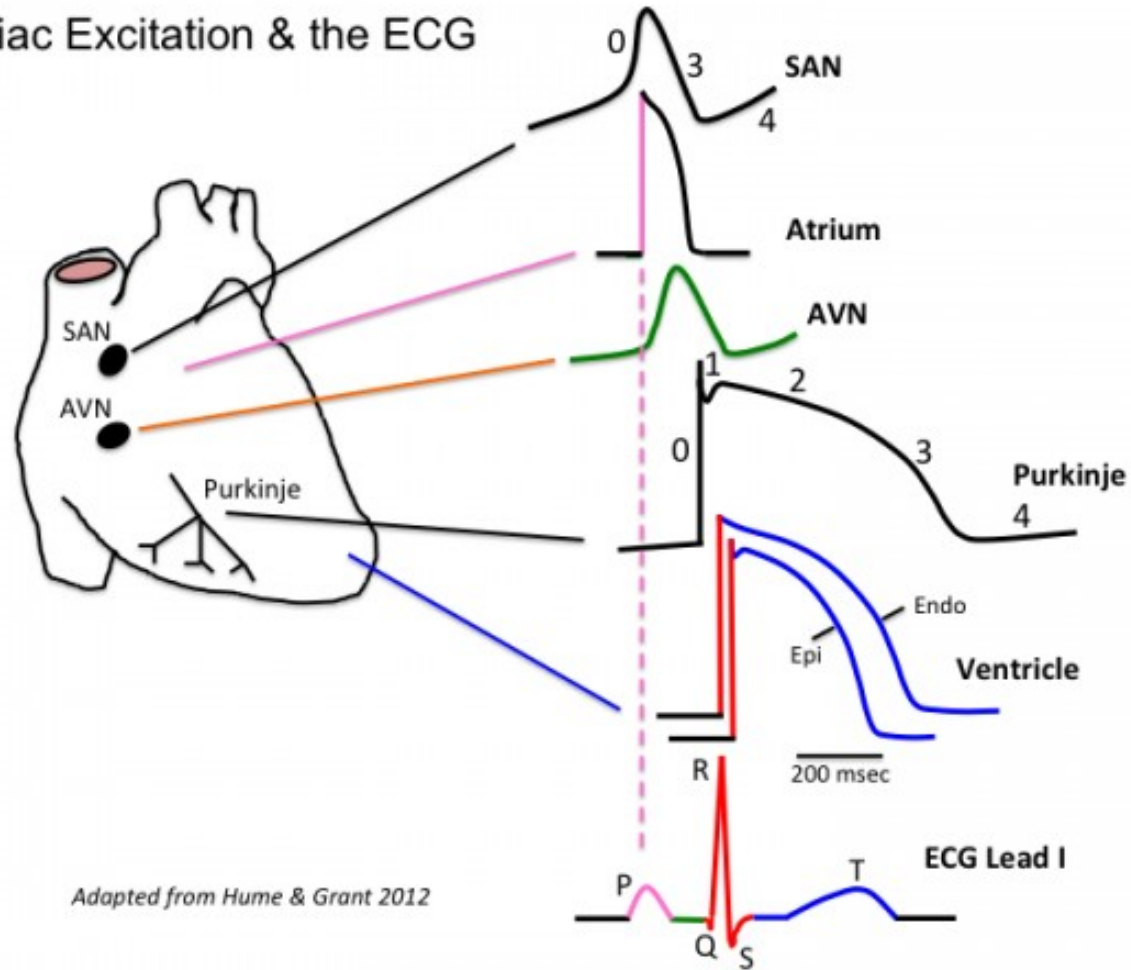
## Srdce

- První funkční orgán organismu
- Komplikovaný vývoj
- Nezbytné pro život větších živočichů

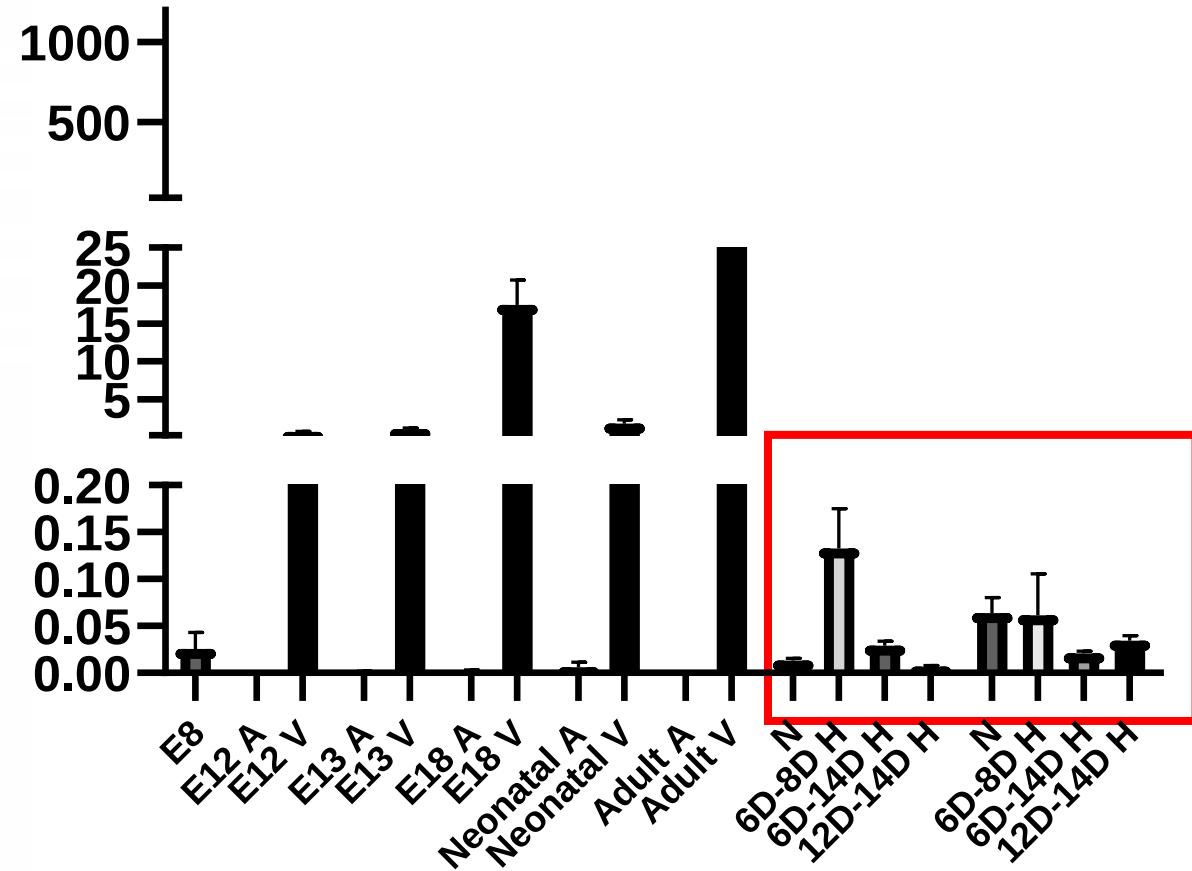


# MATURACE & FENOTYP

## Cardiac Excitation & the ECG



## myl2/myl7



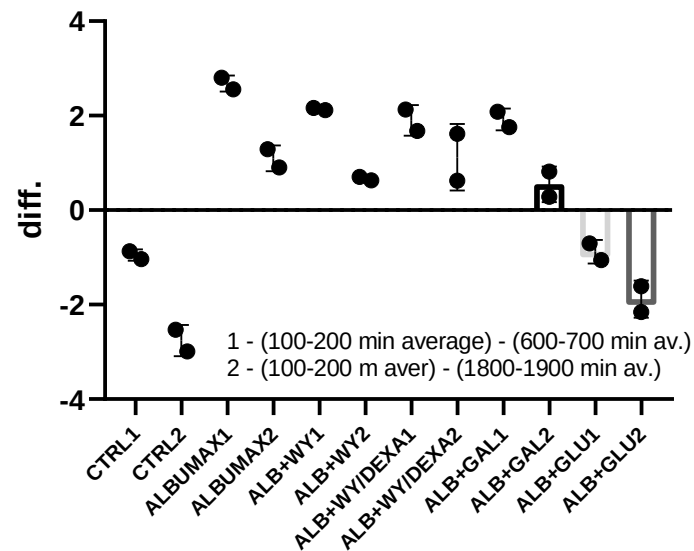
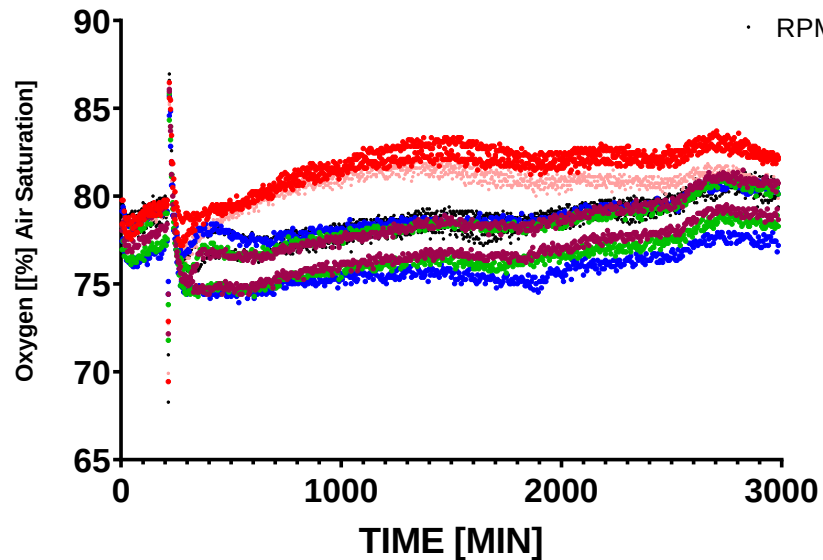
E - den embryonálního vývoje    A - atrium  
H - srdce    V - ventrikulum

# MATURACE & FENOTYP

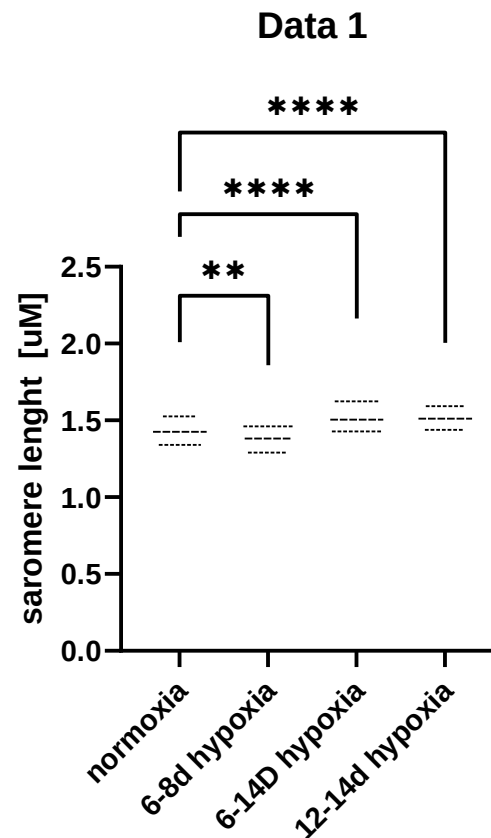
## Analýzy spotřeby kyslíku

- STANDARD
- ALBUMAX
- ALBUMAX+WY
- ALBUMAX+WY/DEXA
- RPMI-GLU+ 3mM GLUCOSE+ALBUMAX
- RPMI-GLU + GAL + ALBUMAX

### ALBUMAX

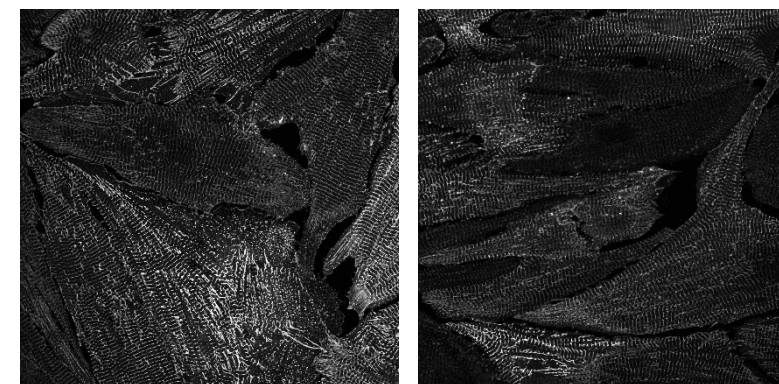
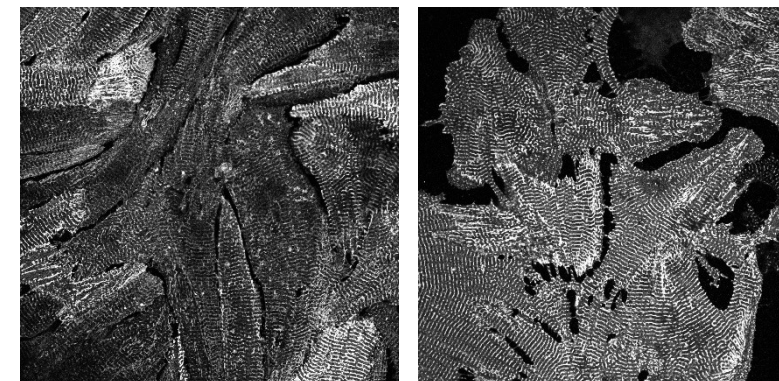


## Analýzy morfologie buněk - délka sarkomer



NORMOXIA

H 6-8



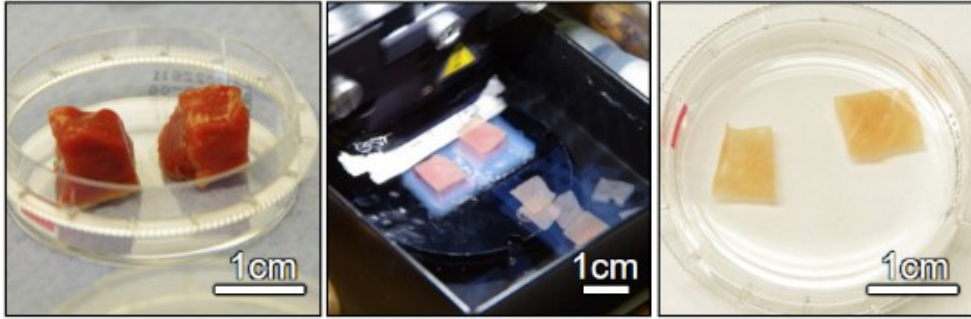
H 6-14

H 12-14

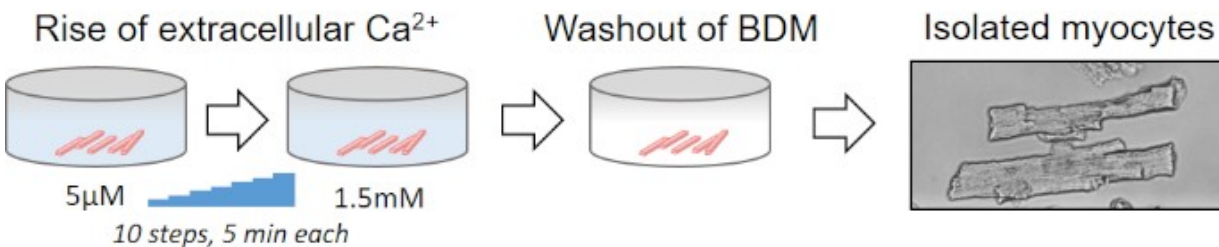
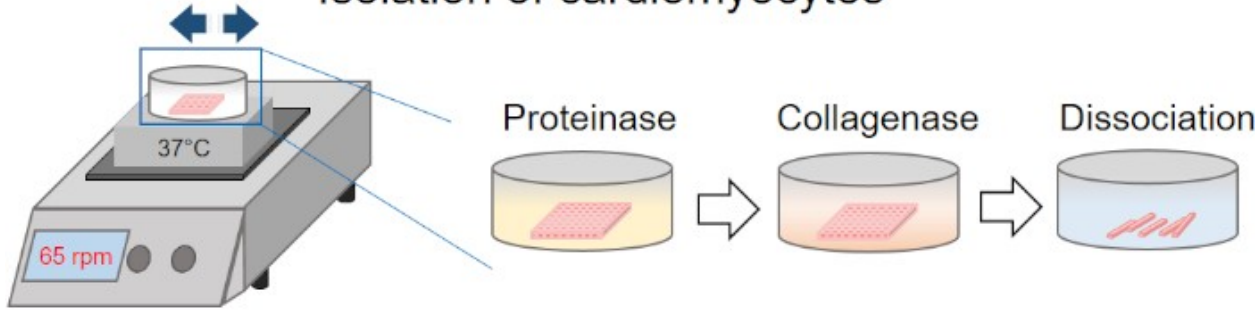
# MATURACE & FENOTYP

Tkáňové řezy – kultivace tkáně in vitro, izolace jednotlivých buněk, srovnání vlivu in vitro podmínek na fenotyp buněk

### Generation of myocardial slices

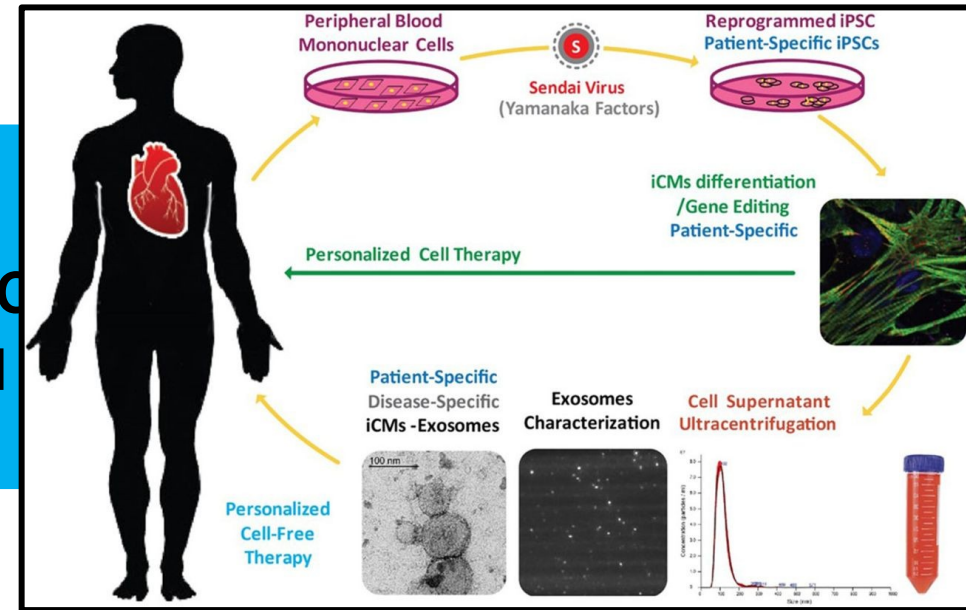


### Isolation of cardiomyocytes

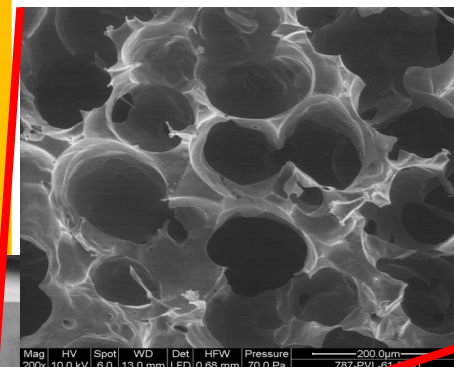


Spolupráce:

# Markéta Bébarová & Tomáš Bárta, Lékařská fakulta MU PŘÍPRAVA IPSC, PŘÍPRAVA IPSC Z PACIENTŮ S VADOU SRDCE A JEJICH PŘEMĚNA NA KARDIOMYOCYTY PRO STUDIUM PODSTATY DANÝCH VAD, PERSONALIZOVANÁ TERAPIE

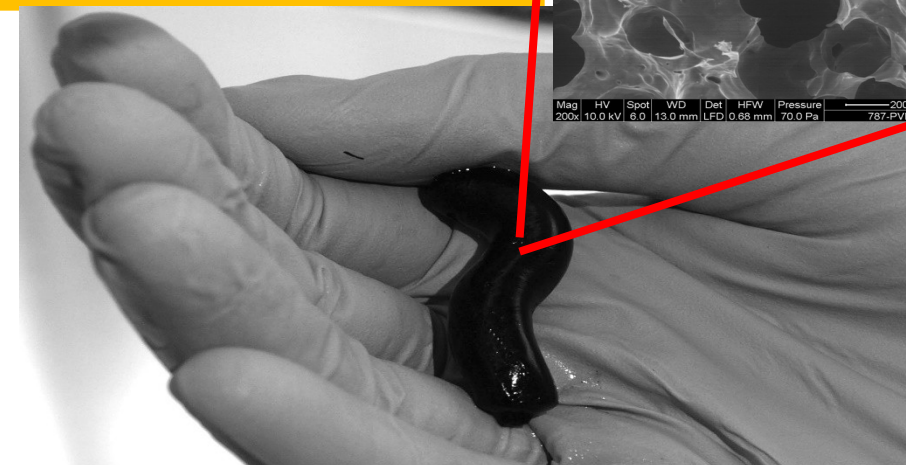
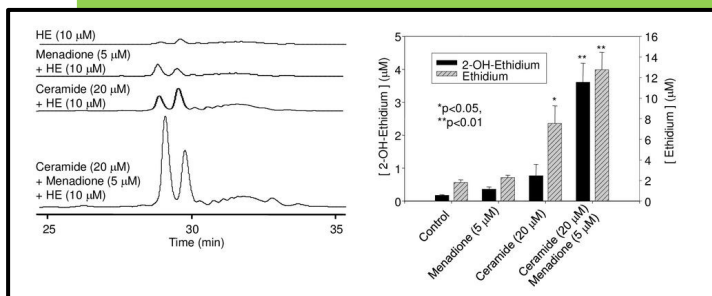


# Petr Humpolíček, Fakulta technologická, Univ. Tomáše Bati ve Zlíně VÝVOJ NOVÝCH MATERIÁLŮ PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ A BIOMONITORING



# Lukáš Kubala, Biofyzikální ústav AV CR, Brno

## BIOCHEMICKÉ ANALÝZY



Náměty na téma závěrečných prací: <https://is.muni.cz/auth/osoba/6371#skolitel>

Variace na témata:

**Jak regulovat fenotyp kardiomyocytů, jejich zralost, jejich specializaci?**

**Je možné připravit kmenové buňky myokardu? Jak toho dosáhnout?**

**JIPAlab** – OFIŽ, Ústav experimentální biologie, Masarzkova univerzita

Univerzitní kampus Bohunice D36; <https://www.sci.muni.cz/ofiz/pachernik/>



2021

Publikace: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Pachernik&sort=pubdate>

Závěrečné práce: <https://is.muni.cz/auth/osoba/6371#skolitel>

**Děkuji za pozornost**

Jiří Pacherník  
[jipa@sci.muni.cz](mailto:jipa@sci.muni.cz)  
D36/111