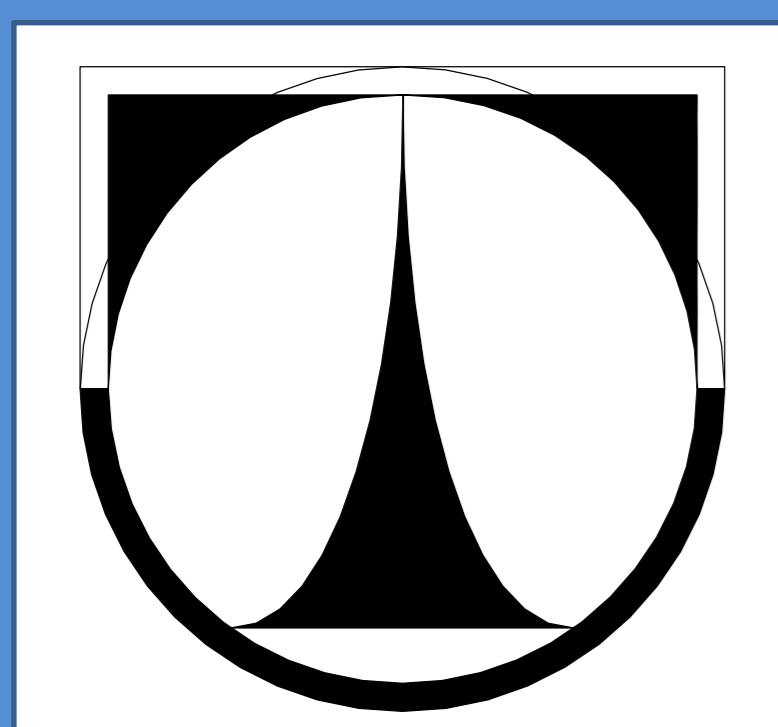


## Vývoj a testování scaffoldů pro kolenní chrupavkové implantáty



**Bc. Iveta Danilová**  
ivetadanilova@seznam.cz

**Ing. Eva Košťáková, Ph.D.**



### Abstract:

The main aim was to design, optimize production and produce scaffolds for using in tissue engineering of cartilage. The particle leaching method was used to produce 3D scaffolds. Sodium chloride was eluted, and poly( $\epsilon$ -caprolactone) was used as a porous material. A different amount of chitosan microparticles was mixed in polymer to improve mechanical properties. All samples were analyzed in their structure, and the suitability of manufactured scaffolds for viability, proliferation and differentiation of cells was tested.

### Úvod:

Pro tkáňové inženýrství chrupavky je nezbytný vývoj nových biokompatibilních, biodegradabilních a neimunogenních materiálů podporujících správnou proliferaci a diferenciaci buněk (1). Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) byl použit pro výrobu 3D porézních scaffoldů metodou vymývání částic, materiál byl vyztužen mikročásticemi chitosanu.

### Metodika a příprava vzorků:

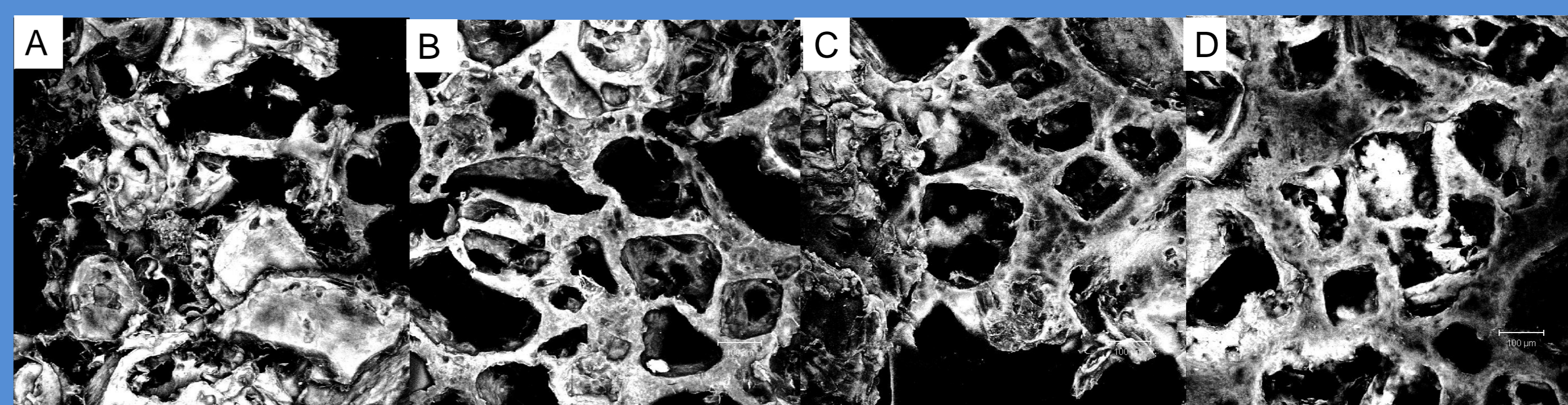
Scaffoldy byly vyrobeny z 10 % a 15 % PCL a 0, 10 a 20 % mikročástic chitosanu. Vzorky s průměrem 6 mm byly osázeny  $45 \cdot 10^3$  prasečími chondrocyty a biologicky testovány. Proliferace byla měřena pomocí testu PicoGreen a BrdU. Viabilita byla stanovena pomocí testu MTS. Buňky byly vizualizovány na konfokálním mikroskopu barvením DiOC6 a propidium jodidem. Kolagen typu II byl zabarvený imunohistochemicky a vizualizovaný pomocí multifotonové mikroskopie.

### Výsledky a diskuse:

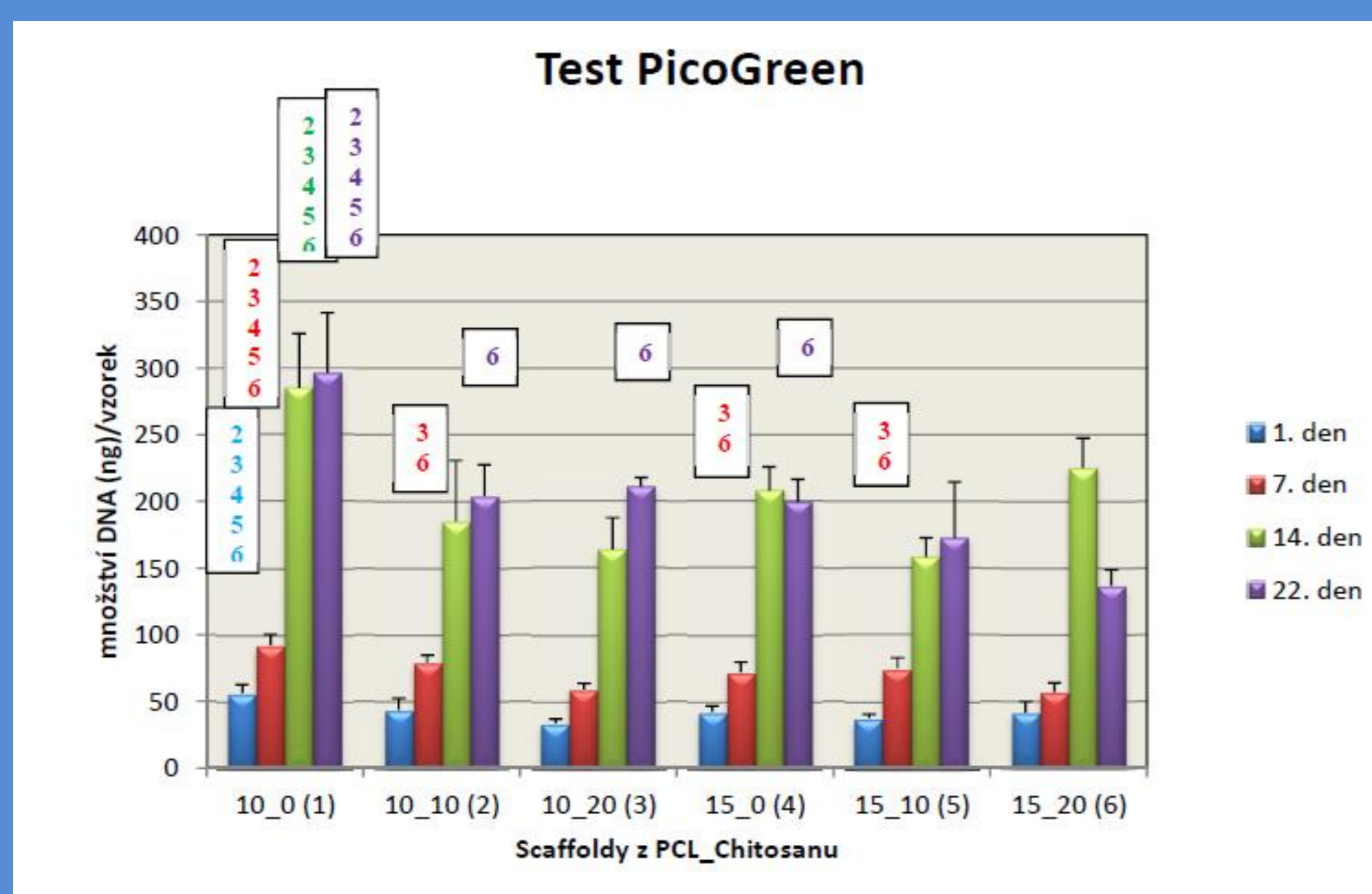
- Přítomnost kolagenu II byla nejvyšší u čistých PCL scaffoldů.
- Vzorky s obsahem 20 % chitosanu negativně ovlivnily proliferaci chondrocytů a následně i tvorbu kolagenu II.
- Z výsledků testů nelze jednoznačně určit nejlepší materiál, všechny materiály byly hodnoceny jako velmi dobré.
- Materiály, které měly vynikající výsledky proliferace (jedná se o scaffoldy z 10 % poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu)), mají makroskopicky horší mechanické vlastnosti.

### Závěr:

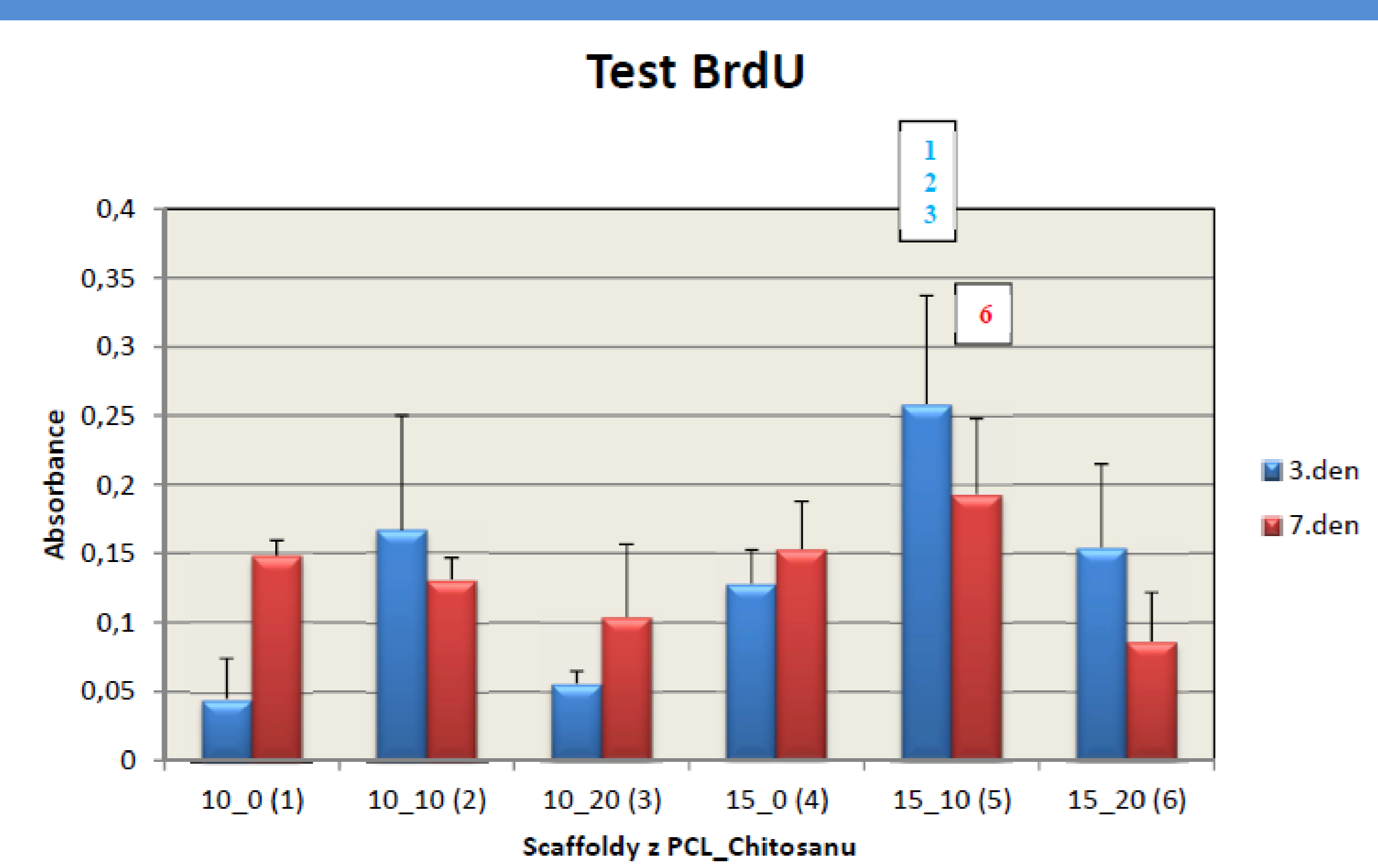
Scaffoldy z 10 a 15 % PCL s 0 a 10 % chitosanu se zdají jako velmi slibné materiály vhodné pro využití v tkáňovém inženýrství chrupavky.



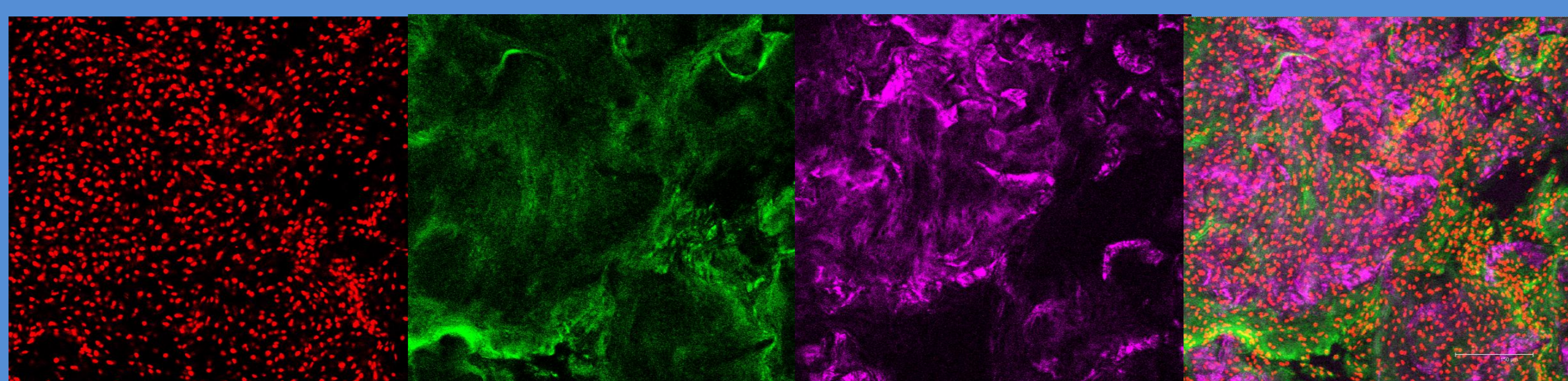
**Obr 4:** Snímky scaffoldů z PCL a chitosanu 10\_0 (A), 10\_10 (B), 15\_0 (C), 15\_10 (D) bez buněk z konfokálního mikroskopu. Vyznačené měřítko odpovídá 100  $\mu$ m



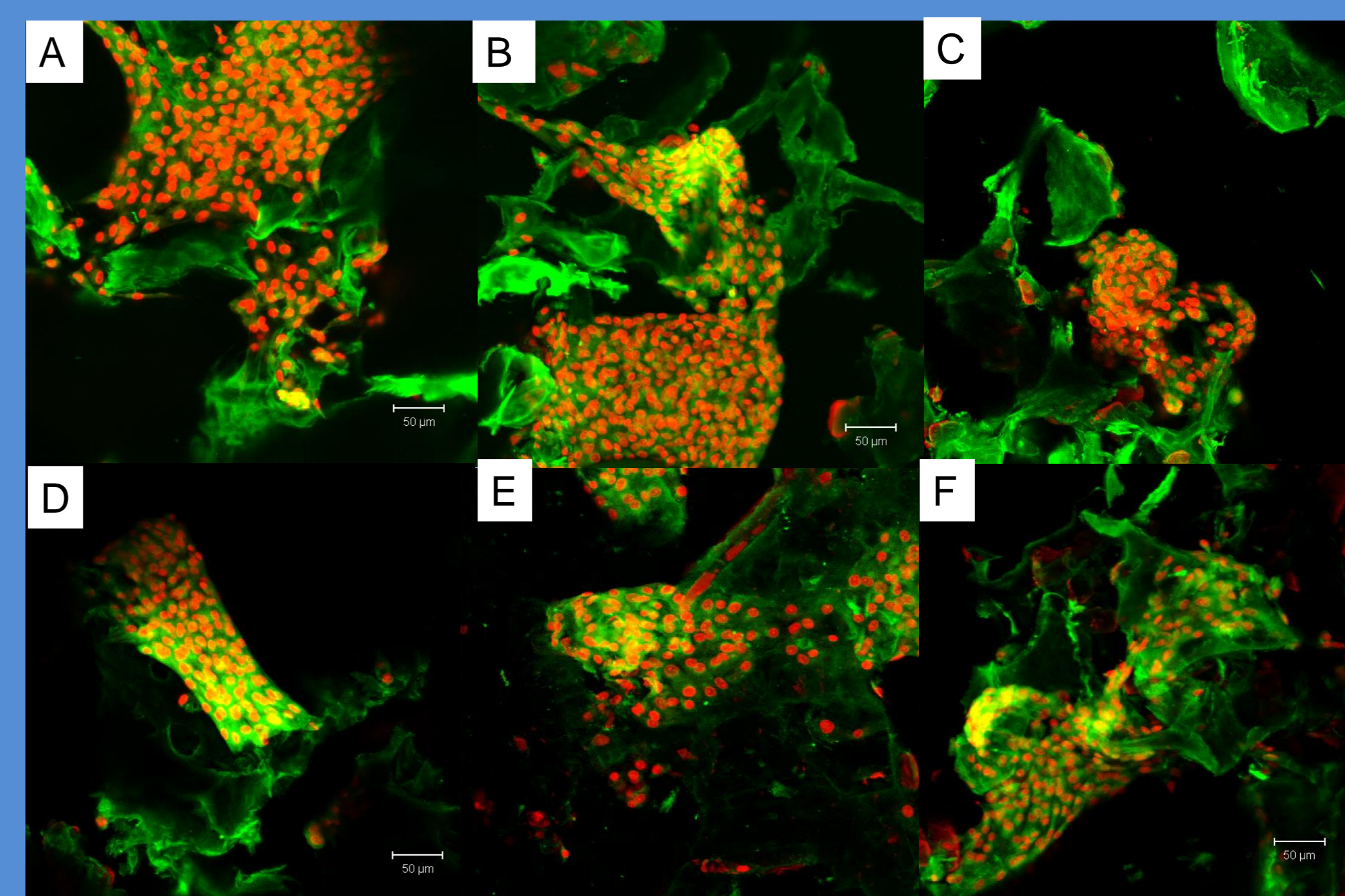
**Obr 1:** Test PicoGreen. Množství DNA bylo u 10\_0 PCL\_CH po celou dobu kultivace signifikantně vyšší než u ostatních scaffoldů. 7. den bylo signifikantně menší množství DNA u obou vzorků s 20 % chitosanu a 22. den u 15\_20 PCL\_CH než u ostatních scaffoldů.



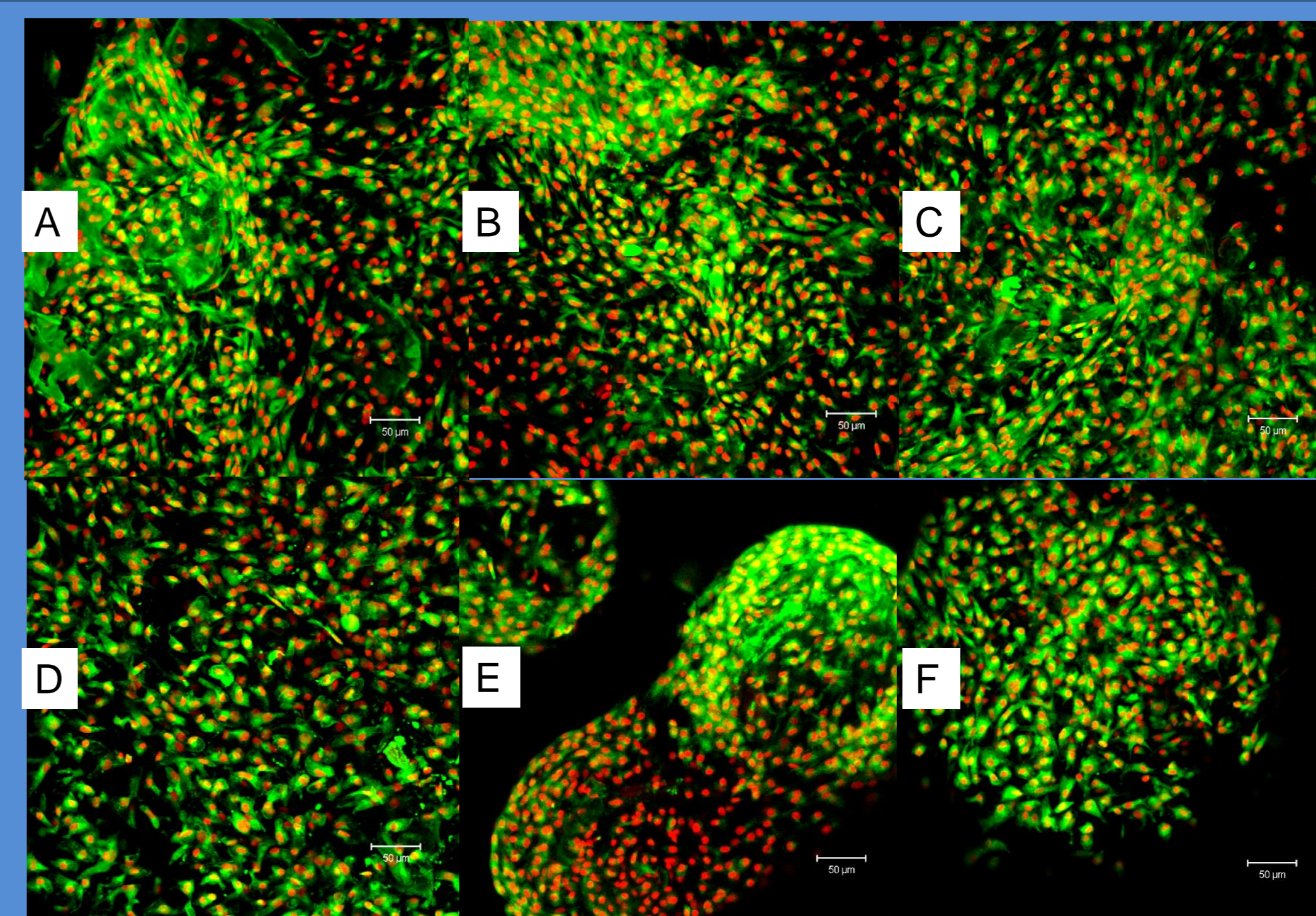
**Obr 2:** BrdU měření 3. den ukázalo signifikantně lepší proliferaci na 15\_10 PCL\_CH než u scaffoldů s 10 % PCL a 7. den byla naměřena vyšší absorbance u vzorku 15\_10 PCL\_CH než u 15\_20 PCL\_CH.



**Obr 3:** Vizualizace jader (červeně) a kolagenu typu II (zeleně) pomocí konfokálního mikroskopu a celkového kolagenu (magenta) pomocí SHG. Scaffold z 10 % PCL bez mikročástic chitosanu, 14. den kultivace. Vyznačené měřítko odpovídá 150  $\mu$ m.



**Obr 5:** Vizualizace jader chondrocytů (červeně) a cytoplazmatických membrán (zeleně) pomocí konfokálního mikroskopu – 1. den. Scaffoldy z PCL a chitosanu 10\_0 (A), 10\_10 (B), 10\_20 (C), 15\_0 (D), 15\_10 (E) a 15\_20 (F). Vyznačené měřítko odpovídá 50  $\mu$ m.



**Obr 6:** Vizualizace jader chondrocytů (červeně) a cytoplazmatických membrán (zeleně) pomocí konfokálního mikroskopu – 14. den. Scaffoldy z PCL a chitosanu 10\_0 (A), 10\_10 (B), 10\_20 (C), 15\_0 (D), 15\_10 (E) a 15\_20 (F). Vyznačené měřítko odpovídá 50  $\mu$ m.

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Evě Filové, Ph.D. která vedla mé osobní biologické testování na ÚEM AVČR, v.v.i. a panu prof. RNDr. Evženu Amlerovi za umožnění této praxe a materiálovou podporu.

Diplomová práce vznikla za podpory Centralizovaného rozvojového projektu č. 12091 s názvem Integrovaný systém vzdělávání v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanobiotechnologiích na UK, ČVUT a TUL.

Práce byla také podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2013.

### Zdroje:

(1) GOODE, Jamie. *Tissue engineering of cartilage and bone*. Novartis Foundation Symposium. London: Wiley, 2003. 251 s. ISBN 0-470-84481-7.