

## Roční zpráva o řešení projektu v programu TIP v roce 2012

**Ev. č. projektu:** FR-TI3/808

**Název projektu:** „Medicína v pohybu“

**Nositel projektu:** Národní tkáňové centrum a.s.

**Spolupříjemce:** Univerzita Palackého v Olomouci  
CB Bio s.r.o.

**Kontaktní-osoba:** Ing. Jakub Schůrek,  
email: jakub.schurek@natic.cz,  
Tel: 774 531 952

**Řešitelé projektu:** Ing. Jakub Schůrek, Doc. RNDr. Jan Hlaváč,  
Doc. Ing. Lukáš Jebavý, CSc.

**Termín ukončení projektu:** 12/2012

Dle bodu 7. článku VII. Podmínek pro použití účelových finančních prostředků ze státního rozpočtu na podporu projektů programu výzkumu a vývoje (Smlouva č. FR-TI3/808) předkládáme roční zprávu o řešení projektu v roce 2012, k 31.12. 2012.

### 1. Plnění cílů a etap v roce 2012

Pokračuje se v uvedených plánovaných pracích (dle náplně věcného řešení projektu) viz následující tabulka Tabulka č. 1.

**Tabulka č. 1: Věcná náplň řešení projektu pro rok 2012**

Etapa	Činnost	Orientační termín ukončení	Plnění
4	Vývoj a testování vhodnosti a kompatibility nosiče buněk	05/2012	05/2012
5	Hodnocení výsledků výzkumu a testování	05/2012	06/2012
6	Dokončení vývoje a výroba prototypů	07/2012	07/2012
7	Srovnání jednotlivých typů implantátů	09/2012	
8	Produkce experimentálních šarží implantátů	12/2012	

### 2. Seznam dílčích výzkumných zpráv vypracovaných k dané problematice v průběhu roku 2012:

Uveďte vždy autora, název zprávy a místo, kde je možno do zprávy nahlédnout.

### 3. Použití finančních prostředků (v tis. Kč) v roce 2012 dle smlouvy č. FR-TI3/808 pro ev. č. projektu FR-TI3/808 (v tis. Kč):

**Tabulka č. 2: Použití finančních prostředků k 30.11.2012**

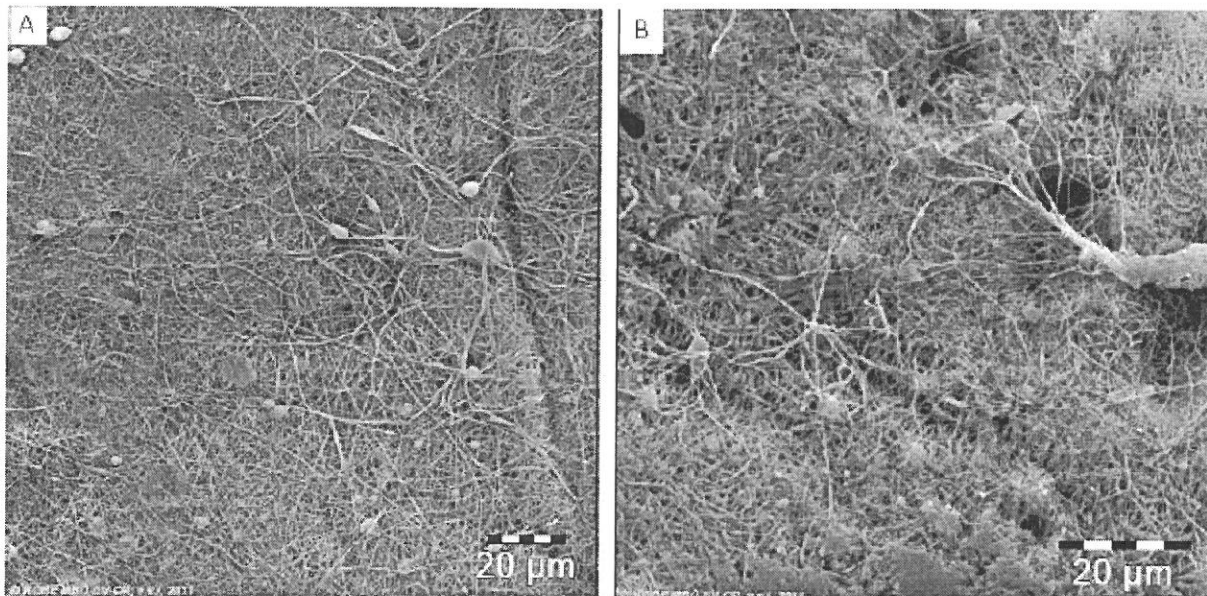
Finanční prostředky	Plánované náklady (v tis. Kč)	Orientační náklady k 30.11.2012 (v tis. Kč)
Výše celk. nákladů v roce 2012	2 350,0	
Neveřejné zdroje financování	764,9	
Z toho investice	0	
Účelová podpora	1 585,1	
Z toho investice	0	

#### 4. Celková charakteristika plnění projektu v roce 2012, přehled změn, které nastaly v běžném roce řešení

##### Příprava PVA-chitosan nanovláken a výsledky buněčných testů

Na základě předešlých výsledků z roku 2011 jsme ověřili, že nosiče z PVA-chitosanu vykazují lepší biokompatibilitu než samotné PVA. V stručnosti.

Nanovláknna byla připravena ze směsi polymeru 12% PVA a 5% chitosanu v poměru 8:2. U těchto vzorků byla zachována vlákenná struktura (Obr. 1).

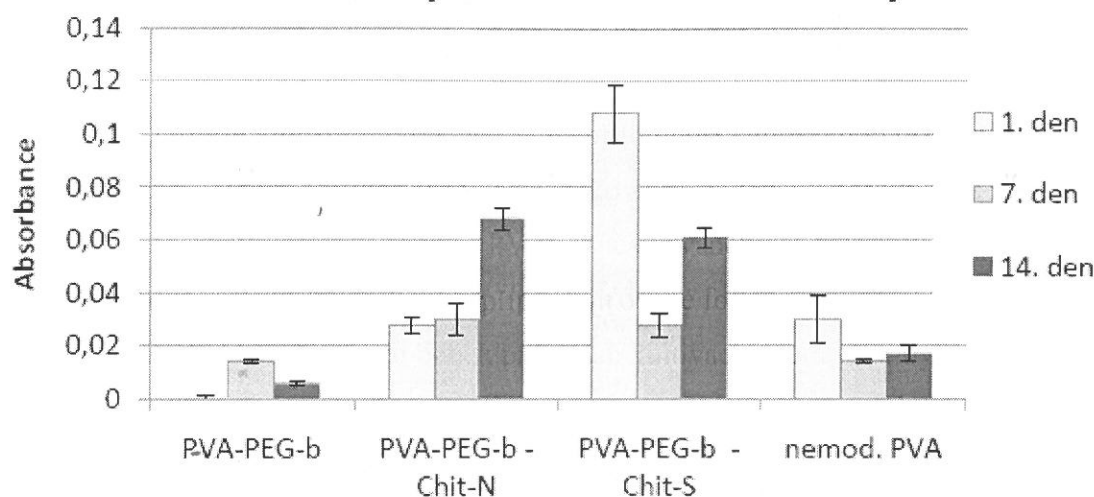


**Obr. 1: Modifikace nanovláken připravených ze směsi polyvinylakoholu a chitosanu. (A) nemodifikovaná vlákna, (B) vlákna modifikovaná linkerem PEG-b trojnásobným provedením reakce (loading 0,62 mmol/g).**

Připraveny byly dvě skupiny vzorků s chitosanem, jedna skupina byla síťována pomocí glyoxalu, druhá skupina byla nesíťovaná. Tato nanovláknna byla následně modifikována pomocí linkeru PEG-b, výsledný loading byl 0,66 mol/g, jednalo se o trojnásobné provedení chemické reakce. Pomocí MTT testu byla u těchto vzorků hodnocena biokompatibilita. Získané hodnoty byly srovnány s hodnotami nemodifikovaného PVA a PVA-PEG-b nosiče bez chitosanu o loadingu 0,38 mmol/g. Test byl proveden u mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a chondrocytů.

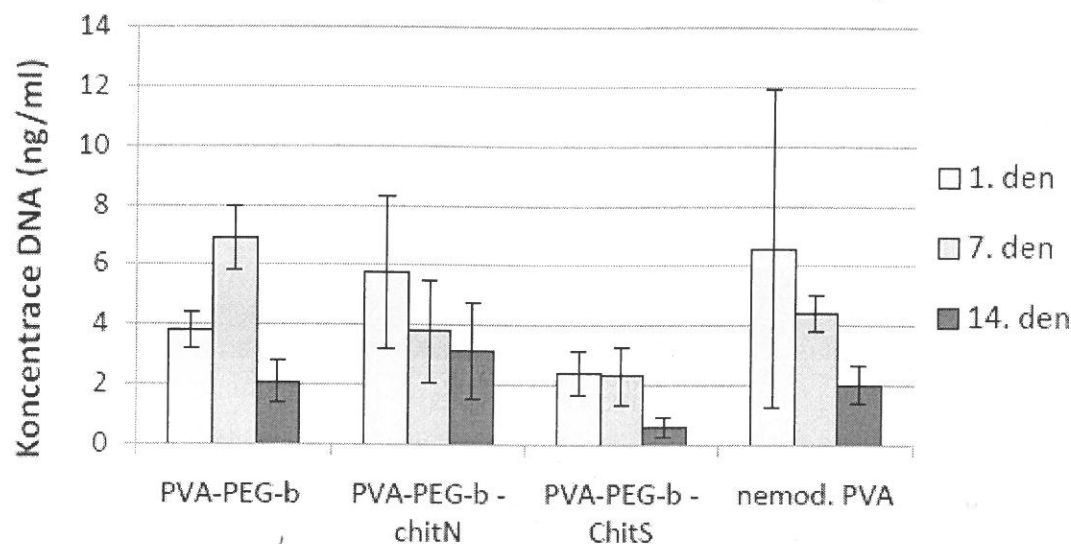
Testy prokázaly, že v případě kultivace MSC přítomnost chitosanu výrazně podpořila viabilitu buněk. Tato modifikace se ukázala jako výrazně lepší v porovnání s PVA-PEG-b bez chitosanu a nemodifikovanou formou PVA. U nesíťovaného chitosanu jsme pak zaznamenali stoupající trend ve viabilitě buněk. V případě síťované formy jsme pozorovali výrazně zvýšenou metabolickou aktivitu buněk první den kultivace, která však byla následována prudkým poklesem (Obr. 2 a 3).

### Modifikace chitosanem - MTT mezenchymální kmenové buňky



Obr. 2: Viabilita MSC na nosičích z PVA, modifikovaného PVA (PVA-PEGb), PVA-chitosanu a modifikovaného PVA-chitosanu (PVA-PEGb-Chit-N).

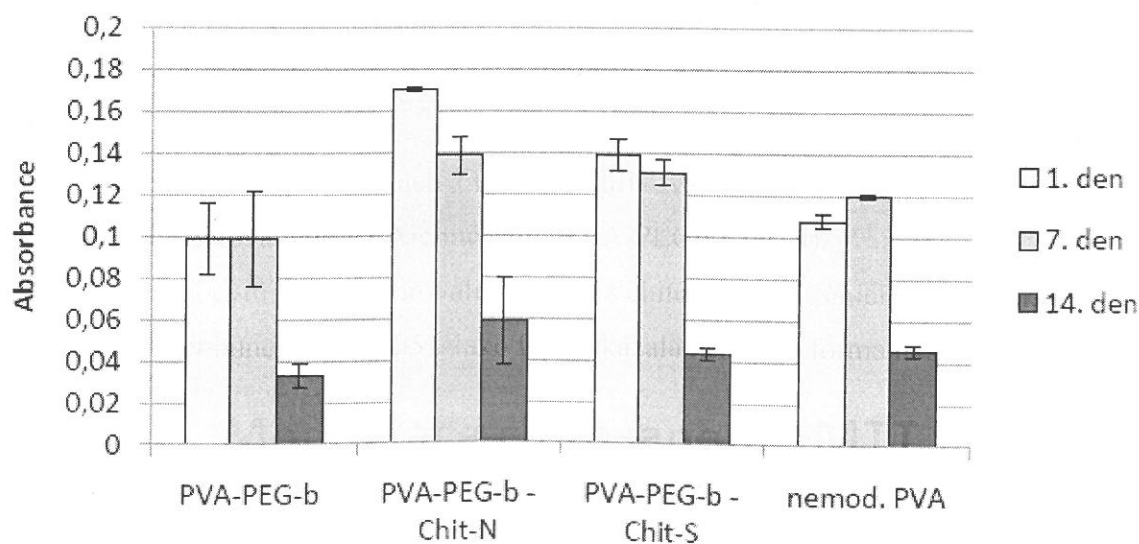
## Modifikace chitosanem - PicoGreen mezenchymální kmenové buňky



Obr. 3: Proliferace MSC na nosičích z PVA, modifikovaného PVA (PVA-PEGb), PVA-chitosanu a modifikovaného PVA-chitosanu (PVA-PEGb-Chit-N).

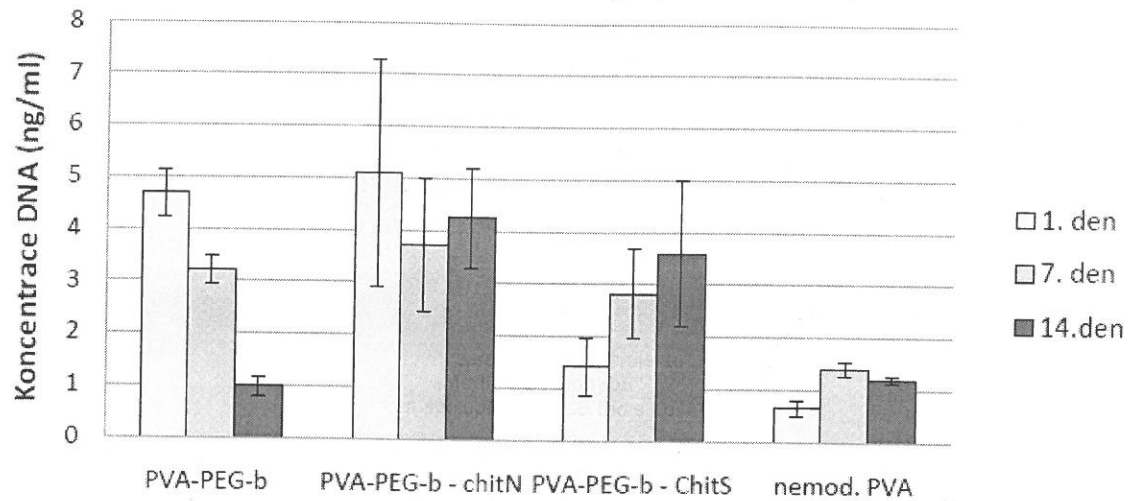
V případě chondrocytů jsme pozorovali u vláken s chitosanem klesající metabolickou aktivitu a narůstající počet buněk (Obr. 4, 5). Jako lepší ukázala nesíťová forma nosiče PVA/chitosan.

## Modifikace chitosanem - MTT chondrocyty



Obr. 4: Viabilita chondrocytů na nosičích z PVA, modifikovaného PVA (PVA-PEGb), PVA-chitosanu a modifikovaného PVA-chitosanu (PVA-PEGb-Chit-N).

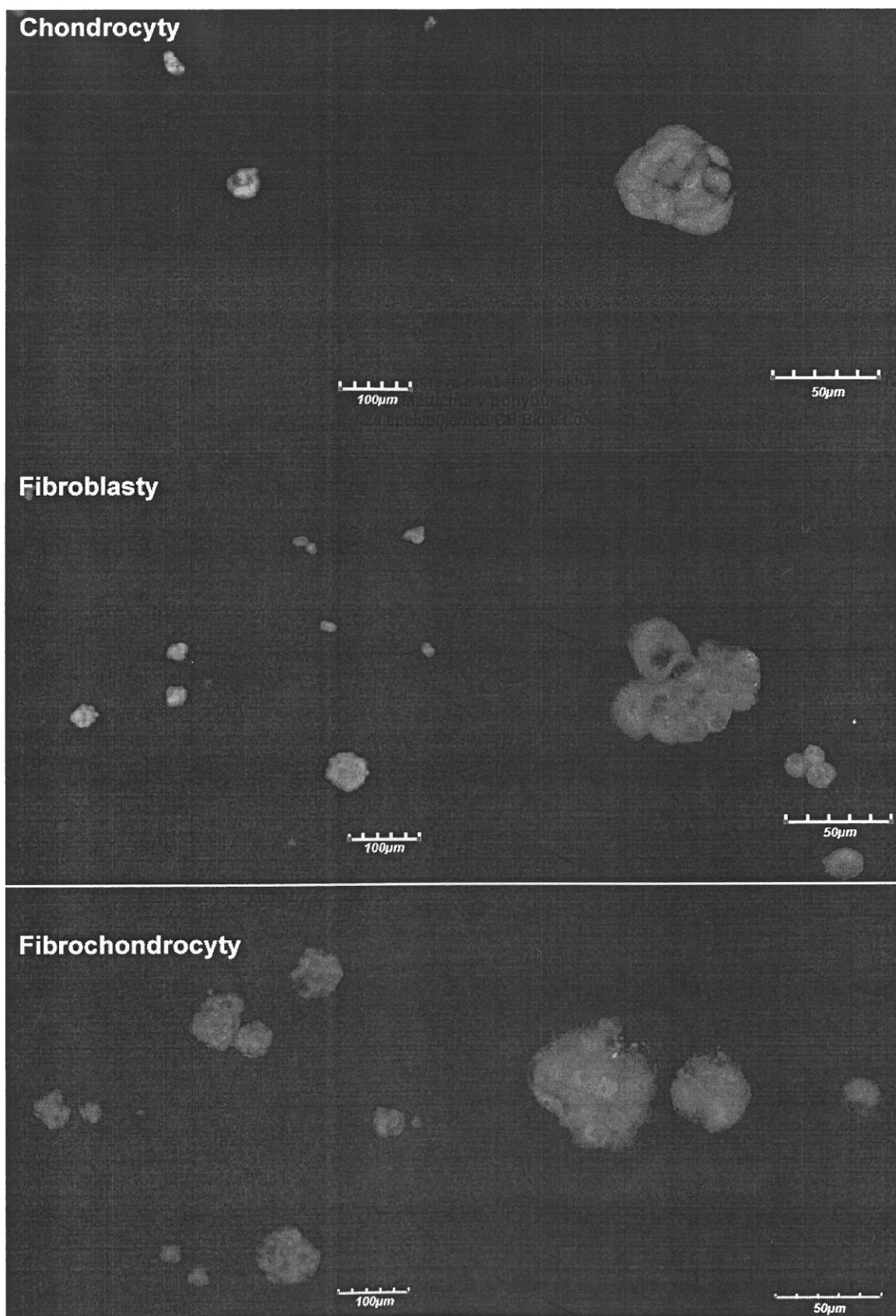
## Modifikace chitosanem - PicoGreen chondrocyty



Obr. 5: Proliferace chondrocytů na nosičích z PVA, modifikovaného PVA (PVA-PEGb), PVA-chitosanu a modifikovaného PVA-chitosanu (PVA-PEGb-Chit-N).

Viabilita buněk nebyla dostatečně vysoká, z tohoto důvodu jsme se rozhodli v roce 2012 testovat další nanovláčenné materiály na bázi chitosanu.

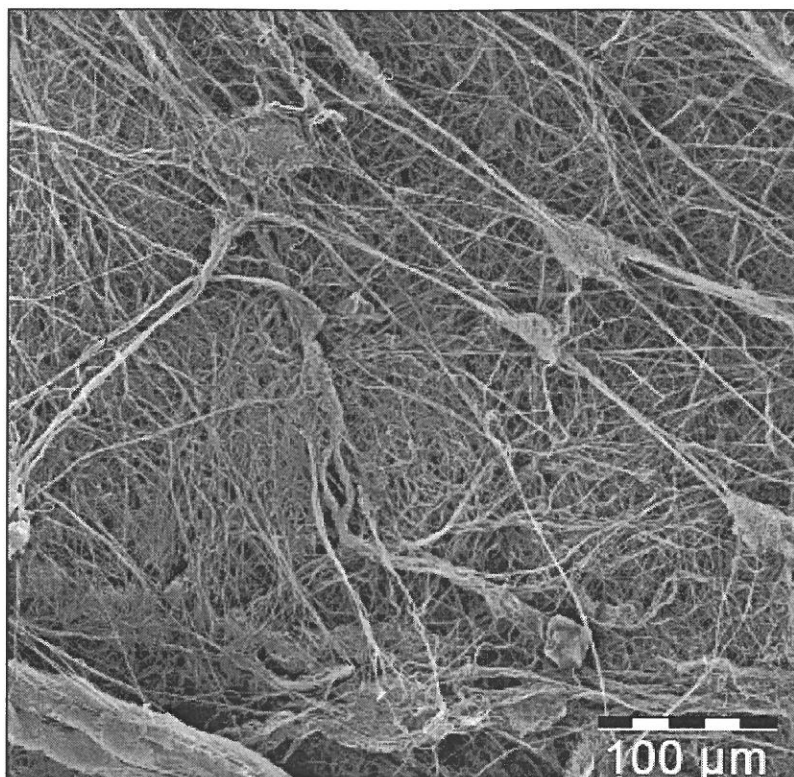
Z důvodu ověření potenciálu pro chondrální regeneraci jsme ověřili kompatibilitu PVA-chitosanu na modelu fibroblastů, chondrocytů a fibrochondrocytů. Buňky vykazovaly po nasazení kulovitou morfologii a byly lokalizovány v malých klastrech. Díky tomu usuzujeme, že adheze buněk na nosič nebyla dostatečná.



Obr.6: Morfologie fibroblastů, chondrocytů a fibrochondrocytů na PVA-chitosanovém nosiči 1 den po nasazení.

### PEO-chitosan

Dalším z chitosanových materiálů testovaných na modelu fibroblastů, chondrocytů a fibrochondrocytů byl PEO-chitosan. Nosič byl připraven hladinovým zvlákněním PVA a chitosanu (poměr 25 PVA:75chitosan v 3% kyselině octové). Nosič byl po zvláknění síťován pomocí genipinu při 60°C po dobu 72 hodin. Snímky ze SEM ukazují na vláknennou morfologii nosiče (Obr. 7).



Obr. 7: Morfologie PEO-chitosanu

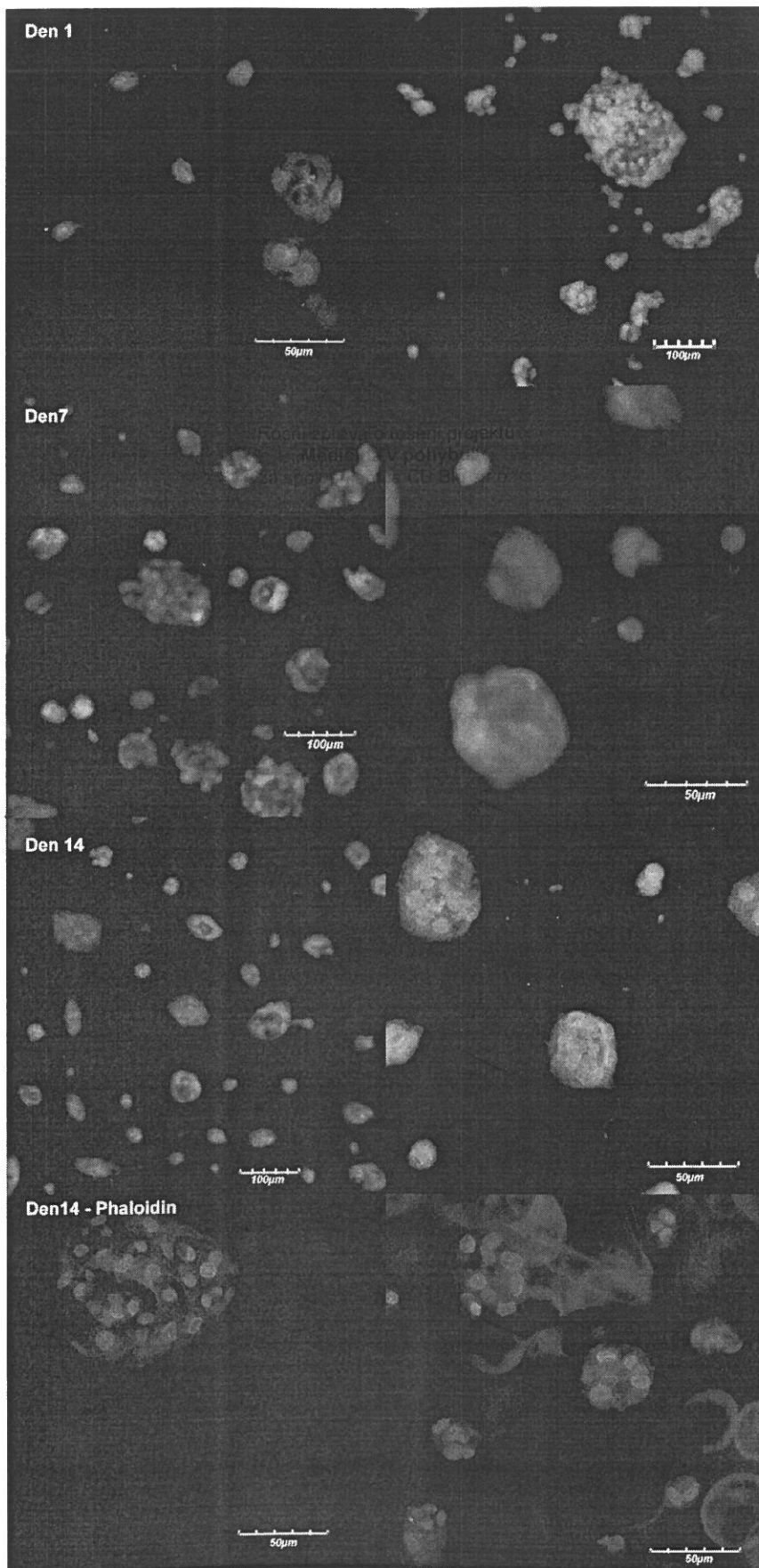
Vizualizace chondrocytů (Obr. 8) pomocí propidium iodidu (barví buněčná jádra) a DiOC6 (barví vnitřní membrány) ukázala dobrou adhezi chondrocytů na nosič první den po nasazení. Buňky byly lokalizovány v kulovitých skupinách, které jsou typické pro chondrocyty. Morfologie buněk se výrazně neměnila, i když počet klastrů na nosičích v 7 a 14 den se zvýšil. Konfokální mikroskopie sledující morfologii aktinového skeletu ukázala kortikální skelet bez stresových vláken.

V případě fibroblastů (Obr. 9) měly buňky první den okrouhlou morfologii a byly sloučeny do kulovitých agregátů. 7 a 14 den však došlo k rozprostření buněk, což indikuje jejich dobrou adhezi na nosič. Výsledky značení aktinového skeletu ukázaly rozprostřené buňky s jádry v centrální oblasti.

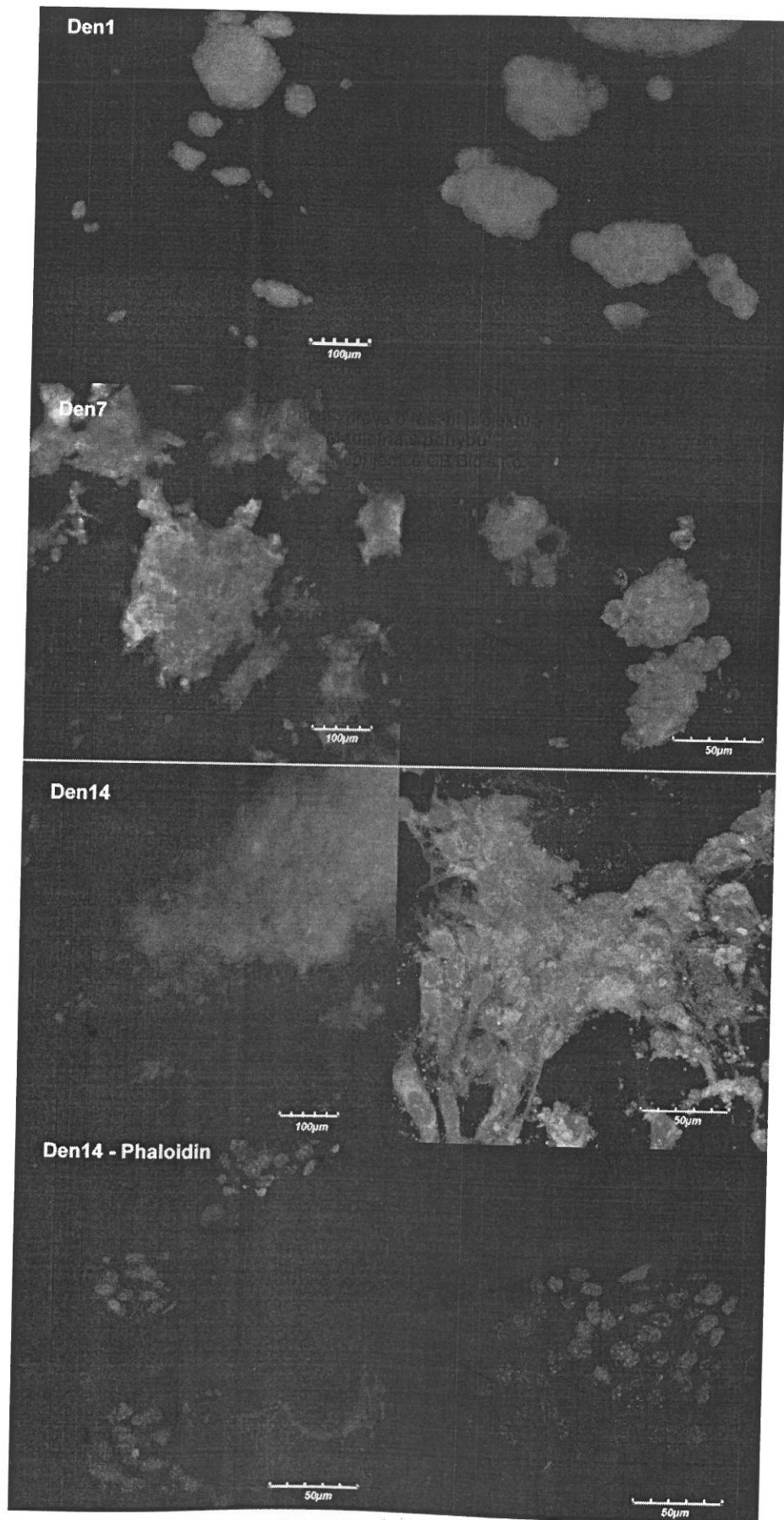


V případě fibrochondrocytů (Obr. 10), byly buňky první den na nosičích lokalizovány do kulovitých agregátů. 7 a 14 den byly lokalizovány spíše do kompaktních provazcových struktur a kulovitých agregátů.

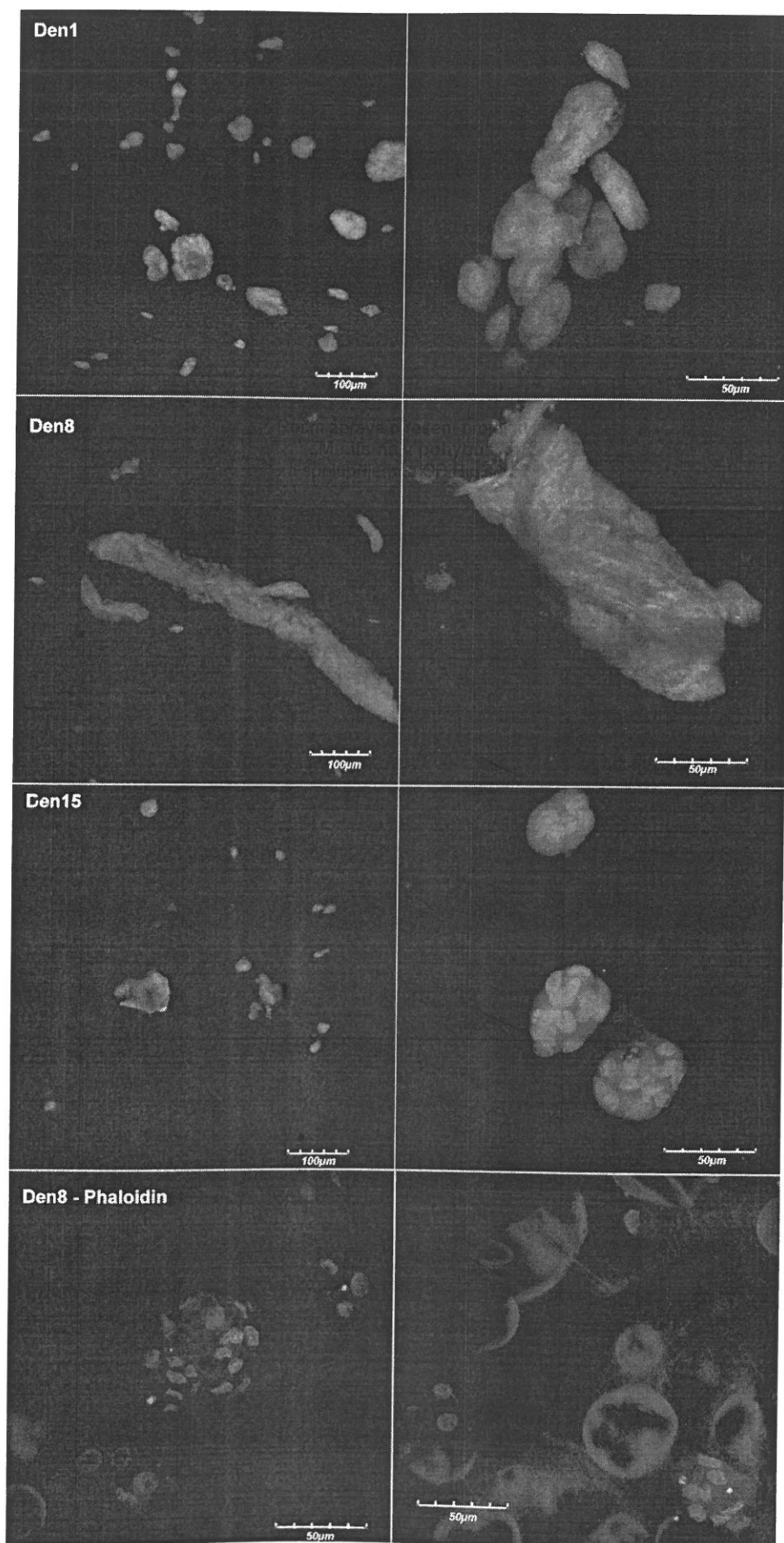
Výsledky konfokální mikroskopie demonstrovaly dobrou adhezi a kompatibilitu u všech testovaných buněčných typů. Buňky ale neosídlovaly celou plochu nosiče.



Obr. 8: Morfologie chondrocytů na nosičích z PEO-chitosanu.



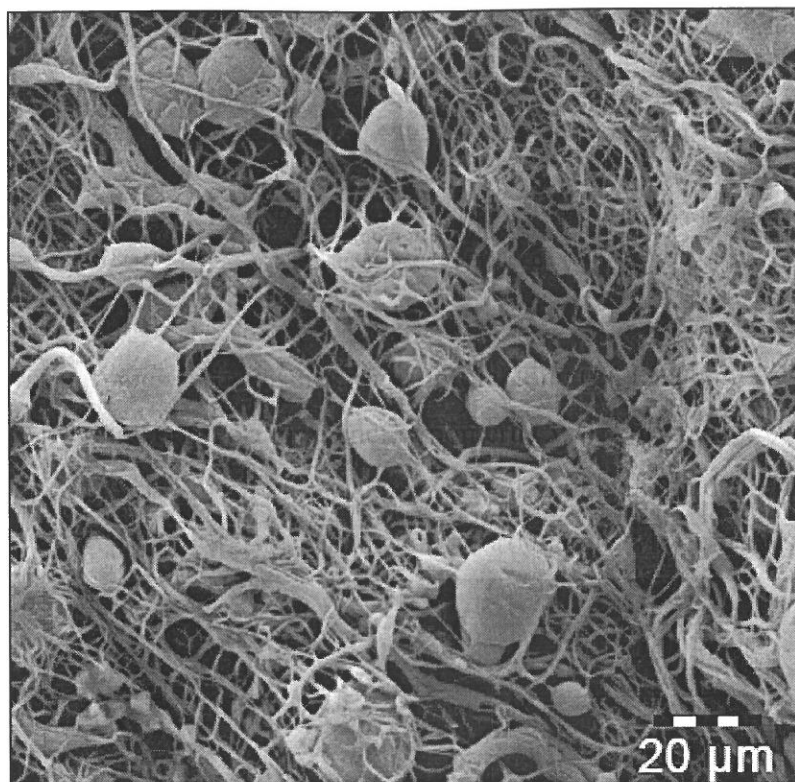
Obr. 9: Fibroblasty na PEO-chitosanu.



Obr. 10: Fibrochondrocyty na PEO-chitosanu.

### PCL-chitosan

Dalším testovaným polymerem byla směs polykaprolaktonu (PCL) a chitosanu. Polymery byly rozpuštěny v kyselině octové a mravenčí, v poměru (3:7). Polymery byly smíchány v poměru PCL:chitosan 9:1. Směs byla zvlákněna na zařízení Nanospider a následně sušena v exikátoru po dobu 72 hodin. Morfologie ukázala tvorbu jemné vláknenné vrstvy.

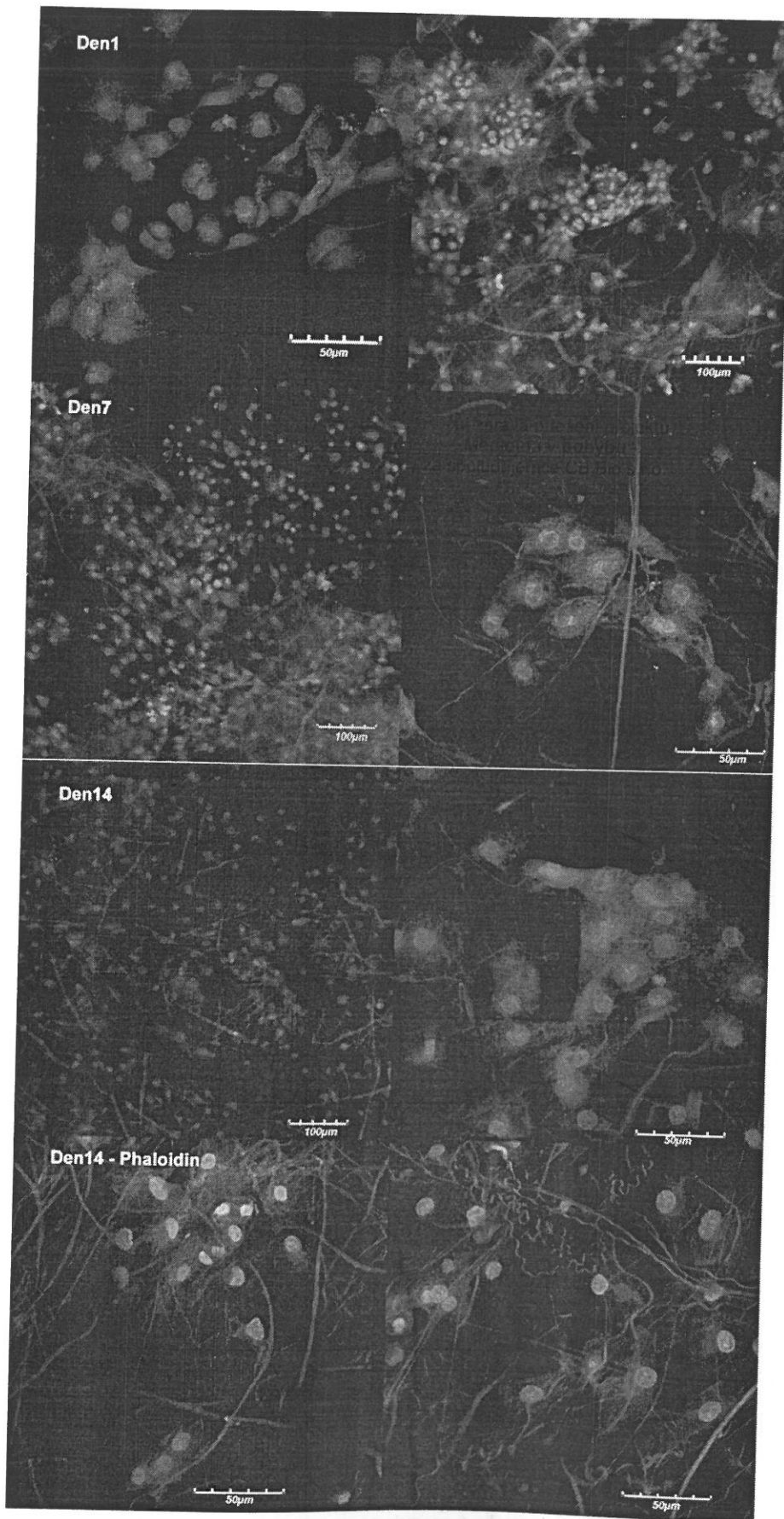


Obr. 11: Morfologie PCL-chitosanu

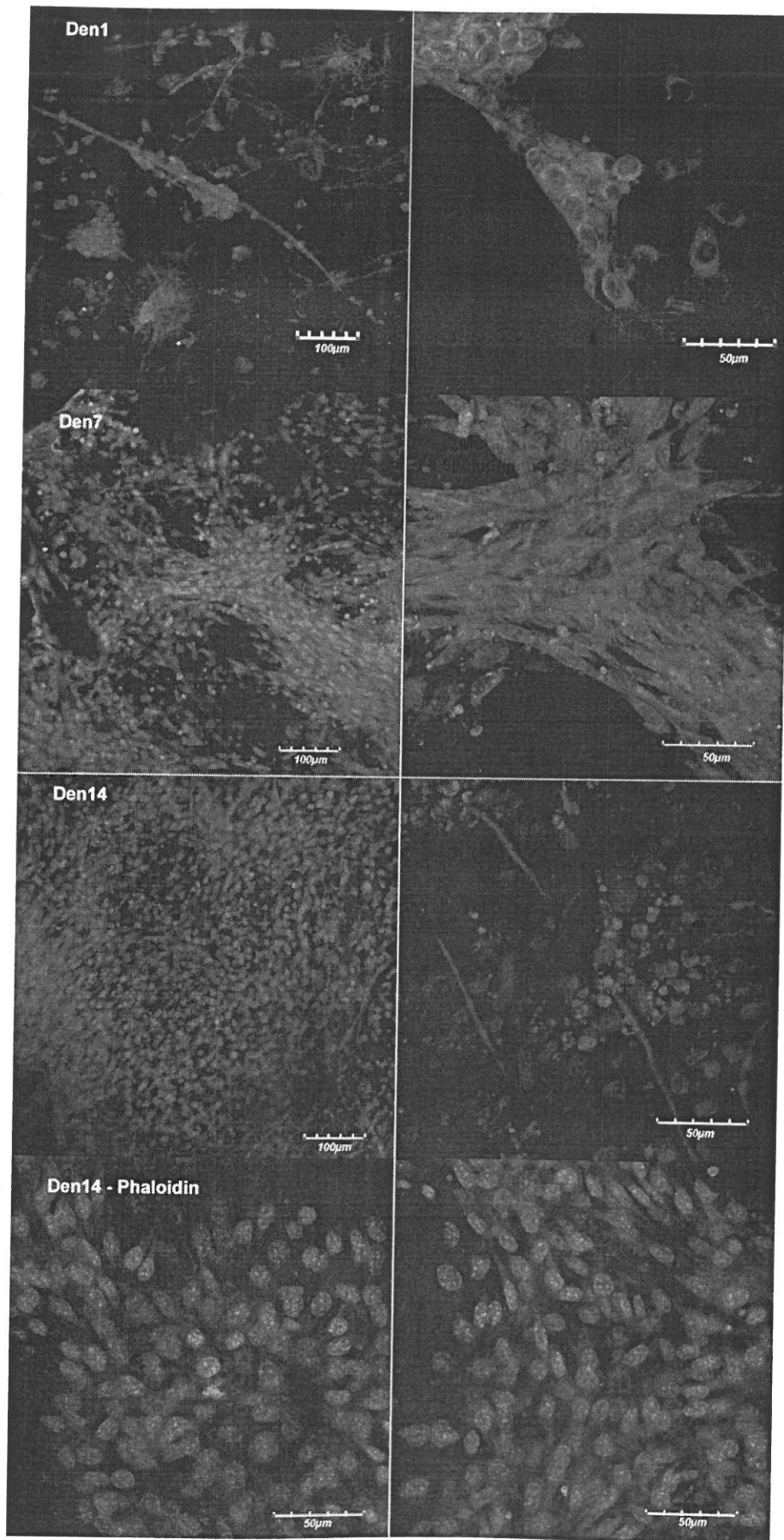
Výsledky konfokální mikroskopie ukázaly, že v případě chondrocytů na nosič adherovalo velké množství buněk. Buňky si zachovávaly kruhovou morfologii a vyskytovaly se ve velkých skupinách v porovnání s PEO-chitosanem. Počet buněk se 7 a 14 den dále zvyšoval. Buňky měly v porovnání s PEO-chitosanem méně kruhovou morfologii. Buňky vizualizované phalloidinem (vizualizace aktinového skeletu) obsahovaly kromě neuspořádaného kortikálního aktinu i stresová vlákna. Tato morfologie není pro chondrocyty zcela typická, odchylka však nebyla velká. Počet buněk na nosiči byl nejvyšší ze všech zkoumaných polymerů.

V případě fibroblastů došlo opět k výborné adhezi a zvýšené proliferaci buněk na nosiči. Buňky na nosiči vytvářely konfluentní vrstvy již 7 den po nasazení. Podobná situace nastala i 14 den. Z pohledu fibroblastů se jeví PCL-chitosan jako nejvýhodnější materiál. Fibrochondrocyty vykazovaly dobrou adhezi. 7 a 14 den tvořily na nosiči velké skupiny dobře adherovaných buněk. Morfologie buněk byla v porovnání s PVA-chitosanem a PEO-chitosanem zřetelně víc rozprostřená.

Celkově lze zhodnotit, že nosiče z PCL-chitosanu vykazovaly nejvhodnější kompatibilitu pro chondrocyty, fibroblasty a fibrochondrocyty. Z tohoto důvodu se v dalších pokusech budeme zabývat zejména PCL-chitosanem.

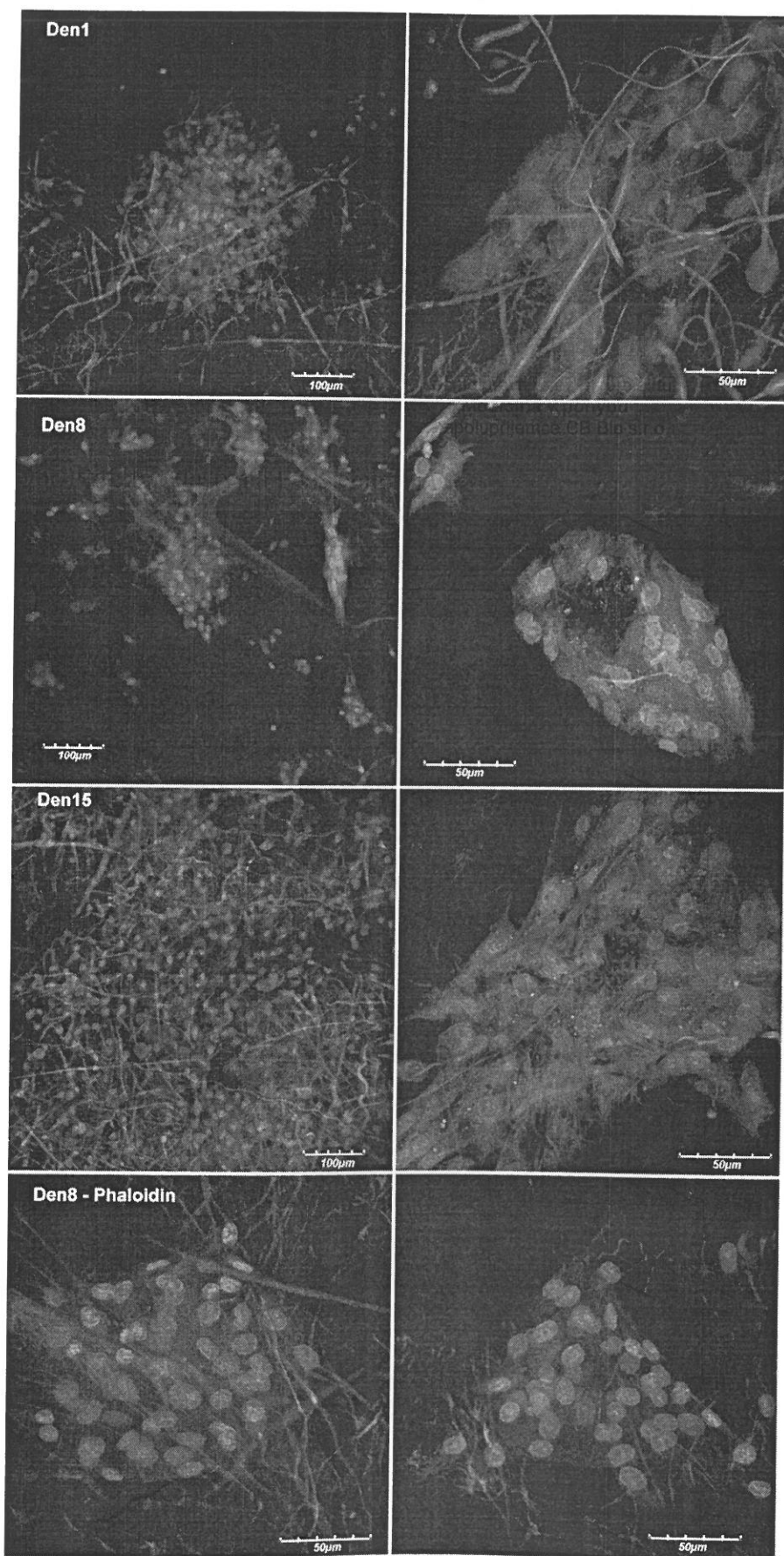


Obr.11: Chondrocyty na PCL-chitosanu.





Obr.12: Fibroblasty na PCL-chitosanu.



Obr.13: Fibrochondrocyty na PCL-chitosanu.

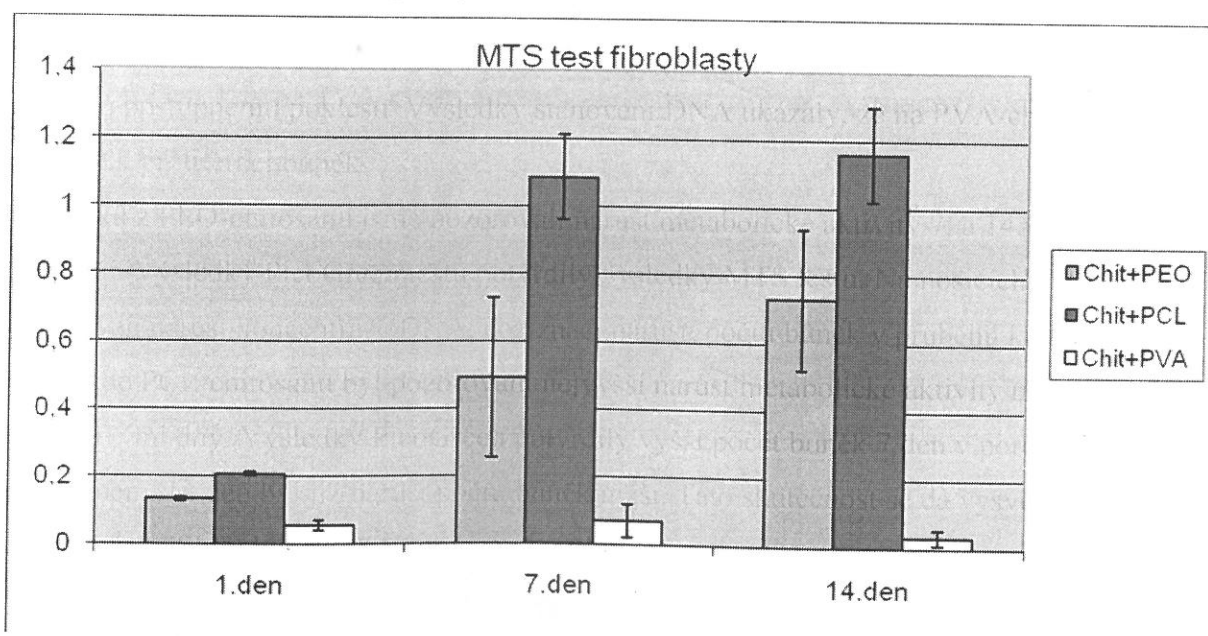
### Porovnání metabolické aktivity a proliferace na PCL-chitosanu, PEO-chitosanu a PVA-chitosanu

Výsledky konfokální mikroskopie byly dále ověřeny zkoumáním metabolické aktivity a proliferace na nosiči. Metabolická aktivita byla ověřena pomocí MTS testu a proliferace pomocí metody PicoGreen.

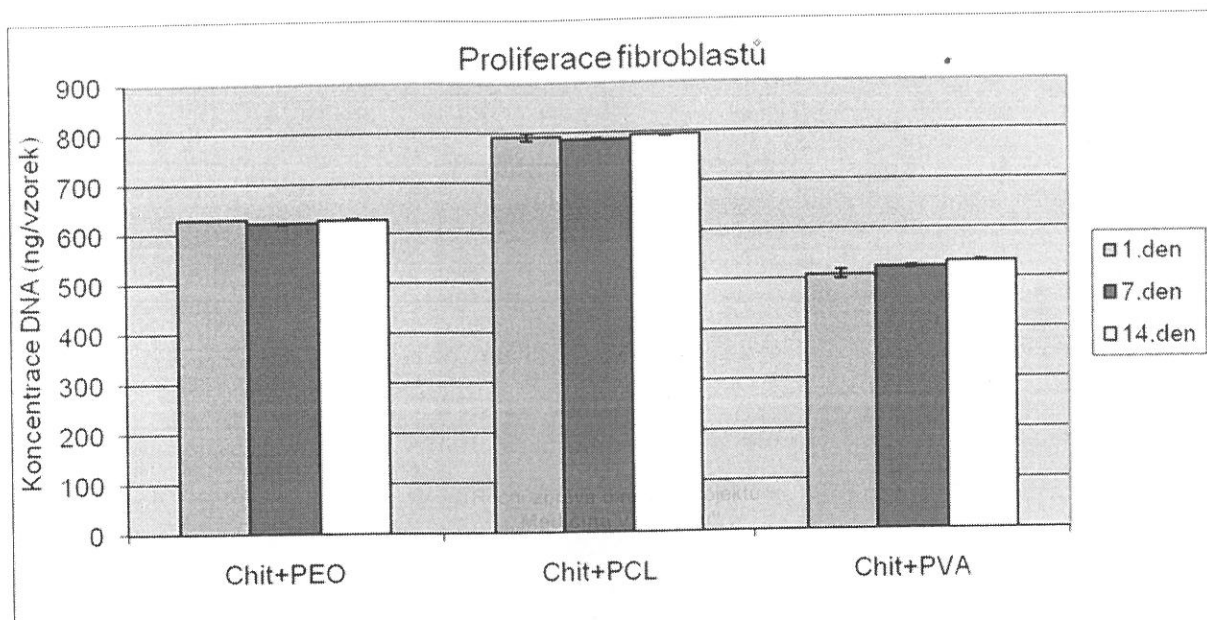
V případě fibroblastů jsme pozorovali na nosičích z PCL-chitosanu, PEO-chitosanu a PVA-chitosanu srovnatelnou adhezi buněk. V dalších dnech došlo k rozdílnému chování buněk na nosičích. U vzorků z PVA-chitosanu došlo po počáteční zvýšené metabolické aktivitě k jejímu postupnému poklesu. Výsledky stanovení DNA ukázaly, že na PVA-chitosanu nedošlo k proliferaci buněk.

U vzorků z PEO-chitosanu jsme pozorovali nárůst metabolické aktivity 7. a 14. den po nasazení. Výsledky PicoGreen testu potvrdily výsledky MTS testu. Na nosičích byl pozorován nárůst koncentrace DNA, což značí nárůst počtu buněk v průběhu kultivace.

V případě PCL-chitosanu byl pozorován nejvyšší nárůst metabolické aktivity mezi jednotlivými dny. Výsledky PicoGreen potvrdily vyšší počet buněk 7 den v porovnání s PEO-chitosanem. 14. den byl již nárůst počtu buněk nižší. Tato skutečnost se dá vysvětlit odloupením filmu buněk při promývání vzorku.

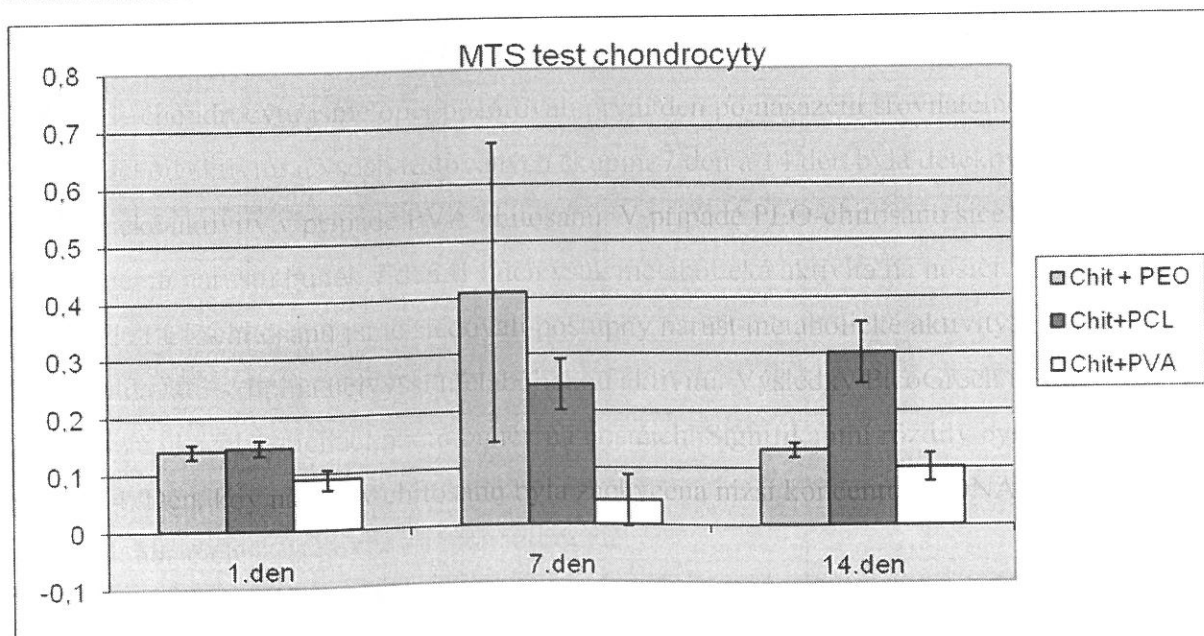


Obr. 14: Metabolická aktivita fibroblastů.

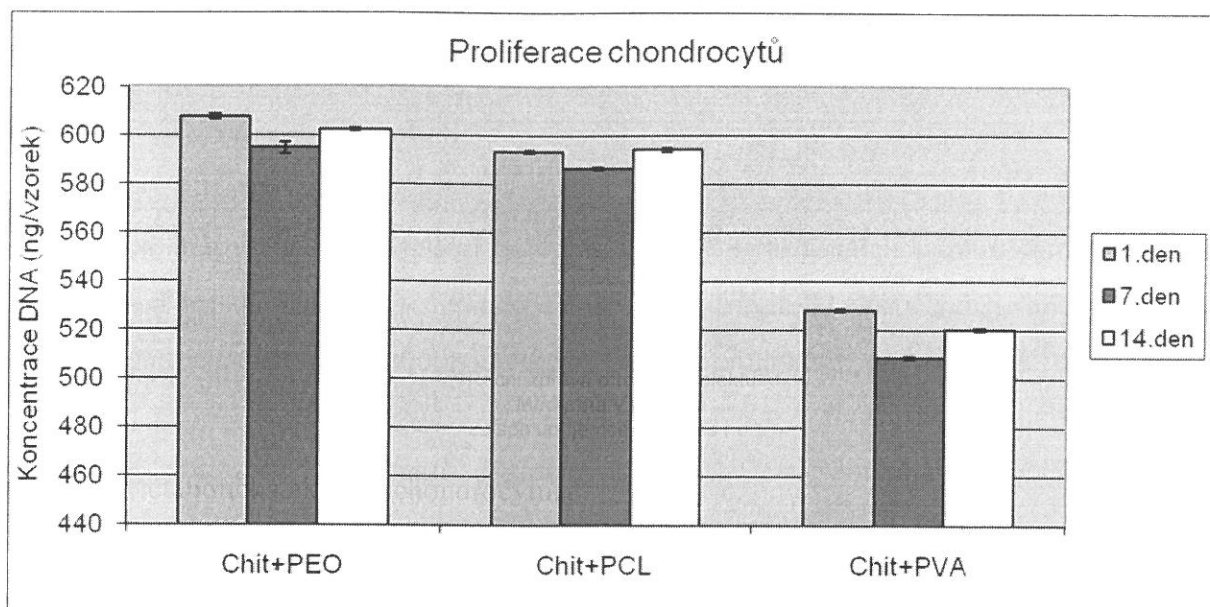


Obr. 15: Proliferace fibroblastů měřená metodou PicoGreen.

V případě chondrocytů jsme opět pozorovali první den po nasazení srovnatelnou metabolickou aktivitu u všech testovaných skupin. 7 den a 14 den byla detekována stagnace metabolické aktivity v případě PVA-chitosanu. V případě PEO-chitosanu sice došlo k výraznému nárůstu buněk 7 den, 14 den však metabolická aktivita na nosičích poklesla. V případě PCL-chitosanu jsme sledovali postupný nárůst metabolické aktivity, 14 den vykazovala tato skupina nejvyšší metabolickou aktivitu. Výsledky PicoGreen testu překvapivě ukázaly stagnaci počtu buněk na nosičích. Signifikantní rozdíly byli detekovány jedině 14. Den, kdy na PVA-chitosanu byla zachycena nižší koncentrace DNA než na ostatních nosičích.

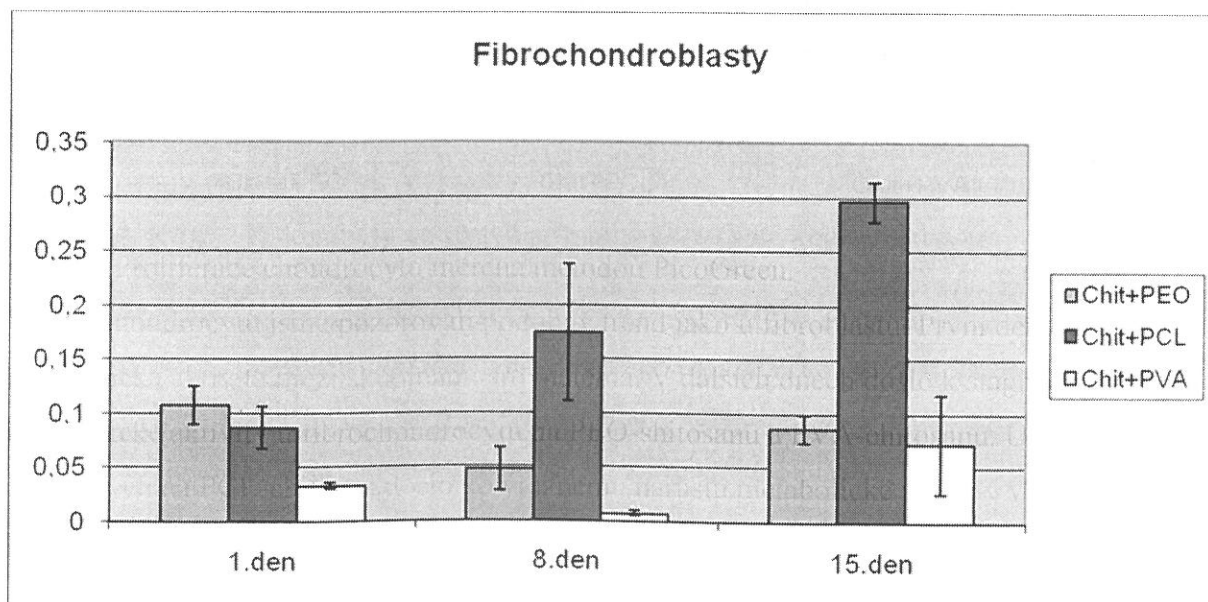


Obr. 16: Metabolická aktivita chondrocytů.



Obr.17: Proliferace chondrocytů měřená metodou PicoGreen.

U fibrochondrocytů jsme pozorovali podobný trend jako u fibroblastů. První den byla metabolická aktivita mezi skupinami srovnatelná. V dalších dnech došlo k stagnaci metabolické aktivity u fibrochondrocytů na PEO-shitosanu a PVA-chitosanu. U buněk nasazených na PCL-chitosanu došlo k výraznému nárůstu metabolické aktivity v porovnání s ostatními skupinami.



Obr. 18: Metabolická aktivita fibrochondrocytů

Výsledky stanovení metabolické aktivity a proliferace potvrdily výsledky získané z mikroskopických studií. Jako nejvhodnější nosič se jeví PCL-chitosan, který v nejvyšší míře

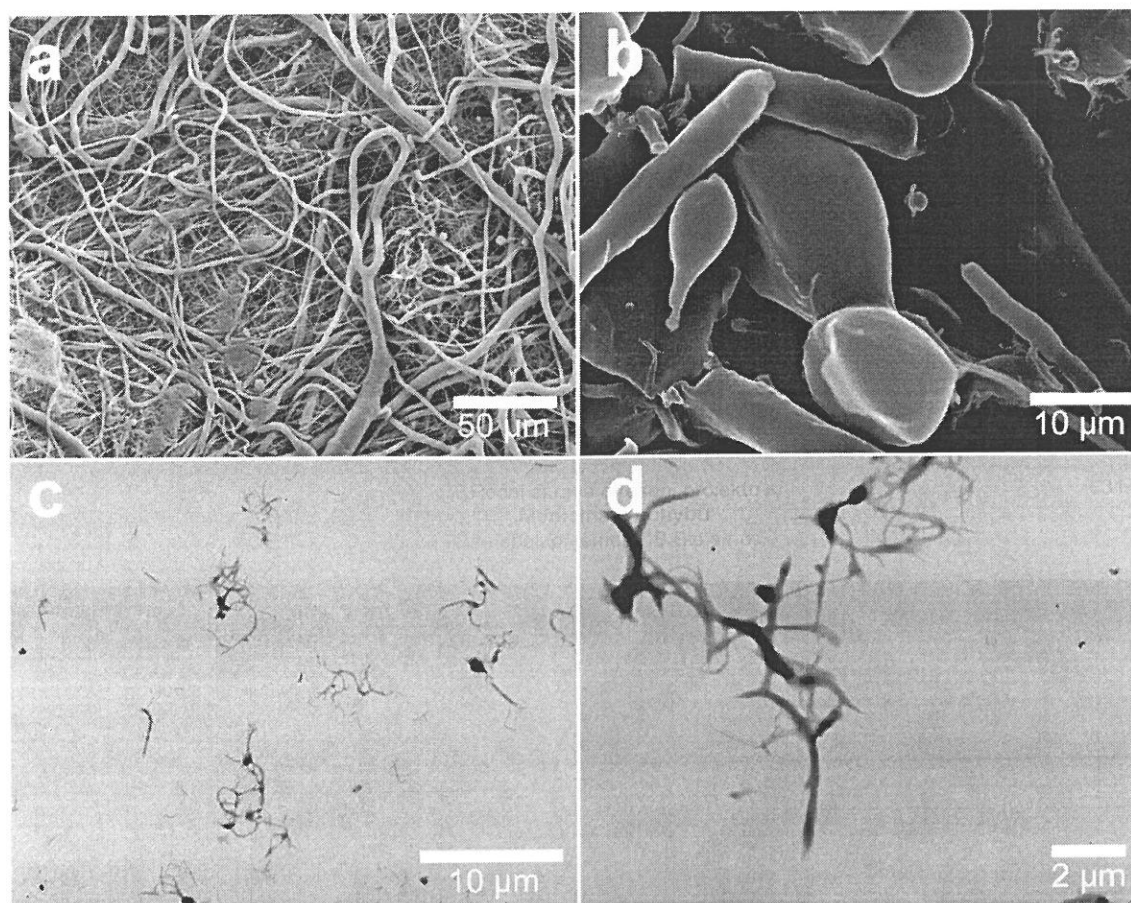
stimuluje viabilitu buněk. Umožňuje i jejich proliferaci a díky tomu ho považujeme za velice biokompatibilní materiál.

### **Testy kompozitních gelů s trombocytárním derivátem a mikrosférami z nanovláken**

Defekty kloubní chrupavky vznikají z důvodu zranění nebo osteochondrální patologií – jako je například osteonekróza nebo disekující osteochondritida. U dospělých jedinců mají tyto defekty pouze omezenou schopnost regenerace a progredují do degenerativní artritidy. Překonání nedostatečné schopnosti regenerace chrupavky a Hayflickův limit jsou výzvou pro terapii chrupavčitých defektů. Řešením by mohla být vhodná směs proliferačních a diferenciacních faktorů v kompozitních nosičích s vhodnými biomechanickými vlastnostmi. Cílem studie je vyvinout nový funkcionalizovaný hydrogel, ve kterém bude integrován systém pro dodávání léčivých látek stimulujících regeneraci kloubní chrupavky.

Injikovatelný hydrogel z kolagenu, kyseliny hyaluronové a fibrinu byl smíchán s mikročásticemi vyrobenými z nanovláken. Tyto částice byly obohaceny o kyselinu askorbovou a dexamethazon. Dále byl sledován efekt suspenze obohacené o trombocyty (TRS). Gely byly kultivovány společně s mesenchymálními kmenovými buňkami po dobu 14 dní a byla hodnocena životaschopnost, proliferace a morfologie buněk pomocí molekulárních a mikroskopických technik. Byla také sledována degradace nosičů.

Nanovlákná z 12% PCL byla připravena pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování na zařízení Nanospider<sup>TM</sup>. 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 kulovitého tvaru.



**Obr. 19: 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.

Injektivatelné částice byly získány mokřým kryogenním mletím v 10% roztoku Pluronicu F68, jak bylo popsáno již dříve v patentu 302699 a publikaci Knotek a kol. [13]. SEM analýza namletých nanovláken ukázala částice heterogenní velikosti a tvaru (Obr. 19b). Agregované částice vláknité morfologie byly vizualizovány za pomoci TEM mikroskopie. Byla však zřejmá i přítomnost jednotlivých vláken (Obr. 19c,d).

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

**Tabulka 1:** Přehled připravených hydrogelových nosičů, počítáno na 1 ml nosiče

Nosič	Fibrinová složka		Trombinová složka					
	Fibrinogen [μl]	Kolagen [μl]	I	MSC	HA [μl]	TRS	MP <sup>-</sup> /MP <sup>+</sup> [mg]	Trombin [μl]
Gel	450	45	2	× 10 <sup>6</sup>	73	---	---	225
Gel/MP <sup>-</sup>	450	45	2	× 10 <sup>6</sup>	73	---	25 mg MP <sup>-</sup>	225
Gel/MP <sup>+</sup>	450	45	2	× 10 <sup>6</sup>	73	---	25 mg MP <sup>+</sup>	225
Gel/TRS	450	45	2	× 10 <sup>6</sup>	73	1 × 10 <sup>9</sup>	---	225
Gel/TRS/MP <sup>+</sup>	450	45	2	× 10 <sup>6</sup>	73	1 × 10 <sup>9</sup>	25 mg MP <sup>+</sup>	225

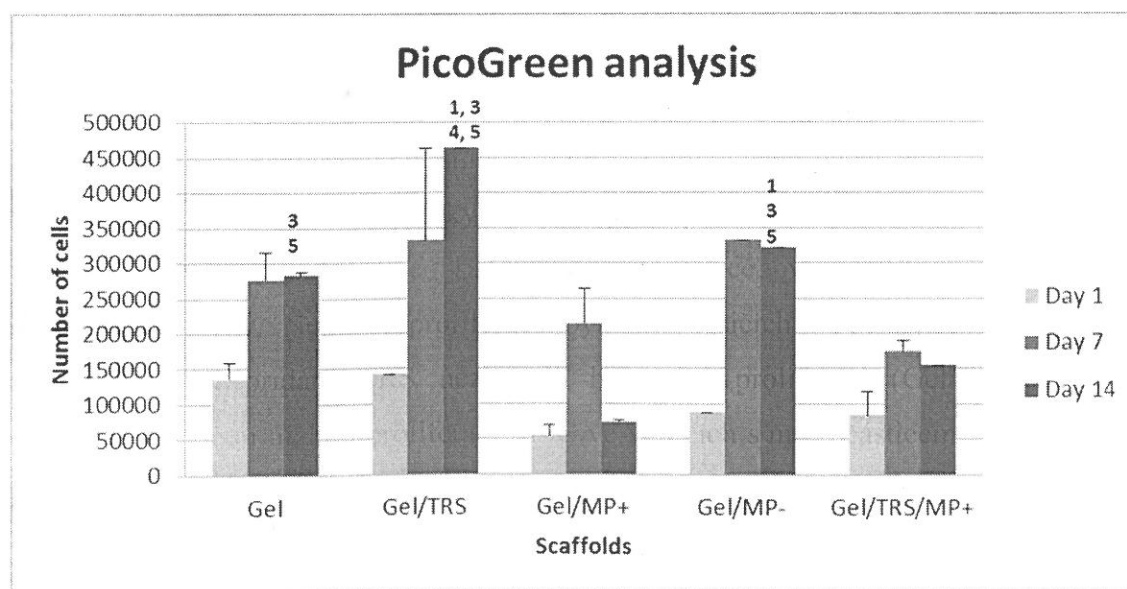
Bylo připraveno 5 rozdílných vzorků kompozitního hydrogelu na bázi kolagenu a fibrinu. Jmenovitě se jednalo o hydrogel obohacený pouze o TRS, kombinaci hydrogelu s mikročásticemi obohacenými o kyselinu askorbovou a dexamethazon, s prázdnými mikročásticemi a s mikročásticemi obohacenými i TRS. Čistý gel bez jakékoli další funkcionalizace byl použit jako kontrolní vzorek. Všechny vzorky obsahovaly stejné množství MSC. Byly provedeny degradační studie nosičů bez buněk, aby bylo 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 pozorovaná výrazně nižší degradace ve vzorcích, které obsahovaly mikročástice. Tyto výsledky potvrdily naši hypotézu, že mikročástice mají pozitivní efekt na stabilitu gelu.

	den 1 – den 7 [%]	den 1 – den 14 [%]
Gel	44,4 ± 8,3	91,9 ± 3,7
Gel/TRS	46,2 ± 4,6	91,8 ± 3,3
Gel/MP <sup>+</sup>	37,6 ± 11,2	71,1 ± 1,9
Gel/MP <sup>-</sup>	51,4 ± 10,7	75,5 ± 4,1

Gel/TRS/MP+ 42,3 ± 2,3 84,4 ± 3,8

**Tabulka 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.

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. 20). 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<sup>+</sup>). Ani přidání TRS nezlepšilo buněčnou proliferaci (Gel/TRS/MP<sup>+</sup>). Takové výsledky naznačují nízkou proliferaci MSC ve vzorcích s mikročásticemi. Na druhou stranu, prázdné mikročástice (Gel/MP<sup>-</sup>) v porovnání s kontrolou (Gel) růst buněk neovlivnily.

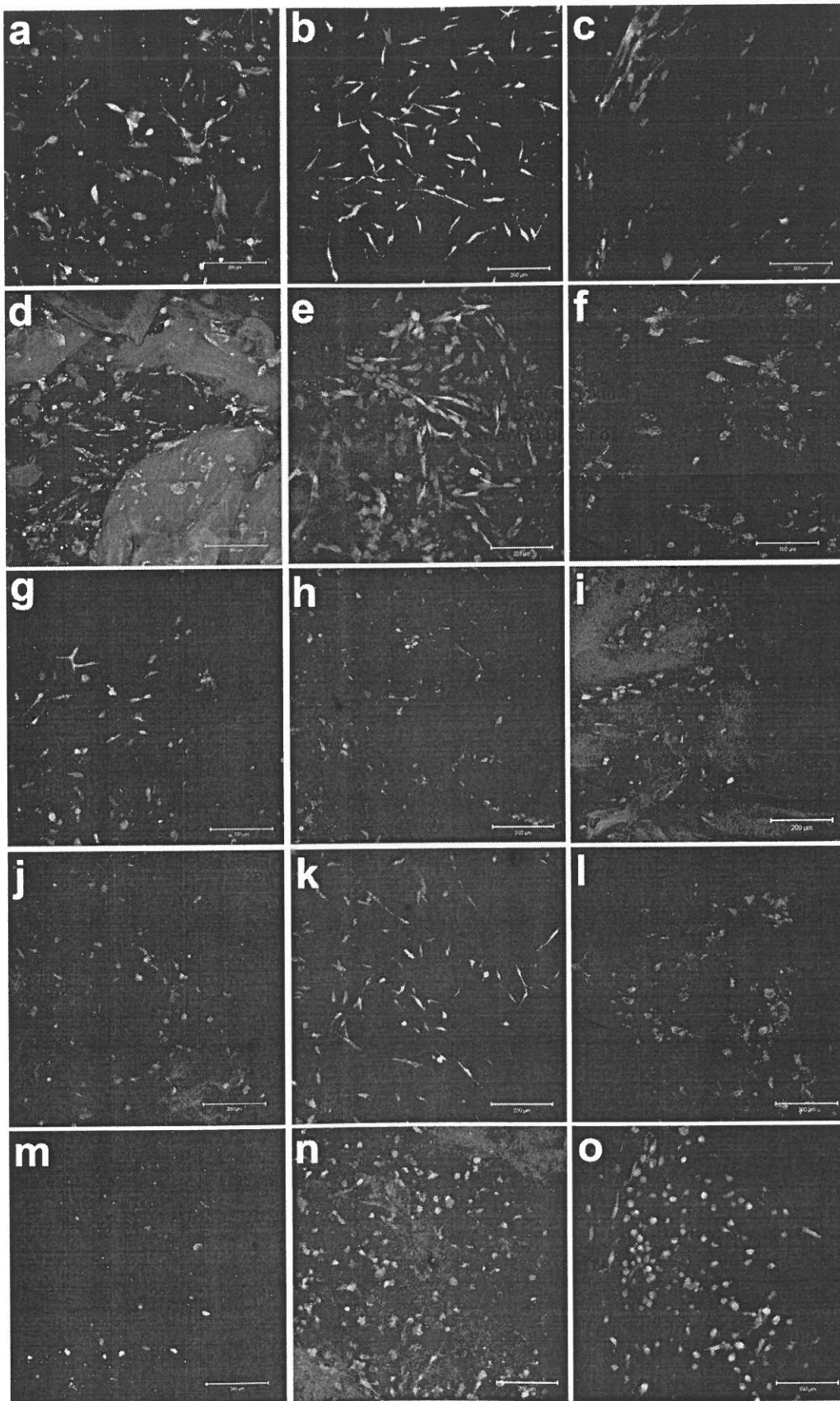


**Obr. 20: Proliferace buněk v gelech stanovena pomocí metody PicoGreen.**

Data získaná konfokální mikroskopií korelovala s daty z PicoGreen analýzy. Barvení zobrazilo živé buňky (Obr. 21) 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<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> a Gel/TRS/MP<sup>+</sup> byl počet MSC nižší, ale bylo pozorováno významně méně mrtvých buněk. Navíc se v Gel/MP<sup>+</sup> a Gel/TRS/MP<sup>+</sup> vzorcích změnila morfologie buněk v kulaté buňky s minimálním počtem výběžků. Taková morfologie je spojována s chondrogenní diferenciací buněk.



Obr. 21: 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).

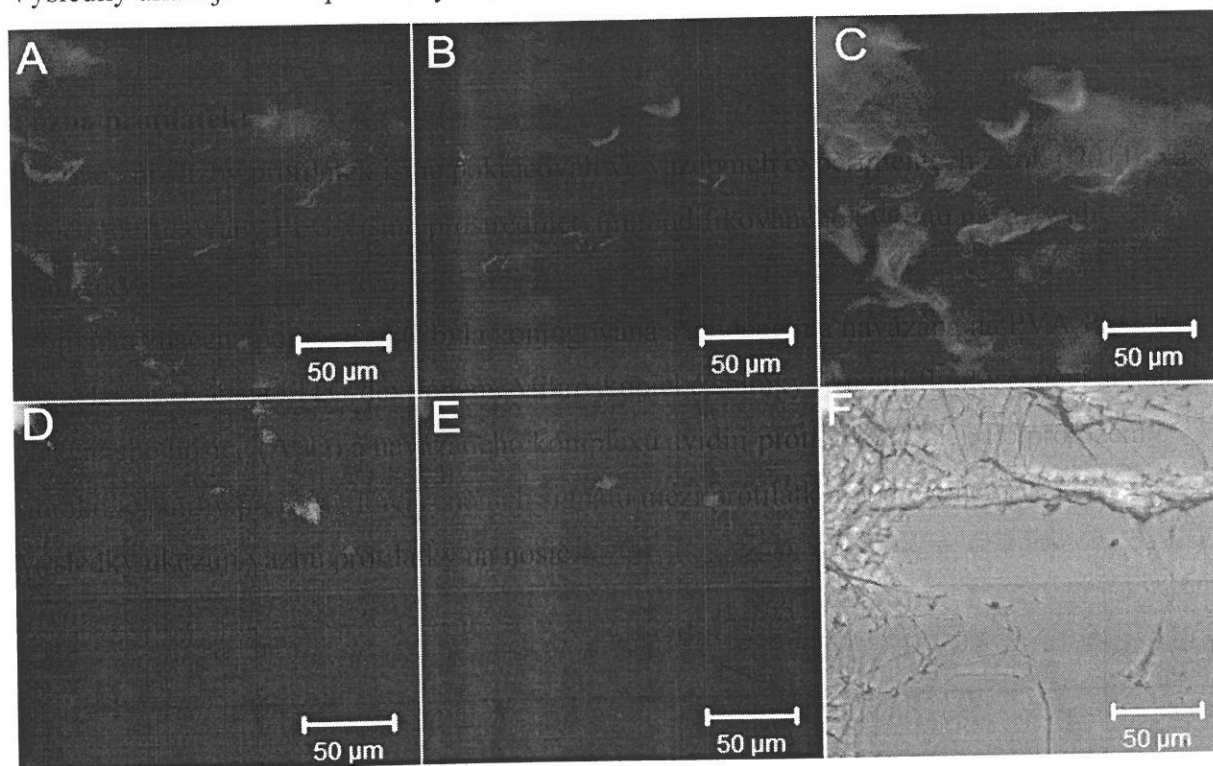
### **Závěr**

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 diferenciaci buněk. Obohacení hydrogelu o trombocyty zlepšilo proliferaci a životaschopnost mesenchymálních buněk. Nosič je vhodný pro další testování *in vivo*.

### Vazba protilátek:

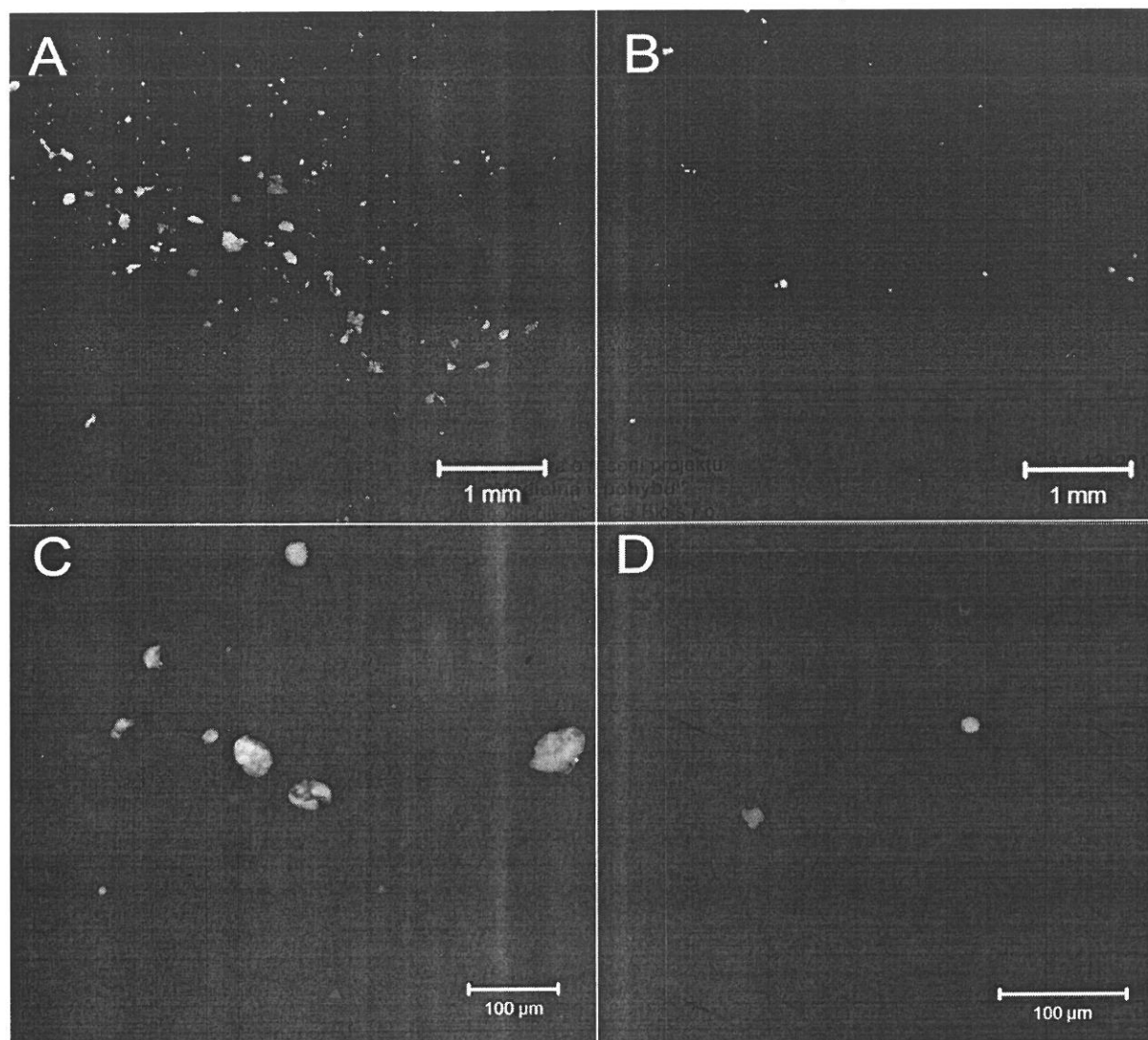
Pro ověření vazby protilátek jsme pokračovali ve vazebních experimentech z roku 2011. Na nosič modifikovaný PEGb jsme prostřednictvím modifikovaného avidinu navazovali protilátky.

Protilátka značená pomocí APC byla konjugovaná s avidinem a navázána na PVA-PEG-b nanovlákná značená FITC-dextranem. Mikroskopické snímky ukazují fluorescenční signál vláknenného nosiče (A, D) a navázaného komplexu avidin-protilátka (C, E). Po proložení snímků je patrný překryv fluorescenčních signálů mezi protilátkou a povrchem vláken. Výsledky ukazují vazbu protilátky na nosič.



Obr. 22: Vazba CD29 – avidinového komplexu na vlákna z PVA-PEG-b

Dále jsme testovali změnu adheze na takto modifikovaný nosič. MSC byly nasazeny na nosič PVA-PEGb s protilátkou a bez protilátky. Výsledky ukázaly zvýšenou adhezi buněk na nosič modifikovaný protilátkou. Konfokální snímky ukázaly na nemedifikovaném nosiči adhezi  $122 \pm 27$  buněk/ $\mu\text{m}^2$  a na modifikovaném nosiči  $1375 \pm 473$  buněk/ $\mu\text{m}^2$ .



Obr. 23: Adheze buněk na modifikovaný a nemodifikovaný nosič.

Výsledky potvrdily význam vazby protilátky na nosič při zachycení MSC a tím zvýšení jejich počtu na nosičích.

#### **In vivo výsledky:**

**Cíl:** Najít vhodný bezbuněčný scaffold na báze fibrinu s růstovými faktory v trombocytárním koncentrátu pro regeneraci osteochondrálních defektů

#### **Metody:**

V experimentu bylo použitých 20 králíků. I. Skupina – do osteochondrálního defektu (7 králíků) byl implantován scaffold obsahující fibrin, kyselinu hyaluronovou, kolagen typu I, mikročástice nanovláken z poly-ε-kaprolaktonu/chitosanu a trombocytární koncentrát. I. skupina (7 králíků) obsahovala mikročástice modifikované CD 44, scaffold byl stejného složení jako v I. skupině. V kontrolní skupině byl defekt neléčený. Po 6 týdnech byly zvířata usmrceny a vzorky fixovány pufovaným formalínem a hodnoceny histologicky a imunohistochemicky. Kvůli nedostatečným finančním prostředkům byly předběžně zabarveny 2 defekty v každé skupině. Řezy byly barvené pomocí hematoxylin-eosinem, zeleným trichromem s Verhoeffovým hematoxylinem (odlišení vaziva, svaloviny a elastinu), pikrosiriovou červení (zvýraznění detekce vláken kolagenu typu I pomocí polarizační mikroskopie) a kombinací alcianové modři při pH 2,5 a metody PAS

s odlišením kyselých a neutrálních glykosaminoglykanů pojiva. Celkově bylo z každého vzorku vyšetřeno minimálně 10 řezů.

### Výsledky – makroskopické



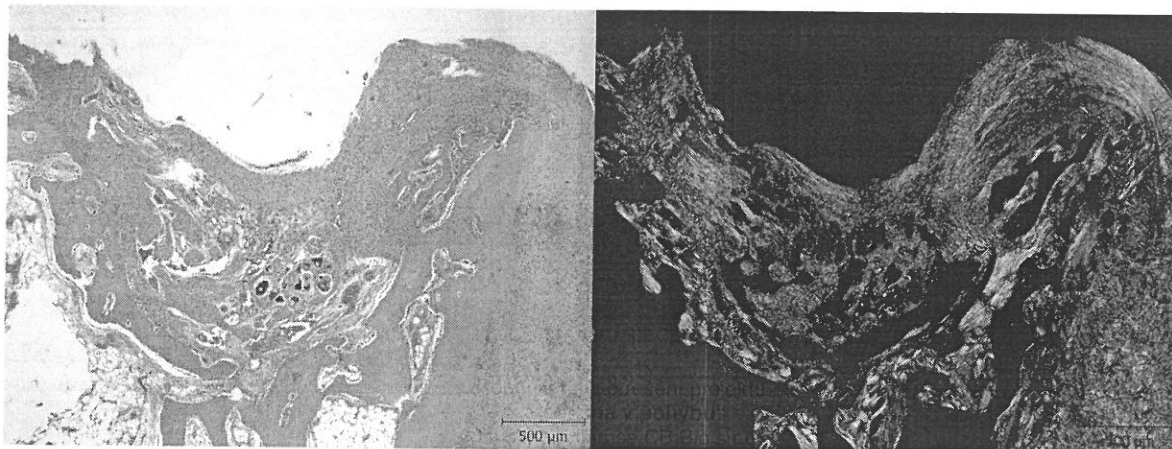
kontrola  
I. skupina



### II. skupina

Skupina kontrol vykazovala téměř vyplněné defekty, u testovaných scaffoldů byly defekty méně vyplněné. Skupina kontrol nevykazovala známky synovitidy, skupina s modifikovanými defekty vykazovala známky těžké synovitidy u 4 zvířat, u nemodifikovaných defektů vykazovali lehkou synovitidu defekty u 4 zvířat.

**Výsledky:**  
**Kontroly**

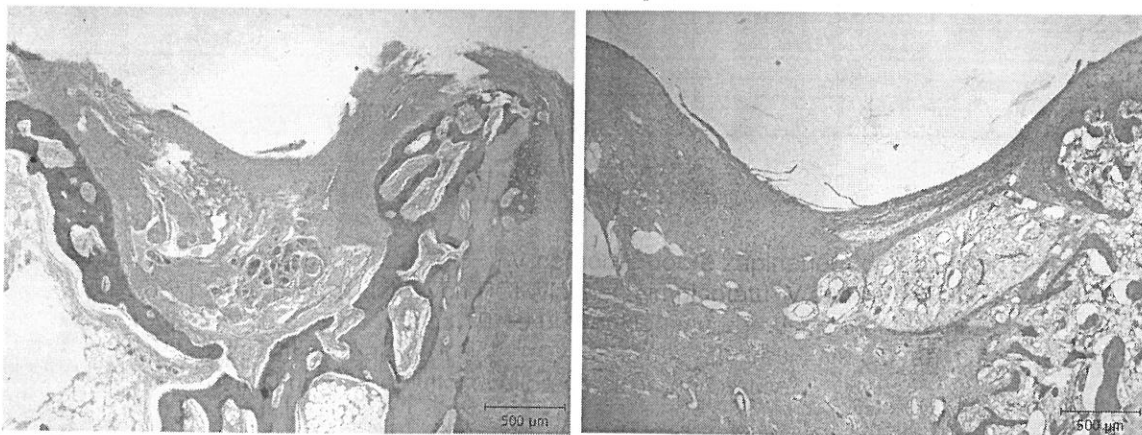


A/

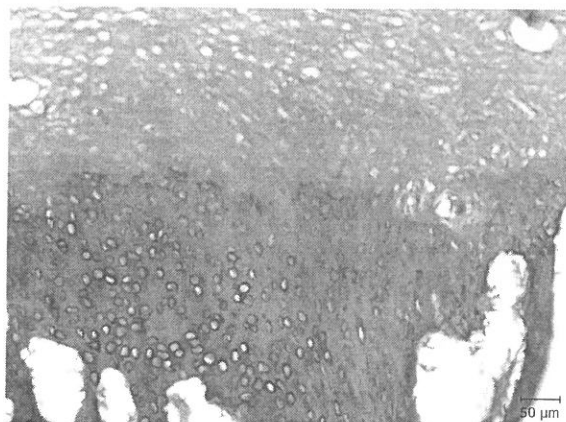
B/

Barvení HE (A) (Vzorek 4/2012/EF), V poměrně dobře zaplněném defektu jsou opticky prázdné prostory patrně po rozpuštěných PCL vláknách implantátu. V centru hojícího se defektu jsou cizorodé částice o průměru cca 10-15 µm, obklopené obrovskými buňkami z cizích těles. Širší okolí je bez zánětlivé reakce. B/ polarizované světlo a pikrosiriová červeň. Červeně a žlutě kolagen typu I. Uprostřed drobné opticky dvojlomné cizorodé částice.

C/ barvení alcianová modř+PAS. V pravé části přerůstá do defektu vazivová chrupavka pozitivně se barvící na glykosaminoglykany.



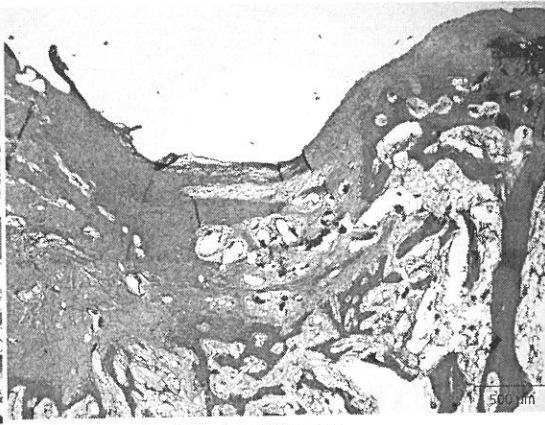
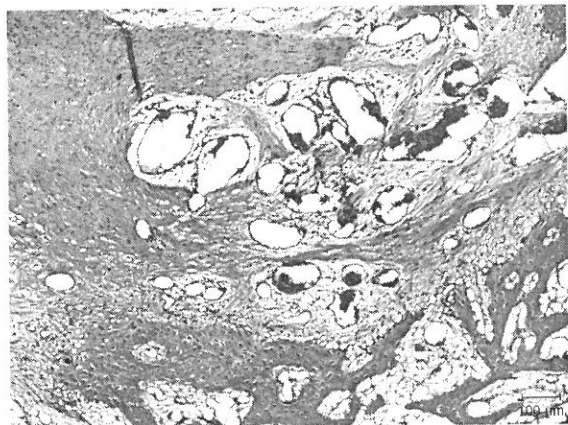
I. skupina



A/

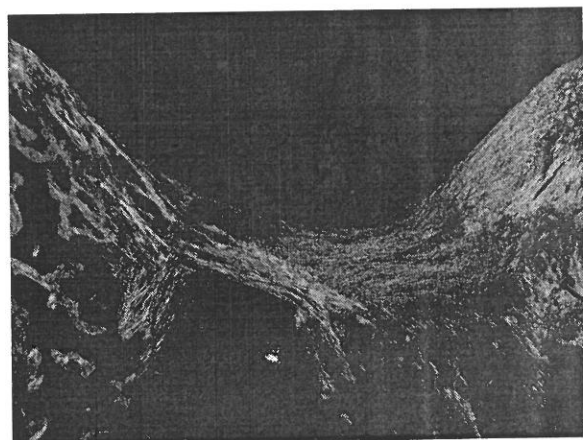
A/ barvení HE. V poměrně dobře zaplněném defektu jsou opticky prázdné prostory patrně po rozpuštěných vláknech implantátu. B/ barvení alciánová modř+PAS. Na spodině defektu se na kontaktu s kostí diferencuje hyalinní chrupavka. Pericelulární matrix chondrocytů se barví na glykosaminoglykany silněji nežli interteritoriální matrix.

B/



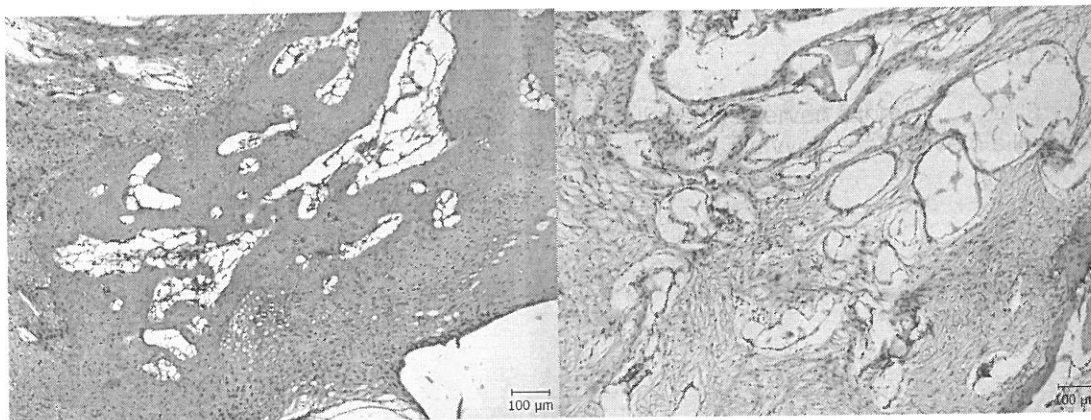
C-D/

barvení trichrom. Granulační vazivo hojně prokrvené, bez zánětlivé infiltrace.



E/ pikrosirius červeň. Horní část defektu je vyplněna vazivem s kolagenem typu I.

II. Skupinabarvení HE. V laterální stěně defektu zachycen ostrůvek hyalinní chrupavky. B/ barvení alciánová modř+PAS. Hojně prokrvené granulační vazivo kolem zbytků



implantátu, beze známek zánětu.



C/ D/  
C/ barvení trichrom. V poměrně dobře zaplněném defektu jsou opticky prázdné prostory patrně po rozpuštěných mikročásticích nanovláknec implantátu. D/ barvení pikrosirius červeň. Ve výplni defektu převažuje kolagenní vazivo.

**Diskuze:** Barvení vzorků neprokázali rozdíly mezi dvoma testovanými scaffoldami. U obou skupin se vyskytovaly prostory pro rozpuštěných částicích PCL v centru defektu, které byly lokálně obklopeny infiltrací leukocytů. U obou testovaných scaffoldů byl nalezen kolagen typu II a přítomné kyslé a neutrální glykosaminoglykany se současnou přítomností chondrocytů v lakunách.

**Závěr.** Růstové faktory trombocytárního koncentrátu přítomné v gelu stimulovali migraci mesenchymálních kmenových buněk do bezbuněčného scaffoldu z fibrinu, kyseliny hyaluronové, kolagenu typu I a mikročástic z PCL a následně stimulovali jejich diferenciaci do chondrocytů. Scaffoldy s modifikovanými mikročásticemi vyvolali zánětlivou reakci a synovitidu.

Pro komplexní zhodnocení regenerace osteochondrálních defektů je nutné vyhodnotit všechny odebrané defekty a prozkoumat hojení i po rozpadu částic (po 6 měsících). Pro snížení zánětlivé reakci pomalu rozpadajících se mikročásticích je vhodné otestovat jednak jejich nižší koncentraci, a případně jejich záměnu za částice složené z rychleji degradujícího polymeru.

## 5. Závěr

Shrnutí výsledků řešení projektu v roce 2012.

V Praze ..... dne 31. 12. 2012

Zpracoval: Bc. Jana Zduvická

Podpis: Zduvická

Razítko: **CB Bio s.r.o.** (2)

Národních hrdinů 279  
190 12 Praha 9 - Dolní Počernice  
IČ: 27168204 DIČ: CZ27168204