

Vývoj a testování scaffoldů pro kolenní chrupavkové implantáty

Bc. Iveta Danilová, Ing. Eva Košťáková, Ph.D.

Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo navrhnout, optimalizovat výrobu a vyrobit scaffoldy pro použití v tkáňovém inženýrství chrupavky. Pro výrobu 3D scaffoldů metodou vymývání částic byl zvolen poly(ϵ -kaprolakton). Do polymeru bylo přimícháno různé množství mikročástic chitosanu pro zlepšení mechanických vlastností. U všech vzorků byla analyzována jejich struktura a biologicky testována vhodnost vyrobených scaffoldů pro životaschopnost, proliferaci a diferenciaci buněk.

Úvod

Tkáňové inženýrství je inovativní obor, který propojuje biologii, chemii, fyziku, medicínu, ale i inženýrství biomateriálů, nebo počítačové modelování. Zabývá se vývojem nových biologických preparátů sloužících pro náhradu, regeneraci nebo zlepšení funkce lidských orgánů. Jako scaffoldy jsou označovány tkáňové nosiče, které vytváří mechanickou podporu a vhodné prostředí pro navázání a proliferaci buněk.

V dostupných studiích týkajících se tkáňového inženýrství chrupavky nebyly nikdy vytvořeny scaffoldy kombinací poly(ϵ -kaprolaktonu) (dále PCL) a chitosanu metodou vymývání částic. Touto metodou byly vyrobeny pouze scaffoldy z PCL, které byly vyztuženy jiným materiálem [3]. V pokusech, kde byly scaffoldy vyrobeny zvláště z PCL a chitosanu, vykazují oba dva tyto biokompatibilní materiály velmi dobré vlastnosti. Proto bylo použito PCL jako polymeru pro vznik porézního scaffoldu a chitosanových mikročástic pro vyztužení, zlepšení mechanických a případně i biologických vlastností.

Experiment a metody

Principem metody vymývání částic je vytvoření roztoku polymeru a jeho rozpouštědla, smíchání roztoku s vhodným porogenem, následné pozvolné odpařování rozpouštědla a konečné vymývání porogenu.

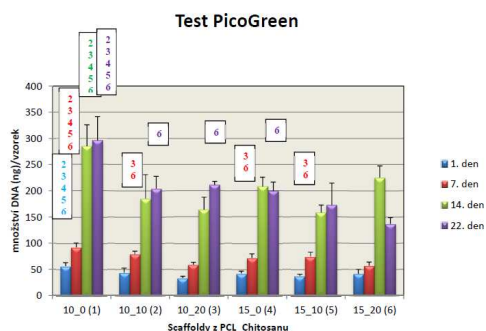
V pokusu byl použit jako rozpouštěný polymer PCL o koncentraci 10 hm% a 15 hm%. Rozpouštědlem byla směs etanolu a chloroformu v podílu 10 hm% etanolu a 90 hm% chloroformu, jako porogen byl použit chlorid sodný. Poměr a druh rozpouštědla byl zvolen po předchozí rešerši odborných článků. Přesné složení jednotlivých roztoků je v Tabulce 1, celkový objem byl vždy 30 ml.

Tabulka 1. Množství polymeru, chitosanu a rozpouštědla v jednotlivých roztocích.

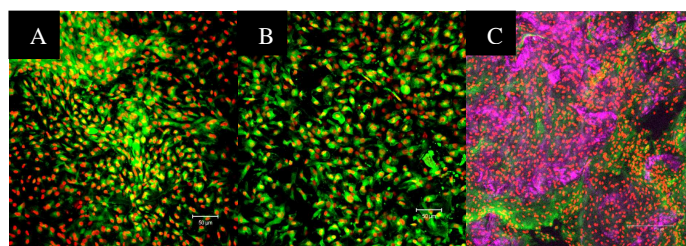
Pořadí vzorku	Označení vzorku	Obsah PCL (%)	Obsah chitosanu (%)	Množství PCL (g)	Množství chitosanu (g)	Množství etanolu (g)	Množství chloroformu (g)
1	10_0	10	0	3	0	2,7	24,3
2	10_10	10	10	3	0,3	2,7	24,3
3	10_20	10	20	3	0,6	2,7	24,3
4	15_0	15	0	4,5	0	2,5	23
5	15_10	15	10	4,5	0,3	2,5	23
6	15_20	15	20	4,5	0,6	2,5	23

Výsledky a diskuze

Všechny vzorky byly biologicky testovány na Oddělení tkáňového inženýrství Ústavu experimentální medicíny AV ČR. Životaschopnost buněk (viabilita) byla testována pomocí MTS testu 1., 7., 14. a 22. den. Ve stejné dny byla testována i buněčná proliferace pomocí testu PicoGreen (Obrázek 1). Proliferace byla testována také pomocí testu BrdU 3. a 7. den kultivace. Přítomnost a diference buněk byla vizualizována pomocí imunohistochemického barvení a následné konfokální mikroskopie. Přítomnost více druhů kolagenu byla vizualizována pomocí Second Harmonic Generation (SHG) a konfokální mikroskopie (Obrázek 2).



Obrázek 1: Graf výsledků testu PicoGreen. Nad hodnotou grafu jsou vždy uvedena čísla vzorků, která byla signifikantně nižší.



Obrázek 2: Vizualizace jader chondrocytů (červeně) a cytoplazmatických membrán (zeleně) pomocí konfokálního mikroskopu. Scaffoldy z PCL a chitosanu 10_10 (A) a 15_0 (B). Jádra chondrocytů červeně, kolagen II zeleně a celkový kolagen fialově pomocí SHG na vzorku 10_0 (C). Vyznačené měřítko odpovídá 50 μm (A, B) a 150 μm (C).

Závěr

Z výsledků testů nelze jednoznačně určit nejlepší materiál, všechny materiály byly hodnoceny jako velmi dobré. Materiály, které měly vynikající výsledky proliferace (scaffoldy z 10 % PCL bez chitosanu), mají makroskopicky horší mechanické vlastnosti. Obecně se ale scaffoldy z 10 a 15 % PCL s 0 a 10 % chitosanu zdají jako velmi slibné materiály vhodné pro využití v tkáňovém inženýrství chrupavky. Zajímavé by bylo srovnání vyrobených scaffoldů s materiály z PCL a chitosanovými nanovláknky. Výroba 3D porézních scaffoldů s rozdispergovanými nanovláknky, které v materiálu vytvoří pouze nanodrstnosti, by mohla být velmi slibná cesta budoucnosti této problematiky.

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat Mgr. Evě Filové, Ph.D. která vedla mé osobní biologické testování na Oddělení tkáňového inženýrství Ústavu experimentální medicíny AV ČR a panu prof. RNDr. Evženu Amlerovi za umožnění této praxe a materiálovou podporu.

Reference

- [1] **GOODE**, Jamie. *Tissue engineering of cartilage and bone*. Novartis Foundation Symposium. London: Wiley, 2003. 251 s. ISBN 0-470-84481-7.
- [2] **NEVES**, Sara C., Liliana S. MOREIRA TEIXEIRA, Lorenzo MORONI, Rui L. REIS, Clemens A. VAN BLITTERSWIJK, Natália M. ALVES, Marcel KARPERIEN a João F. MANO. *Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair: Processing optimization*. Biomaterials. 2011, vol. 32, issue 4, s. 1068-1079. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.073.
- [3] **CANNILLO**, V., F. CHIellini, P. FABBRI a A. SOLA. *Production of Bioglass® 45S5 – Polycaprolactone composite scaffolds via salt-leaching: scaffold fabrication technology*. New Jersey: World Scientific, c2007, xxix, 258 p. ISBN 10.1016/j.compstruct.2010.01.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026382231000036X>.