

Injikovatelný hydrogel funkcionalizovaný suspenzí bohatou na trombocyty a mikročásticemi pro urychlení regenerace chrupavky

Injectable Hydrogel Functionalised with Thrombocyte-Rich Solution and Microparticles for Accelerated Cartilage Regeneration

M. RAMPICHOVÁ^{1,2}, M. BUZGO^{2,3}, B. KRÍŽKOVÁ⁴, E. PROSECKÁ², M. POUZAR⁵, L. ŠTRAJTOVÁ⁶

¹ CB Bio s.r.o., Praha-Dolní Počernice

² Ústav biofyziky, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha 5

³ Student Science s.r.o., Horní Podluží

⁴ Univerzita Pardubice, Katedra biologických a biochemických věd, Pardubice

⁵ Univerzita Pardubice, Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Pardubice

⁶ Národní Tkáňové Centrum a.s., Brno

ABSTRAKT

PURPOSE OF THE STUDY

Articular cartilage defects arise due to injury or osteochondral disease such as osteonecrosis or osteochondritis dissecans. In adult patients cartilage has minimal ability to repair itself and the lesions develop into degenerative arthritis. Overcoming the low regenerative capacity of the cartilage cells and the Hayflick limit poses a challenge for the therapy of osteochondral defects. Composite scaffolds with appropriate biomechanical properties combined with a suitable blend of proliferation and differentiation factors could be a solution. The aim of this *in vitro* study was to develop a novel functionalised hydrogel with an integrated drug delivery system stimulating articular cartilage regeneration.

MATERIAL AND METHODS

Injectable collagen/ hyaluronic acid/fibrin composite hydrogel was mixed with nanofibre-based microparticles. These were loaded with ascorbic acid and dexamethasone. In addition, the effect of thrombocyte-rich solution (TRS) was studied. The gels seeded with mesenchymal stem cells (MSCs) were cultivated for 14 days. The viability, proliferation and morphology of the cells were evaluated using molecular and microscopic methods. Scaffold degradation was also assessed.

RESULTS

The cultivation study showed that MSCs remained viable in all experimental groups, which indicated good biocompatibility of the gel. However, the number of cells in the groups enriched with microparticles was lower than in the other groups. On the other hand, confocal microscopy showed higher cell viability and rounded morphology of the cells, which can be associated with chondrogenic differentiation. The scaffolds containing microparticles showed significantly higher stability during the 14-day experiment.

DISCUSSION

Our results suggest that the addition of microparticles to the scaffold improved cell differentiation into the chondrogenic lineage, resulting in a lower proliferation rate. Cell viability was better in the groups enriched with microparticles that served as an efficient drug delivery system. In addition, the presence of microparticles slowed down gel degradation which can help achieve sufficient stability of the system for the time frame required for cartilage regeneration.

CONCLUSIONS

The novel approach described here produced an efficient system where microparticles served as a drug delivery system and stabilised the gel for prolonged periods of time. These characteristics play an important role in the development of scaffolds for cartilage regeneration. In the future the results of these *in vitro* experiments will be verified in an *in vivo* study.

Key words: composite hydrogel, microparticles, nanofibres, thrombocytes, mesenchymal stem cells, cartilage.

ÚVOD

Pro správnou funkci kloubů je velmi důležitá kloubní chrupavka. Její poškození a degenerace jsou spojovány s osteoartritidou. Používanými technikami pro terapii hlubokých defektů chrupavky je implantace alogenních i autologních osteochondrálních štěpů (mozaiková plastika) (9). Tento přístup je však technicky náročný a způsobuje zatížení pacienta. Alogenní štěpy s sebou nesou riziko přenosu infekce, obtížně se získávají a jsou drahé. Jejich alternativou je použití nosičů osazených buňkami, které usnadní hojení defektu. Tímto způsobem lze výrazně zjednodušit chirurgický zákrok bez potřeby dárčové tkáně.

V nedávné době bylo objeveno, že pluripotentní mezenchymální kmenové buňky kostní dřene, tukové tkáně nebo pupečnickové krve, se pomocí působení růstových faktorů, chemického složení, fyzikálních a biomechanických vlastností prostředí a rozdílným biomechanickým namáháním materiálu mohou diferencovat v chrupavku, kostní či jinou tkáň (12, 21, 24). Terapie založená na kmenových buňkách již je v klinické praxi (8). Je známo, že některé vláknenné nosiče podporují adhezi, proliferaci a diferenciaci kmenových buněk. Elektrostaticky zvlákněná nanovláknna mají vysokou porozitu a velké množství vzájemně propojených pórů, což umožňuje efektivní výživu buněk a odstraňování zplodin jejich metabolismu. To je velmi důležitý fakt, neboť chrupavka je avaskulární tkáň, která má pouze omezenou schopnost regenerace. Tloušťka nanovláken je podobná tloušťce vláken extracelulární matrix (2, 30). Nanovláknenné nosiče mají navíc velký poměr povrchu a objemu a usnadňují buněčnou adhezi a proliferaci (14, 15, 20, 22, 28). Tyto jedinečné vlastnosti buňkám poskytují početná místa k vzájemnému kontaktu.

Využití nanovláken v kompozitních nosičích omezují jejich některé nevýhody, jmenovitě jejich nedostačující biomechanické parametry. Oblíbeným materiálem pro přípravu kompozitních nosičů jsou hydrogely. Obsahují až 90 % vody (3, 9). Umožňují dobrý transport živin a zplodin metabolismu a také homogenní distribuci buněk. Struktura hydrogelu přenáší mechanické síly podobně jako nativní chrupavka.

Další jasnou výhodou hydrogelů je jejich injikovatelnost. Je možné je vpravit přímo do defektu a vyplnit jimi defekty nejrůznějších tvarů a velikostí. Následně mohou být polymerizované chemicky (2) nebo fyzikálně – světlem (4) nebo teplem (19). Takový materiál lze navíc funkcionalizovat bioaktivními molekulami – lze vyvinout systém pro řízené dodávání léčiv. Hydrogelové systémy na bázi kolagenu (16), alginátu (11) nebo fibrinu (7) již byly *in vivo* testovány v léčbě osteochondrálních defektů.

Důležitým aspektem v optimalizaci biomechanických vlastností kompozitních nosičů je správná směs proliferčních a diferenciacních faktorů. Taková směs musí být plně biokompatibilní a musí být před jakýmkoli použitím u člověka schválena příslušnými orgány. Protože trombocyty tyto předpisy splňují, přitahují pozornost tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Trombocyty jsou zdrojem několika růstových faktorů a jiných

bioaktivních molekul a hrají důležitou roli v regeneraci tkáně a v hojení (18). Často jsou používány ke stimulaci buněčné proliferace a syntézy chrupavčité matrix *in vitro* (10, 1).

Tato *in vitro* studie se zabývá vytvořením nového injikovatelného kompozitního hydrogelu, který má optimální biomechanické parametry a zároveň slouží jako zdroj přirozených růstových faktorů. Takový systém by mohl být využíván samotný i osazený buňkami. Jako základ pro náš injikovatelný systém pro dodávání léčiv byly použity gely na bázi fibrinu, kyseliny hyaluronové a kolagenu I. Gely navíc byly již v minulosti úspěšně studovány *in vitro* a *in vivo* v naší laboratoři (5, 6, 27). Cílem byla optimalizace kohezivitu gelu nanovláknennými fragmenty a funkcionalizace systému přidáním TRS a diferenciacních faktorů, které byly do nanovláknenných fragmentů enkapsulovány.

MATERIÁL A METODIKA

Příprava PCL nanovláken

Nanovláknna byla připravena pomocí metody bezjehlového elektrostatického zvláknění z PCL o molekulové hmotnosti 45 000 (Sigma Aldrich). K zvláknění 14% roztoku PCL (w/v) bylo použito modifikované zařízení Nanospider™ (Elmarco, CZ), které bylo detailně popsáno dříve (17). Nanovláknna obsahující kyselinu askorbovou (1 mg/ml v 14% PCL) a dexamethazon (10 µg/ml v 14% PCL) byla zvlákněna za stejných podmínek.

Kryogenní mletí PCL nanovláken

K namletí PCL nanovláken byl použit kryogenní mlýnek model 6750 Freezer Mill (Spex, Certiprep, USA). Mletí probíhalo při teplotě tekutého dusíku, jak bylo popsáno dříve v publikaci Knotek a kol. (13). 0,2 g PCL nanovláken bylo vloženo do zkumavky obsahující 3 ml Pluronicu F-68. Mletí probíhalo ve 3 cyklech s předmražením 5 min. Každý cyklus sestával z mletí a ochlazení (1 min). Rychlost impaktoru byla 12 Hz. Získané částice byly separovány pomocí vakuového rozdělovače s membránou o velikosti pórů 0,2 µm.

Elektronová mikroskopie

Vysušené vzorky PCL nanovláken a namletých mikročástic byly pokryty vrstvou zlata o tloušťce 60 nm pomocí Polaron Sputter-coater (SC510, Polaron, Now Quorum Technologies Ltd). Vzorky byly vizualizovány pomocí Aquasem (Tescan) skenovacího mikroskopu v sekundárním elektronovém módu při 15 kV.

Izolace a kultivace mezenchymálních kmenových buněk

Kostní krev byla odebrána z lopaty kosti kyčelní miniaturního prasete (věk 6–12 měsíců), jak bylo popsáno dříve (25). Kostní krev byla odebrána pomocí bioptické jehly (15G/70mm) do stříkačky o objemu 10 ml, obsahující 5 ml fosfátového pufru (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - PBS) s 2 % fetálního bovinního séra (FBS, StemCell Technologies) a 25 IU heparinu/ml. Za sterilních podmínek byl roztok (přibližně 20 ml) přene-

sen do 50ml centrifugační zkumavky s 5 ml Gelofusinu (B. Braun Melsungen, Německo). Zkumavky byly inkubovány 30 min a následně centrifugovány při 400 x g 15 min. Vrstva obsahující mononukleární buňky byla odebrána a nasazena do kultivační lahve. Použité kultivační médium (α -MEM medium with Earle's Salt with L-Glutamine; PAA), bylo obohaceno 10 % fetálního bovinního séra (FBS) a doplněno antibiotiky (penicillin/streptomycin – 100 I.U./ml a 100 μ g/ml).

Příprava suspenze bohaté na trombocyty

Trombocyty z aferézy (KPL invest s.r.o., Jindřichův Hradec, CZ) byly centrifugovány 15 min při 2200x g. Peleta trombocytů byla resuspendována v promývacím pufru (pH 6,5; 0,113M NaCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 4,3mM K₂HPO₄, 24,4mM NaH₂PO₄, 5,5mM glukóza) a znovu centrifugována 15 min při 2200x g. Peleta trombocytů byla znovu resuspendována v promývacím pufru a centrifugována 7 min při 120x g pro odstranění zbylých erytrocytů. Následně byly trombocyty promyty v promývacím pufru a znovu centrifugovány 15 min při 2200x g. Nakonec byla peleta trombocytů resuspendována v resuspendačním pufru (pH 6,5; 0,109M NaCl, 16mM Na₂HPO₄, 4,3mM K₂HPO₄, 8,3mM NaH₂PO₄, 5,5mM glukóza) a naředěna do potřebné koncentrace.

Příprava injikovatelného hydrogelu

Kompozitní hydrogel byl připraven smícháním fibrinové a trombinové složky. Fibrinová složka obsahovala fibrinogen (fibrinogen 70–110 mg/ml, aprotinin 3000 KIU/ml; Tissucol® Kit, Baxter, AT) a 45 μ l kolagenu I (Type I acid soluble collagen from calf hides, 5 mg/ml, Symathese, FR). Trombinová složka obsahovala trombin (4 IU/ml) v roztoku CaCl₂ (40 μ mol/ml, Tissucol® Kit, Baxter, AT), suspenzi MSC (2 ml), 73 μ l hyaluronanu (10 mg/ml; Hyalgan, Fidia CH), 1x10⁹ trombocytů (TRS) a/nebo 25 mg prázdných mikročastic (MP-) nebo částic obsahujících dexametazon a kyselinu askorbovou (MP+). Bylo připraveno 5 různých nosičů, které jsou uvedeny v přehledu v tabulce 1.

Degradace nosiče

Degradace nosiče byla měřena jako hmotnostní úbytek. Vzorky byly zváženy ihned po jejich přípravě, dále pak po 7 a 14 dnech kultivace v CO₂ inkubátoru, ve sterilních podmínkách. Z naměřených hodnot byl spočítán procentuální hmotnostní úbytek mezi 1. a 7., a 7. a 14. dnem.

Buněčná životaschopnost

Pro zjištění buněčné životaschopnosti bylo použito barvení živých a mrtvých buněk (BCECF-AM a propidium jodid) a jejich vizualizace pomocí konfokálního mikroskopu. Pro obarvení živých buněk byl použit 2',7'-bis(2carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceinacetoxymethyl ester (BCECF-AM, naředěný 1:100 v médiu), který byl přidán ke vzorku a inkubován po dobu 45 min při 37 °C a 5% CO₂. Následně byly vzorky opláchnuty PBS (pH 7,4) a byl přidán propidium jodid (5 μ g/ml v PBS pH 7,4) na 10 min. Vzorky byly znovu opláchnuty PBS

(pH 7,4) a vizualizovány pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO. Ze získaných obrázků byly zjištěny počty živých a mrtvých buněk (pomocí Ellipse software) a byl vypočítán jejich poměr.

Buněčná proliferace

Buněčná proliferace byla měřena pomocí PicoGreen kitu (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) a to 1., 7. a 14. den. K získání buněčné DNA bylo nejprve k vzorkům přidáno 250 μ l lyzačního pufru (0,2% v/v Triton X-100, 10mM Tris (pH 7,0), a 1mM EDTA). Buňky byly rozbity 3 zmrazovacími cykly, kdy byl vzorek nejprve zmrazen na -70 °C a následně ponechán roztát při pokojové teplotě. Mezi jednotlivými cykly byly vzorky pečlivě protřepány pomocí vortexu. Připravené vzorky byly skladovány až do dalšího použití při -70 °C. K určení množství buněk na nosičích byla nejdříve vytvořena kalibrační křivka pomocí vzorků se známým množstvím buněk (1x10²–1x10⁶ buněk). Vzorky DNA (100 μ l) byly smíchány s PicoGreen reagentií a byla změřena intenzita fluorescence pomocí fluorescenčního readeru (Synergy HT, λ_{ex} = 480–500 nm, λ_{em} = 520–540 nm). Vzorky byly měřeny v tripletu.

VÝSLEDKY

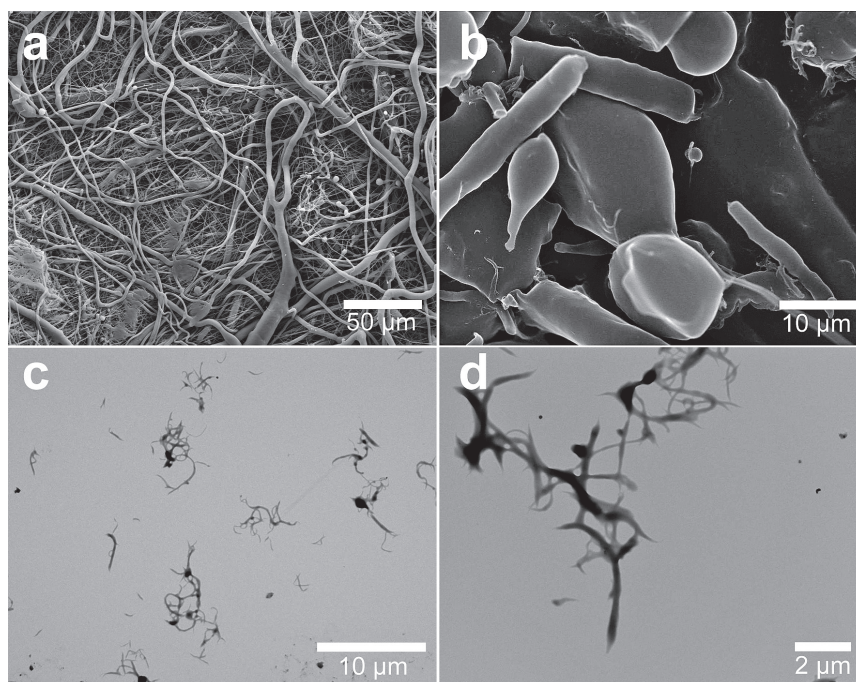
Vývoj mikročastic pro zvýšení stability kompozitního gelu na bázi fibrinu

Nanovlákná z 12% PCL byla připravena pomocí bezjehlového elektrostatického zvláknování na zařízení Nanospider™. Přítomnost nanovláken, jejich morfologie a průměr, byly vizualizovány pomocí SEM. Výsledky ukázaly, že se vrstva skládala z nano- a mikrovláken (obr. 1a). Kromě vláken byly ve vrstvě přítomny i artefakty kulovitěho tvaru.

Injikovatelné částice byly získány mokřím kryogením mletím v 10% roztoku Pluronicu F68, jak bylo popsáno již dříve v publikaci Knotek a kol. (13). SEM analýza namletých nanovláken ukázala částice heterogenní velikosti a tvaru (obr. 1b). Agregované částice vláknité morfologie byly vizualizovány za pomoci TEM mikroskopie. Byla však zřejmá i přítomnost jednotlivých vláken (obr. 1c, d).

Takto připravené částice byly použity pro vývoj a optimalizaci našeho systému pro dodávání léčiv. PCL nanovlákná byla obohacena o kyselinu askorbovou a dexametazon, aby byl demonstrován potenciál pro dodávání léčiv připraveného systému. Vlákná obohacená o léčiva byla namleta stejným způsobem jako kontrolní vzorek (bez bioaktivních molekul). Mikročástice byly přidány do kompozitního gelu na bázi fibrinu.

Bylo připraveno 5 rozdílných vzorků kompozitního hydrogelu na bázi kolagenu a fibrinu. Jmenovitě se jednalo o hydrogel obohacený pouze o TRS, kombinaci hydrogelu s mikročásticemi obohacenými o kyselinu askorbovou a dexametazon, s prázdnými mikročásticemi a s mikročásticemi obohacenými i TRS. Čistý gel bez jakékoli další funkcionalizace byl použit jako kontrolní vzorek. Všechny vzorky obsahovaly stejné množství MSC. Byly provedeny degradační studie nosičů bez buněk, aby bylo



Obr. 1. Morfologie nanovláken a mikročástic. (a) Morfologie PCL nanovláken vizualizovaná pomocí SEM, (b) morfologie namletých mikročástic vizualizovaných pomocí SEM, (c, d) morfologie namletých částic pomocí TEM.

možné potvrdit naši hypotézu, že přítomnost mikročástic způsobuje vyšší stabilitu kompozitních gelů. Po prvním týdnu (den 1 – den 7) byla pozorována podobná degradační rychlost ve všech vzorcích (tabulka 2). Zajímavé je, že po druhém týdnu (den 1 – den 14) byla pozorována výrazně nižší degradace ve vzorcích, které obsahovaly mikročástice. Tyto výsledky potvrdily naši hypotézu, že mikročástice mají pozitivní efekt na stabilitu gelu.

Mikročástice v kompozitním hydrogelu na bázi fibrinu jako systém pro dodávání léčiv

Proliferace a životaschopnost MSC byla stanovena pomocí PicoGreen kitu a barvením živých a mrtvých buněk.

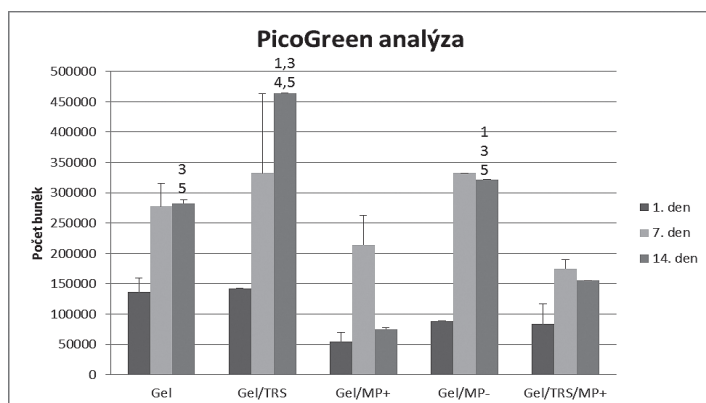
Buňky byly vizualizovány konfokální mikroskopií. Bylo prokázáno, že byly buňky životaschopné během celých 14 dní experimentu na všech nosičích (obr. 2). Výsledky PicoGreen analýzy ukázaly homogenní osazení buňkami 1. den experimentu, mezi skupinami nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly. 7. den počet buněk ve všech vzorcích vzrostl a mezi jednotlivými vzorky stále nebyly signifikantní rozdíly. 14. den experimentu vykazovaly vzorky, které neobsahovaly mikročástice, vyšší počet MSC v porovnání s ostatními vzorky. Nejnižší proliferace byla na nosičích s obohacenými mikročásticemi (Gel/MP⁺). Ani přidání TRS nezlepšilo buněčnou proliferaci (Gel/TRS/MP⁺). Takové výsledky naznačují nízkou prolifera-

Tab. 1. Přehled připravených hydrogelových nosičů, počítáno na 1 ml nosiče

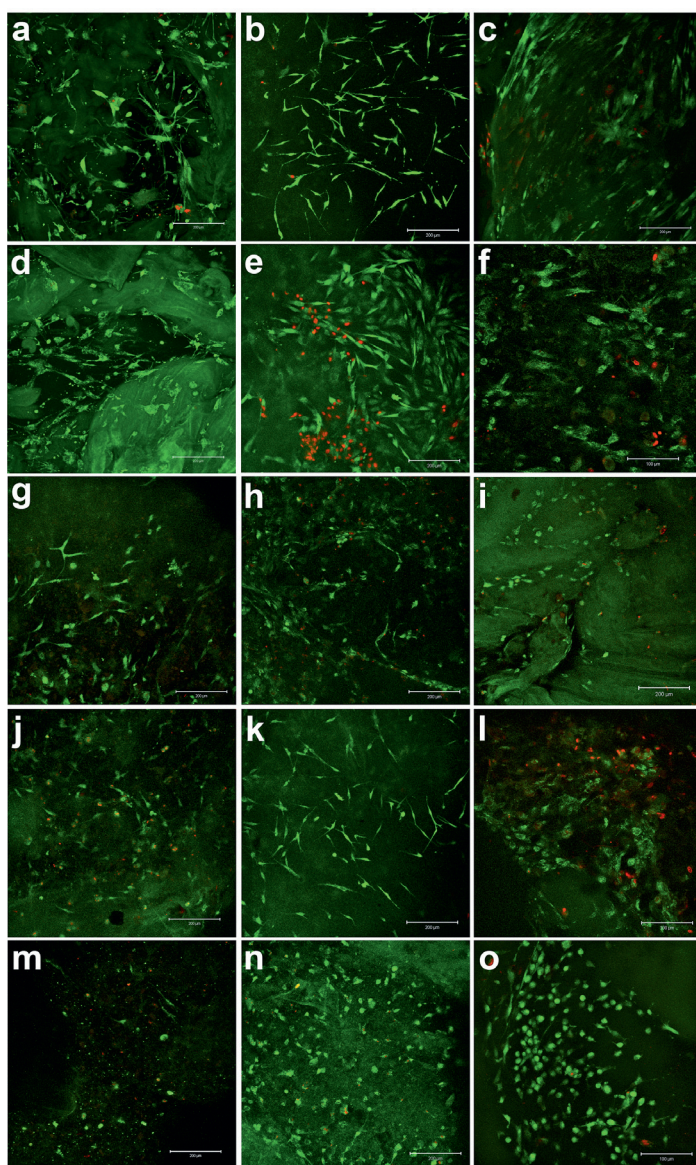
Nosič	Fibrinová složka		Trombinová složka				
	Fibrinogen (µl)	Kolagen I (µl)	MSC	HA (µl)	TRS	MP ⁻ /MP ⁺ (mg)	Trombin (µl)
Gel	450	45	2×10^6	73	---	---	225
Gel/MP ⁻	450	45	2×10^6	73	---	25 mg MP ⁻	225
Gel/MP ⁺	450	45	2×10^6	73	---	25 mg MP ⁺	225
Gel/TRS	450	45	2×10^6	73	1×10^9	---	225
Gel/TRS/MP ⁺	450	45	2×10^6	73	1×10^9	25 mg MP ⁺	225

Tab. 2. Procentuální úbytek hmotnosti nosičů. Tabulka ukazuje hmotnostní úbytek nosičů během prvního týdne kultivace jako rozdíl mezi 1. a 7. dnem a úbytek během celých 14 dní kultivace jako rozdíl mezi 1. a 14. dnem

	den 1 – den 7 (%)	den 1 – den 14 (%)
Gel	$44,4 \pm 8,3$	$91,9 \pm 3,7$
Gel/TRS	$46,2 \pm 4,6$	$91,8 \pm 3,3$
Gel/MP ⁺	$37,6 \pm 11,2$	$71,1 \pm 1,9$
Gel/MP ⁻	$51,4 \pm 10,7$	$75,5 \pm 4,1$
Gel/TRS/MP ⁺	$42,3 \pm 2,3$	$84,4 \pm 3,8$



Obr. 2. Výsledky měření PicoGreen. Graf znázorňuje množství DNA ve vzorcích během 14 dní kultivace.



Obr. 3. Barvení živých a mrtvých buněk vizualizované pomocí konfokální mikroskopie. Živé buňky jsou obarveny pomocí BCECF (zelený signál) a mrtvé buňky pomocí propidium jodidu (červený signál). Gelové nosiče 1. (a), 7. (b) a 14. den (c). Gel/TRS nosič 1. (d), 7. (e) a 14. den (f). Gel/MP+ nosič 1. (g), 7. (h) a 14. den (i). Gel/MP- nosič 1. (j), 7. (k) a 14. den (l). Gel/TRS/MP+ nosič 1. (m), 7. (n) a 14. den (o).

ci MSC ve vzorcích s mikročásticemi. Na druhou stranu, prázdné mikročástice (Gel/MP⁻) v porovnání s kontrolou (Gel) růst buněk neovlivnily.

Data získaná konfokální mikroskopií korelovala s daty z PicoGreen analýzy. Barvení zobrazilo živé buňky (obr. 3) označené BCECF (zelený signál), mrtvé buňky byly obarveny propidium jodidem (červený signál). První den byla detekována homogenní distribuce buněk ve vzorku. Buňky byly rozprostřené s mnoha výběžky. Podobně vypadaly i 7. den. Počet buněk byl vyšší (a byly přítomny i četné mrtvé buňky) zejména ve skupině Gel/TRS. Významné rozdíly mezi skupinami byly 14. den. Počet MSC byl vyšší ve skupinách Gel, Gel/TRS a Gel/TRS/MP⁻ v porovnání se skupinami s mikročásticemi. Toto pozorování bylo v souladu s našimi výsledky PicoGreen analýzy. Bylo však pozorováno velké množství mrtvých buněk, což naznačovalo ne úplně optimální podmínky pro růst MSC na nosičích. Oproti tomu ve vzorcích Gel/MP⁺ a Gel/TRS/MP⁺ byl počet MSC nižší, ale bylo pozorováno významně méně mrtvých buněk. Navíc se v Gel/MP⁺ a Gel/TRS/MP⁺ vzorcích změnila morfologie buněk v kulaté buňky s minimálním počtem výběžků. Taková morfologie je spojována s chondrogenní diferenciací buněk.

DISKUSE

Mikročástice zlepšují stabilitu a biomechanické vlastnosti hydrogelů na bázi fibrinu

Nosiče připravené elektrostatickým zvlákňováním jsou charakteristické vysokou porozitou, velkým poměrem povrchu a objemu a velikostí vláken v rozmezí od stovek nanometrů po několik mikrometrů. Takové vlastnosti napodobují strukturu extracelulární matrix. Jejich potenciál v tkáňovém inženýrství byl díky příznivé buněčné adhezi potvrzen mnohými studiemi (23). Struktura nanovlákných vrstev významně bránila jejich injekčnímu využití. Možnosti jejich aplikace byly navíc dále omezeny těžkostmi při uchovávání viskoelastických vlastností. V nedávné době jsme ukázali, že kryogenní mletí je metoda vhodná pro přípravu mikročástic z nanovláken připravených elektrostatickým zvlákňováním (13). Zjistili jsme, že proces mletí je ovlivňován mnohými parametry – například složením mlecího média nebo časem mletí. Optimalizace tohoto procesu odhalila možnost výroby heterogenních částic, které by mohly být využity při kultivaci buněk. Využití nového systému v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně může být výrazně zvýšeno a usnadněno zkombinováním systému s kompozitním nosičem. Takový nosič (založený na pění, gelu nebo jiném podobném systému) by zvýraznil své klady. Nedostatky nanovláken (křehkost, 2D struktura) mohou být jednoduše vyřešeny kompozitním systémem. Ve vhodném kompozitním materiálu, který dovolí

dostatečnou difuzi buněk, živin a odpadu, navíc výhody nanovláken zůstanou zachovány. Takovým kompozitním materiálem hydrogely rozhodně jsou. Testovali jsme tedy hydrogel na bázi fibrinu. Tento systém již ukázal, že vytváří vhodné prostředí pro proliferaci mezenchymálních buněk i pro jejich diferenciaci v chondrocyty. Hydrogely na bázi fibrinu navíc podporují osteochondrální regeneraci (5, 7). Biomechanické vlastnosti a stabilita hydrogelů však patří mezi jejich pár nedostatků, které jsou výrazné především v aplikacích v oblasti tvrdých tkání. Cílem této studie bylo připravit optimální injikovatelnou frakci PCL nanovláknenného a stanovit účinek mikročástic na stabilitu hydrogelu. Jasně jsme prokázali, že PCL mikročástice modulují stabilitu hydrogelu na bázi fibrinu a významně prodlužují čas potřebný k jeho rozpadu. Biomechanické vlastnosti hydrogelů tedy mohou být zlepšeny a modulovány adekvátní koncentrací mikročástic.

Takové zjištění má významné důsledky pro artroskopické aplikace, především pro implantáty bez buněk. Neosazený hydrogel ukázal, že má schopnost zlepšit regeneraci defektů chrupavky, a přítomnost chondrocytů v hydrogelu přispěla k tvorbě hyalinní chrupavky a lepší regeneraci (5). Na druhé straně překročení kritického počtu nasazených buněk může snížit efektivitu nosiče (26). Náš nový kompozitní hydrogel může být lehce aplikován a být pevně přichycen k lézi. Lze předpokládat i zkrácení doby potřebné k regeneraci tkáně vzhledem k lepším viskoelastickým vlastnostem kompozitního hydrogelu. Hydrogel obohacený o nanovlákná tedy jasně zlepšuje biomechanické parametry a lépe napodobuje přirozenou strukturu extracelulární matrix.

Mikročástice v hydrogelu na bázi fibrinu mohou sloužit jako efektivní systém dodávání léčiv

Nový kompozitní hydrogel může sloužit jako systém, který uvolňuje uzavřené bioaktivní látky díky významně prodlouženému rozpadu hydrogelu. Testování této skutečnosti bylo dalším cílem studie. Je známo, že nanovlákná mohou být využita jako nosiče pro širokou škálu bioaktivních molekul, včetně léčiv, vitamínů, proteinů a nukleových kyselin (29). Bylo zjištěno, že mikročástice připravené z PCL nanovláken, mohou sloužit jako systém pro dodávání léčiv při osteochondrální regeneraci. Prokázali jsme, že s rozpadem kompozitního hydrogelu se uvolňují chondrogeně aktivní vitamin (kyselina askorbová) a dexamethazon, které sloužily jako model léčiva. Prokázali jsme také, že trombocyty jsou přirozené zdroje proliferačních a diferenciacních faktorů – proliferace buněk a jejich životaschopnost byly zlepšeny ve vzorcích obsahujících trombocyty, nikoli prázdnými PCL mikročásticemi. Je překvapující, že kombinací mikročástic a trombocytů nebyly dosaženy lepší výsledky v porovnání s kontrolou. Předpokládáme, že tento výsledek souvisí s diferenciací kmenových buněk. Mohlo by to zpomalit celý proces buněčné proliferace. I přes jasný průkaz uvolňování léčiv a vhodnosti nového kompozitního nosiče pro dodávání léčiv je nutné směs uzavřenou do mikročástic optimalizovat a dále zkoumat.

ZÁVĚR

Přítomnost mikročástic v hydrogelu na bázi fibrinu, hyaluronové kyseliny a kolagenu typu I modifikovala biomechanické parametry kompozitního hydrogelu a prodloužila degradaci nosiče. Tyto částice navíc mohou sloužit jako systém pro dodávání látek vhodných pro stimulaci proliferace a diferenciac buněk. Obohacení hydrogelu o trombocyty zlepšilo proliferaci a životaschopnost mezenchymálních buněk. Pro úpravu dávky léčiva a jeho uvolňovací charakteristiky jsou nutné další experimenty.

Reference

1. AKEDA, K., AN, H. S., OKUMA, M., ATTAWIA, M., MIYAMOTO, K., THONAR, E. J., LENZ, M. E., SAH, R. L., MASUDA, K.: Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*, 14: 1272–1280, 2006.
2. BEHRAVESH, E., TIMMER, M. D., LEMOINE, J. J., LIEBSCHNER, M. A., MIKOS, A. G.: Evaluation of the in vitro degradation of macroporous hydrogels using gravimetry, confined compression testing, and microcomputed tomography. *Biomacromolecules*, 3: 1263–1270, 2002.
3. BUCKWALTER, J. A., MANKIN, H. J.: Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr. Course Lect.*, 47: 487–504, 1998.
4. CUI, Z., LEE, B. H., PAUKEN, C., VERNON, B. L.: Degradation, cytotoxicity, and biocompatibility of NIPAAm-based thermosensitive, injectable, and bioresorbable polymer hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 98: 159–166, 2011.
5. FILOVA, E., JELINEK, F., HANDL, M., LYTVYNETS, A., RAMPICHOVA, M., VARGA, F., CINATL, J., SOUKUP, T., TRC, T., AMLER, E.: Novel composite hyaluronan/type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 87: 415–424, 2008.
6. FILOVA, E., RAMPICHOVA, M., HANDL, M., LYTVYNETS, A., HALOUZKA, R., USVALD, D., HLUCILOVA, J., PROCHAZKA, R., DEZORTOVA, M., ROLENCOVA, E., KOSTAKOVA, E., TRC, T., STASTNY, E., KOLACNA, L., HAJEK, M., MOTLIK, J., AMLER, E.: Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol. Res.*, 56 (Suppl 1): S5–S16, 2007.
7. FORTIER, L. A., MOHAMMED, H. O., LUST, G., NIXON, A. J.: Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J. Bone Jt Surg.*, 84-B: 276–288, 2002.
8. HALEEM, A. M., SINGERGY, A. A., SABRY, D., ATTA, H. M., RASHED, L. A., CHU, C. R., EL SHEWY, M. T., AZZAM, A., ABDEL AZIZ, M. T.: The clinical use of human culture-expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich Fibrin Glue in the treatment of articular cartilage defects: A pilot study and preliminary results. *Cartilage*, 1: 253–261, 2010.
9. HANGODY, L., FULES, P.: Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J. Bone Jt Surg.*, 85-A (Suppl 2): 25–32, 2003.
10. JAKUBOVA, R., MICKOVA, A., BUZGO, M., RAMPICHOVA, M., PROSECKA, E., TVRDIK, D., AMLER, E.: Immobilization of thrombocytes on PCL nanofibres enhances chondrocyte proliferation in vitro. *Cell. Prolif.*, 44: 183–191, 2011.
11. KAPS, C., BRAMLAGE, C., SMOLIAN, H., HAISCH, A., UNGETHUM, U., BURMESTER, G. R., SITTINGER, M., GROSS, G., HAUPL, T.: Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum.*, 46: 149–162, 2002.

12. KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J., KLUTER, H., BIEBACK, K.: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24: 1294–1301, 2006.
13. KNOTEK, P., POUZAR, M., BUZGO, M., KRIZKOVA, B., VLCEK, M., MICKOVA, A., PLENCNER, M., NAVESNIK, J., AMLER, E., BELINA, P.: Cryogenic grinding of electrospun poly-ε-caprolactone mesh submerged in liquid media. *Mater. Sci. Eng. C*, 32: 1366–1374, 2012.
14. LIANG, D., HSIAO, B. S., CHU, B.: Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59: 1392–1412, 2007.
15. LIANG, D., HSIAO, B. S., CHU, B.: Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59: 1392–1412, 2007.
16. LOUWERSE, R. T., HEYLIGERS, I. C., KLEIN-NULEND, J., SUGIHARA, S., VAN KAMPEN, G. P., SEMEINS, C. M., GOEI, S. W., DE KONING, M. H., WUISMAN, P. I., BURGER, E. H.: Use of recombinant human osteogenic protein-1 for the repair of subchondral defects in articular cartilage in goats. *J. Biomed. Mater. Res.*, 49: 506–516, 2000.
17. LUKAS, D., SARKAR, A., POKORNY, P.: Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach. *Journal of Applied Physics*, 103: 084309, 2008.
18. MILANO, G., SANNA PASSINO, E., DERIU, L., CAREDDU, G., MANUNTA, L., MANUNTA, A., SACCOMANNO, M. F., FABBRICIANI, C.: The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis. Cartil.*, 18: 971–980, 2010.
19. NA, K., KIM, S., WOO, D. G., SUN, B. K., YANG, H. N., CHUNG, H. M., PARK, K. H.: Synergistic effect of TGFβ-3 on chondrogenic differentiation of rabbit chondrocytes in thermo-reversible hydrogel constructs blended with hyaluronic acid by in vivo test. *J. Biotechnol.*, 128: 412–422, 2007.
20. NOH, H. K., LEE, S. W., KIM, J. M., OH, J. E., KIM, K. H., CHUNG, C. P., CHOI, S. C., PARK, W. H., MIN, B. M.: Electrospinning of chitin nanofibers: degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials*, 27: 3934–3944, 2006.
21. PARK, J. C., KIM, J. M., JUNG, I. H., KIM, J. C., CHOI, S. H., CHO, K. S., KIM, C. S.: Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J. Clin. Periodontol.*, 38: 721–731, 2011.
22. PARK, W. H., MIN, B. M., LEE, G., KIM, S. H., NAM, Y. S., LEE, T. S.: Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 25: 1289–1297, 2004.
23. PHAM, Q. P., SHARMA, U., MIKOS, A. G.: Electrospun poly(ε-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*, 7: 2796–2805, 2006.
24. PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S., MARSHAK, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143–147, 1999.
25. PROSECKA, E., BUZGO, M., RAMPICHOVA, M., KOCOUREK, T., KOCHOVA, P., VYSLOUZILOVA, L., TVRDIK, D., JELINEK, M., LUKAS, D., AMLER, E.: Thin-layer hydroxyapatite deposition on a nanofiber surface stimulates mesenchymal stem cell proliferation and their differentiation into osteoblasts. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012: 428503, 2012.
26. PROSECKA, E., RAMPICHOVA, M., VOJTOVA, L., TVRDIK, D., MELCAKOVA, S., JUHASOVA, J., PLENCNER, M., JAKUBOVA, R., JANCAR, J., NECAS, A., KOCHOVA, P., KLEPACEK, J., TONAR, Z., AMLER, E.: Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 99: 307–315, 2011.
27. RAMPICHOVA, M., FILOVA, E., VARGA, F., LYTVYNETS, A., PROSECKA, E., KOLACNA, L., MOTLIK, J., NECAS, A., VAJNER, L., UHLIK, J., AMLER, E.: Fibrin/hyaluronic acid composite hydrogels as appropriate scaffolds for in vivo artificial cartilage implantation. *ASAIO J.*, 56: 563–568, 2010.
28. RHO, K. S., JEONG, L., LEE, G., SEO, B. M., PARK, Y. J., HONG, S. D., ROH, S., CHO, J. J., PARK, W. H., MIN, B. M.: Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*, 27: 1452–1461, 2006.
29. SILL, T. J., VON RECUM, H. A.: Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29: 1989–2006, 2008.
30. SUSAN, L., et al.: Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomedical Materials*, 1: R45, 2006.

Korespondenční autor:

Mgr. Barbora Křížková
Katedra biologických a biochemických věd
Univerzita Pardubice,
Studentská 573
530 12 Pardubice
E-mail: bara.krizkova@yahoo.com