



Vývoj nanovláčkových nosičů na bázi polykaprolaktonu pro regeneraci chrupavky

Lenka Waloszková^{1,2}, Matej Buzgo^{1,3}, Věra Lukášová¹, Eva Filová¹

¹Ústav experimentální medicíny AVČR. v.v.i., Praha; ²Gymnázium Olgy Havlové, Ostrava; ³Univerzitní centrum energeticky efektivních budov, Buštěhrad

Úvod

Regenerace chrupavky je limitovaná. Její regeneraci podporují nosiče s buňkami, které tvoří extracelulární hmotu. Nosiče z nanovláček mají vhodnou strukturu, připomínající extracelulární hmotu chrupavky, která je tvořena především kolagenem typu II a proteoglykany. Cílem je vyvinout biodegradabilní nanovláčkový nosič, který umožní postupné uvolňování růstových faktorů podporujících růst a chondrogenní diferenciaci – inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-I), bazický fibroblastový faktor (bFGF) a transformační růstový faktor (TGF-β1). Poly-ε-caprolacton (PCL) je biokompatibilní biodegradovatelný polymer, který se používá pro přípravu nanovláček pro řízené uvolňování léčiv (1). Pluronic F68 je složený z hydrofilních bloků polyetylenoxidu (PEO) a hydrofobního polypropylenoxidu (PPO) uspořádaných v tříblokové struktuře: PEO-PPO-PEO, může interagovat s plasmatickými membránami a též snižovat povrchové napětí roztoků (2). Hyaluronan sodný je hydrofilní polymer tvořený disacharidovými jednotkami kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminem, který je normální součástí chrupavky. Vysoká molekulová hmotnost hyaluronanu zvyšuje viskozitu roztoku a může zpomalovat difuzi látek.

Metody

Elektrostatickým zvlákněním z volné hladiny jsme připravili nanovláčkové nosiče z poly-ε-kaprolaktonu s obsahem vodného roztoku z růstových faktorů: bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF), inzulínu podobný růstový faktor-I (IGF-I), transformační růstový faktor -β1 (TGF-β1) (vzorek PCLGF), stejné růstové faktory s přidáním amfifilní látky Pluronic F68 (vzorek PLUGF), nebo Hyalganu inj (hyaluronan sodný) (Mr=500-730 kDa) (vzorek HYAGF), nebo Synvisc One inj (hyaluronan sodný a deriváty hyaluronanu (Mr= 6 MDa) (vzorek SYNGF), kontrolní vzorek bez růstových faktorů s Pluronicem F68 (vzorek PLUK) a čistý PCL bez růstových faktorů (vzorek PCLK). Nosiče byly osázeny mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřeně prasete (35×10³ buněk/jamku v 96-jamkové platničce) a kultivovány v MEM médiu s 1% fetálního telecího séra a antibiotiky. Hodnotili jsme buněkovou viabilitu (životaschopnost) MTS testem CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay a růst buněk testem DNA (Quant-iT[™] dsDNA Assay Kit, Life Technologies). Vzorky jsme zobrazili pomocí fluorescenčního barvení 3,3'-Dihexylocarbocyanine iodide DiOC6(3)/propidium jodid (zelené buněčné membrány/červená jádra). Diferenciaci buněk do chondrocytů jsme ověřili barvením kolagenu II s pomocí monoklonální protilátky.

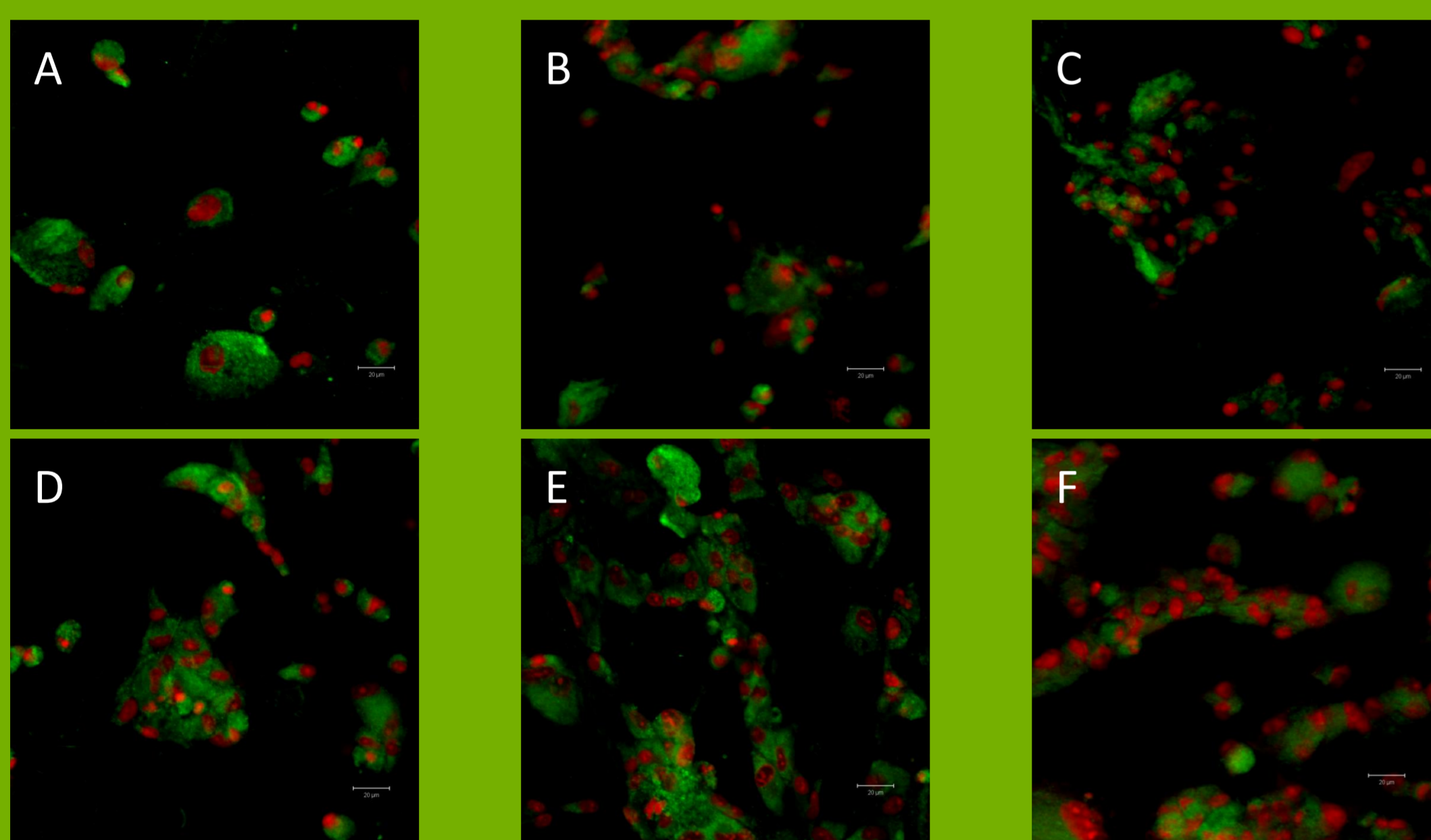
Výsledky a diskuze

- Nárůst/zachování úrovně viability mezenchymálních kmenových buněk byl pozorován jen 3. den po nasazení, 7. den byl výrazný pokles. Nárůst DNA byl pozorován 7. den, pokles byl pozorován 14. den. Nosiče s obsahem růstových faktorů, PF68 nebo hyaluronanu ukázaly vyšší obsah DNA 7. den a v porovnání s kontrolou PCLK. 1. den po nasazení buňky dobře adherovaly na všechny nosiče. 14. den došlo k výraznému snížení adheze a nárůstu počtu mrtvých buněk, především u kontrol bez růstových faktorů a u PCLGF.
- Nosiče s obsahem PF68 a hyaluronanu stimulovaly tvorbu kolagenu II u mezenchymálních kmenových buněk i bez přítomnosti růstových faktorů. Největší množství kolagenu II 14 dní po nasazení bylo pozorováno u obou nosičů s hyaluronanem. Hyaluronan je součástí normální chrupavky a může stimulovat diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do chondrocytů. Hyaluronan v obou nosičích také zvyšuje viskozitu zvlákněvaného roztoku a zpomaluje uvolňování růstových faktorů.
- Pluronic F68 v nanovláčkách měl pozitivní účinek na růst a diferenciaci buněk především po dobu prvních 7 dní kultivace, což je pravděpodobně způsobeno jeho amfifilním charakterem, po 7 dnech došlo zřejmě k jeho degradaci.

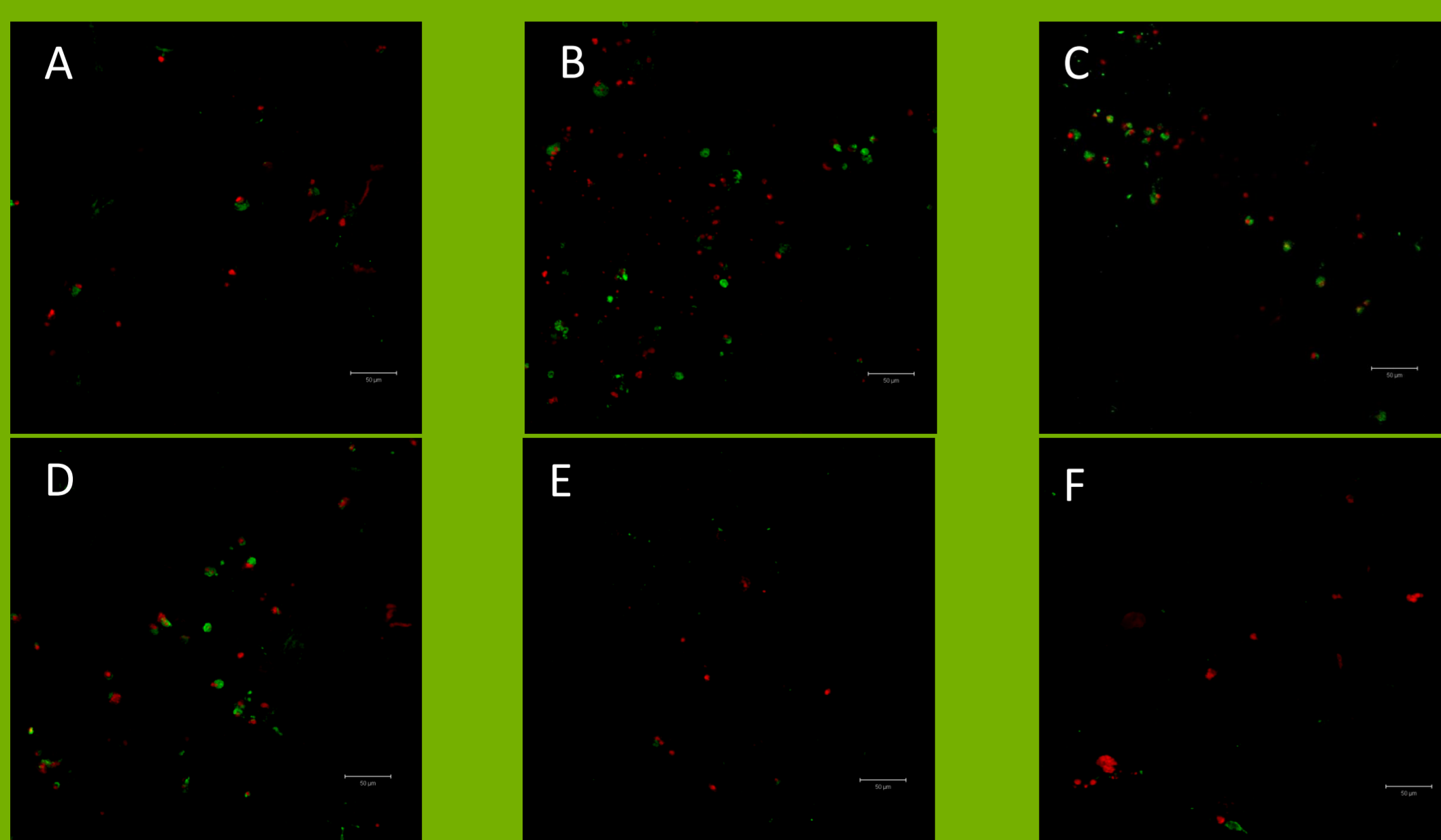
Závěr

PCL nanovláčka s pluronikem F68 a růstovými faktory stimulovaly růst a chondrogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk po dobu 7 dní kultivace. PCL nanovláčka s hyaluronanem s vyšší i nižší molekulovou hmotností podpořily přežití buněk a stimulovaly tvorbu kolagenu II po dobu 14 dní, proto jsou vhodné systémy pro řízené uvolňování látek.

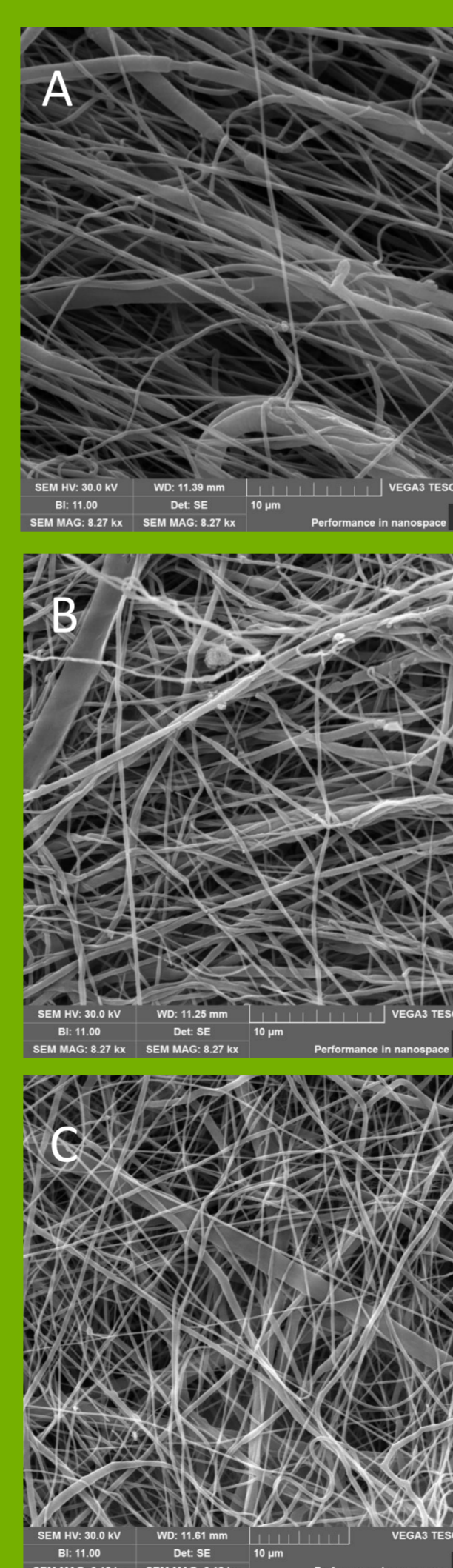
Výsledky



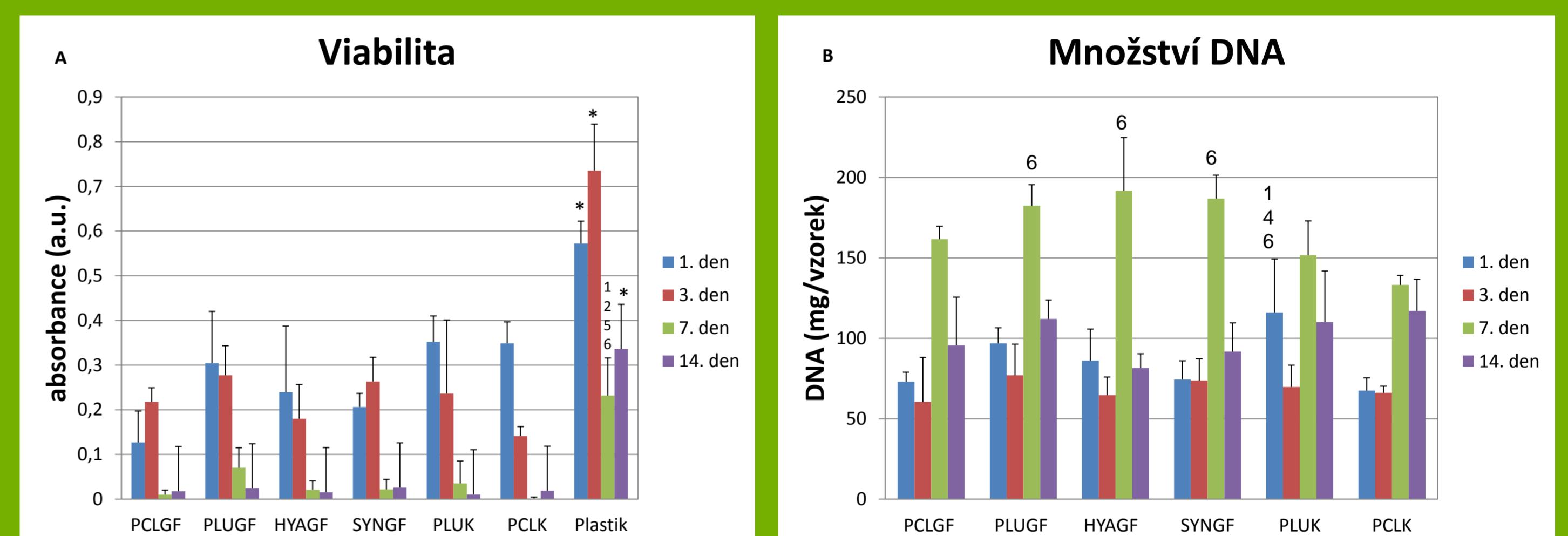
Obr. 1 Fluorescenční barvení plasmatických membrán (zelené) a jader (červené) mezenchymálních kmenových buněk 1. den po nasazení na nosičích PCLGF(a), PLUGF(b), HYAGF(c), SYNGF(d), PLUK(e), PCLK(f). Snímání konfokálním mikroskopem, obj. 20x.



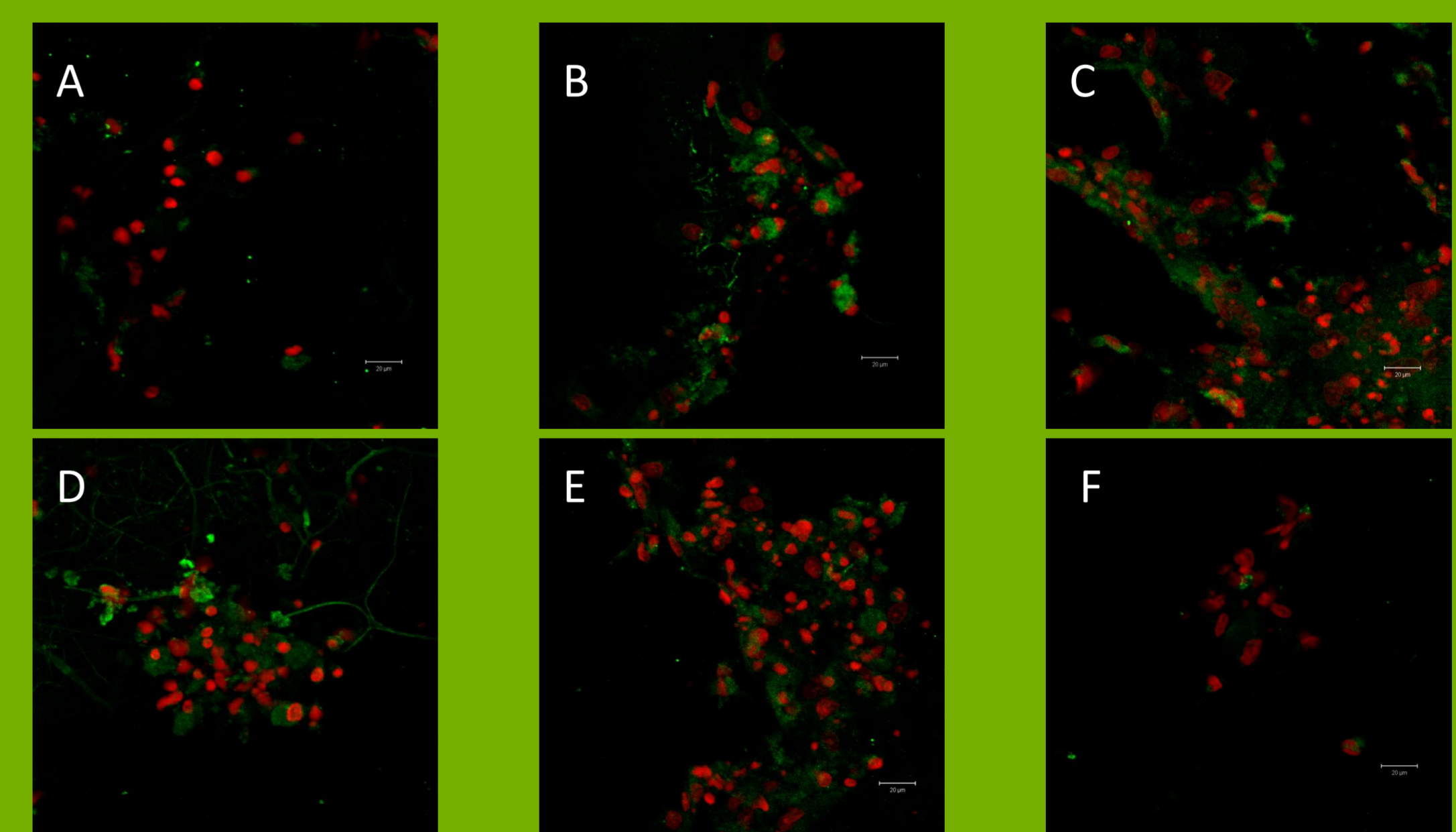
Obr. 2 Fluorescenční barvení plasmatických membrán (zelené) a jader (červené) mezenchymálních kmenových buněk 14. den po nasazení na nosičích PCLGF(a), PLUGF(b), HYAGF(c), SYNGF(d), PLUK(e), PCLK(f). Snímání konfokálním mikroskopem, obj. 20x.



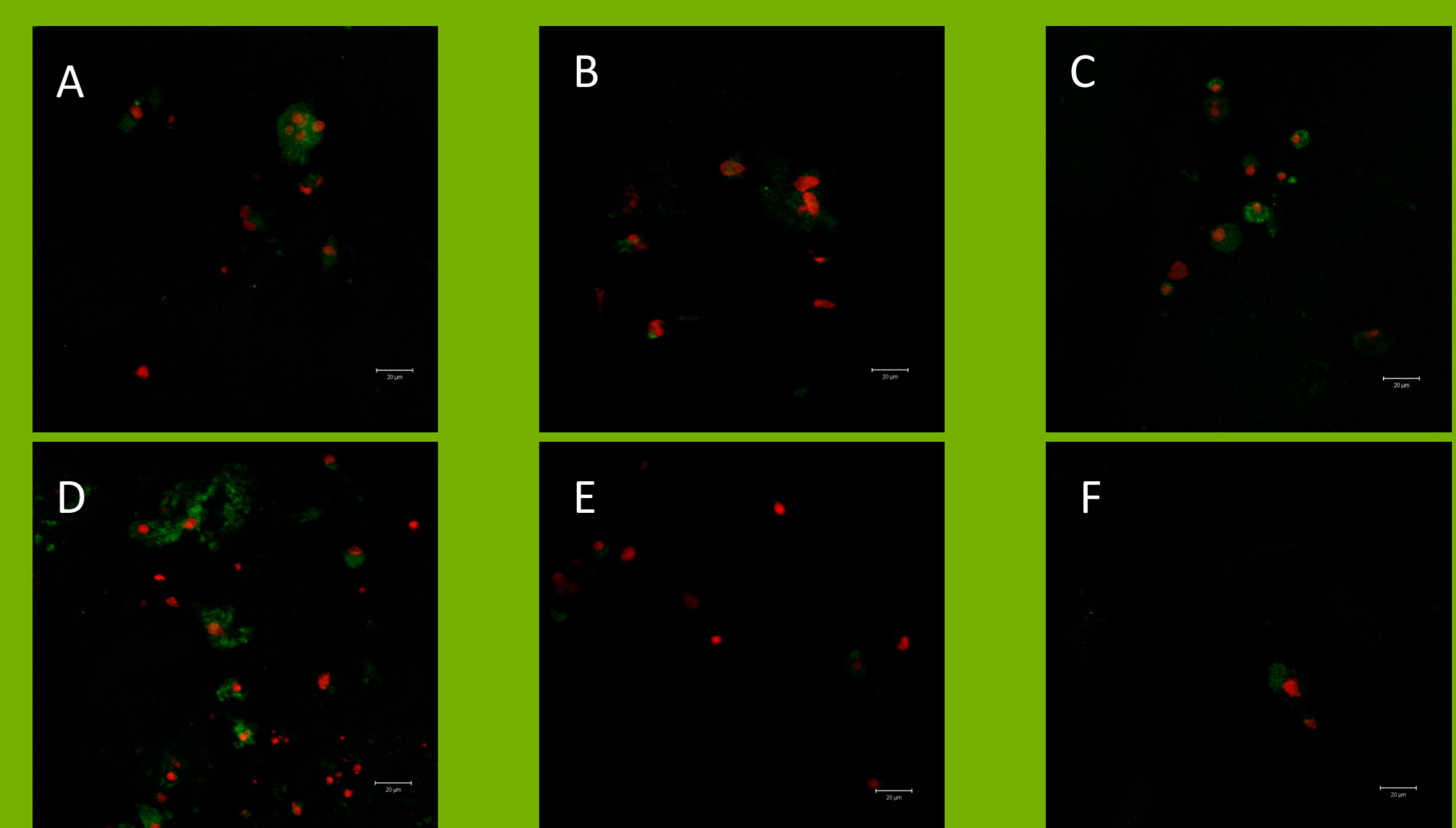
Obr. 3 SEM obrázky nanovláčkových nosičů PCLGF(a), PLUGF(b), SYNGF(c)



Obr. 4 Hodnocení buněčné viability (A) a buněčné proliferace (B) mezenchymálních kmenových buněk na nanovláčkách.



Obr. 5 Imunohistochemické barvení kolagenu II (zelené) a buněčných jader (červené) mezenchymálních kmenových buněk 7. den po nasazení na nosičích PCLGF(a), PLUGF(b), HYAGF(c), SYNGF(d), PLUK(e), PCLK(f). Snímání konfokálním mikroskopem, obj. 20x,zv.2x.



Obr. 6 Imunohistochemické barvení kolagenu II (zelené) a buněčných jader (červené) mezenchymálních kmenových buněk 14. den po nasazení na nosičích PCLGF(a), PLUGF(b), HYAGF(c), SYNGF(d), PLUK(e), PCLK(f). Snímání konfokálním mikroskopem, obj. 20x,zv.2x.

Poděkování

Podpořeno projektem Otevřená věda, Akademie věd České republiky a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy, projekt NPU I: LO1309.

Citace

1. Mickova A, Buzgo M, Benada O, et al.: Biomacromolecules. 2012 Apr 9;13(4):952-62.
2. Batraková EV, Kabanov AV.: J Control Release. 2008 Sep 10;130(2):98-106.