

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALENTINA BERTONCELJ

**RAZVOJ NANOVLAKEN Z RASTNIMI DEJAVNIKI IN NJIHOV
VPLIV NA CELIČNI ODZIV *IN VITRO***

**FORMULATION OF NANOFIBERS WITH GROWTH FACTORS
AND THEIR EFFECT ON CELL RESPONSE *IN VITRO***

Ljubljana, 2013

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek.

Za strokovno pomoč, dosegljivost in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek. Iskrena hvala tudi ostalim članom Katedre za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri raziskovalnemu delu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek.

Valentina Bertoncelj

Komisija za zagovor magistrske naloge:

Predsednik: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Mentorica: doc. dr. Petra Kocbek

Članica: doc. dr. Mojca Kerec Kos

POVZETEK.....	6
SEZNAM OKRAJŠAV.....	8
1 UVOD	9
1.1 RANE IN CELJENJE RAN.....	9
1.1.1 RANE.....	9
1.1.2 OSKRBA RANE.....	9
1.1.2.1 KLASIČNA (SUHA) OSKRBA RANE	9
1.1.2.2 SODOBNA OSKRBA RANE.....	9
1.2 NANOVLAKNA.....	10
1.2.1 IZDELAVA NANOVLAKEN Z ELEKTROSTATSKIM SUKANJEM	10
1.2.2 NANOVLAKNA IN CELJENJE RAN.....	11
1.3 TROMBOCITNI KONCENTRAT	12
1.3.1 PRIPRAVA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA.....	14
1.3.2 KLINIČNA UPORABA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA.....	14
1.4 DOSTAVNI SISTEMI ZA VNOS RASTNIH DEJAVNIKOV PRI REGENERACIJI TKIV	14
2 NAMEN DELA.....	17
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	18
3.1 MATERIALI	18
3.2 APARATURE	19
3.3 GOJENJE CELIC	19
3.3.1 PRIPRAVA MEDIJEV	19
3.3.2 GOJENJE IN PRESAJANJE CELIC	20
3.3.3 DOLOČANJE ŠTEVILSKE KONCENTRACIJE CELIC.....	20
3.4 PRIPRAVA VZORCA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA	21
3.4.1 DOLOČANJE SUHE SNOVI V VZORCU TROMBOCITNEGA KONCENTRATA	21
3.5 IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANOVLAKEN	21
3.5.1 PRIPRAVA RAZTOPIN	21
3.5.1.1 RAZTOPINA CS/PEO	21
3.5.1.2 RAZTOPINA CS/PEO Z DODANIM TROMBOCITNIM KONCENTRATOM	22
3.5.2 IZDELAVA NANOVLAKEN Z ELEKTROSTATSKIM SUKANJEM	22
3.5.3 VREDNOTENJE NANOVLAKEN	22
3.5.3.1 MORFOLOGIJA	22
3.5.3.2 STABILNOST NANOVLAKEN V VODNEM MEDIJU	23
3.5.3.3 VPLIV ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA NA BIOLOŠKO AKTIVNOST TROMBOCITNEGA KONCENTRATA	23

3.5.3.4 VREDNOTENJE SPROŠČANJA PROTEINOV IZ NANVLAKEN	23
3.6 VREDNOTENJE RASTI, MORFOLOGIJE, PREŽIVETJA IN MOBILNOSTI CELIC.....	24
3.6.1 PROLIFERACIJA	24
3.6.1.1 UGOTAVLJANJE VPLIVA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA NA PROLIFERACIJO CELIC ...	24
3.6.1.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA NANVLAKEN NA PROLIFERACIJO CELIC	25
3.6.2 PREŽIVETJE	25
3.6.3 MORFOLOGIJA.....	25
3.6.4 MOBILNOST.....	26
3.6.5 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV	26
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	27
4.1 TROMBOCITNI KONCENTRAT IN NJEGOV VPLIV NA CELIČNO RAST	27
4.1.1 VPLIV TROMBOCITNEGA KONCENTRATA NA KERATINOCITE.....	27
4.1.1.1 PROLIFERACIJA.....	27
4.1.1.2 PREŽIVETJE.....	31
4.1.1.3 MORFOLOGIJA	32
4.1.1.4 MOBILNOST	35
4.1.2 VPLIV TROMBOCITNEGA KONCENTRATA NA FIBROBLASTE.....	37
4.1.2.1 PROLIFERACIJA.....	37
4.1.2.2 PREŽIVETJE.....	40
4.1.2.3 MORFOLOGIJA	41
4.1.2.4 MOBILNOST	44
4.2 LASTNOSTI IZDELALIH NANVLAKEN	46
4.2.1 MORFOLOGIJA.....	46
4.2.2 OBSTOJNOST NANVLAKEN V VODNEM MEDIJU	50
4.2.3 VPLIV ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA NA BIOLOŠKO AKTIVNOST TROMBOCITNEGA KONCENTRATA	50
4.2.4 SPROŠČANJE PROTEINOV IZ NANVLAKEN	51
4.3 VPLIV NANVLAKEN NA ODZIV CELIC	52
4.3.1 VPLIV NANVLAKEN NA KERATINOCITE.....	52
4.3.1.1 PROLIFERACIJA.....	52
4.3.1.2 PREŽIVETJE.....	53
4.3.1.3 MORFOLOGIJA	54
4.3.1.4 MOBILNOST	56
4.3.2 VPLIV NANVLAKEN NA FIBROBLASTE.....	58
4.3.2.1 PROLIFERACIJA.....	58
4.3.2.2 PREŽIVETJE.....	59
4.3.2.3 MORFOLOGIJA	60
4.3.2.4 MOBILNOST	62
5 SKLEP	64
6 LITERATURA	65

7	PRILOGE.....	68
----------	---------------------	-----------

POVZETEK

Kronične rane so vse sekundarno zdravljene rane, ki se ne zacelijo v času osmih tednov. V zadnjih štirih desetletjih se je oskrba teh ran bistveno spremenila. Klasično (suho) oskrbo rane je zamenjal koncept vlažne oskrbe. Tako je bil namen našega dela z metodo elektrostatskega sukanja izdelati sodobno oblogo na osnovi nanomateriala z vgrajenimi rastnimi dejavniki, ki bi se potencialno lahko uporabljala za celjenje kroničnih ran.

Kot vir rastnih dejavnikov smo izbrali trombocitni koncentrat, pri čemer smo najprej ovrednotili njegov učinek na proliferacijo, mobilnost in morfologijo keratinocitov in dermalnih fibroblastov *in vitro*. Ugotovili smo, da trombocitni koncentrat stimulira rast celic in da je njegova optimalna koncentracija v mediju 2 % (v/v). Višje koncentracije so povzročile spremembe morfologije, zmanjšano mobilnost in proliferacijo celic. Ker se je trombocitni koncentrat izkazal kot dober vir rastnih dejavnikov, smo z metodo elektrostatskega sukanja izdelali polimerna nanovlakna iz hitosana in polietilenoksida (50/50, m/m), v katera smo vgradili trombocitni koncentrat, nato pa ovrednotili njihovo morfologijo in obstojnost v vodnem mediju. Ugotovili smo, da se vgrajeni proteini hitro sprostijo iz nanovlaken, kljub temu da ta v vodnem mediju ohranijo svojo strukturo več dni. Poleg tega smo ugotovili, da elektrostatsko sukanje ne vpliva na biološko aktivnost vgrajenih rastnih dejavnikov. V naslednji fazi smo proučili vplive nanovlaken z vgrajenimi rastnimi dejavniki na proliferacijo, preživetje, morfologijo in mobilnost kožnih celic. Ugotovili smo, da se mobilnost celic, ki rastejo na nanovlaknih zmanjša in sicer zaradi njihovega vraščanja med vlakna, a se izboljša v prisotnosti rastnih dejavnikov. V tem primeru so celice bolj razraščene, hkrati pa izražajo tudi večje število celičnih izrastkov. Rezultati biološkega vrednotenja kažejo na sinergistična učinka topografije nanovlaken in rastnih dejavnikov, vgrajenih vanje v obliki trombocitnega koncentrata.

Polimerna nanovlakna z vgrajenim trombocitnim koncentratom, bi se potencialno lahko uporabljala za celjenje kroničnih ran, saj nanofibrilarna struktura oponaša gradnike naravnega zunajceličnega ogrodja, rastni dejavniki trombocitnega koncentrata, pa bi lahko nadomestili fiziološke, potrebne za normalno celjenje, kar bi pospešilo nastajanje zdravega tkiva zaradi stimulacije normalne kaskade regeneracije poškodovanega tkiva.

Ključne besede: oblage za rane, polimerna nanovlakna, elektrostatsko sukanje, rastni dejavniki, trombocitni koncentrat.

ABSTRACT

Chronic wounds are all secondarily treated wounds which do not properly heal in 8 weeks. Therapy of such wounds has been significantly changed in the last four decades. The classical (dry) wound management was replaced by the concept of the moisture one. According to this approach, the aim of our work was to produce a modern nanomaterial wound dressing with incorporated growth factors, produced by electrospinning. Such wound dressing could be potentially used in therapy of chronic wounds. Platelet-rich plasma was chosen as a source of growth factors. Firstly, the *in vitro* effects of platelet-rich plasma on proliferation, mobility and morphology of keratinocytes and dermal fibroblasts were tested. Results showed that platelet-rich plasma stimulates cell growth and that its optimal concentration in medium was 2 % (v/v), while higher concentrations caused alterations in cell morphology, with reduced cell mobility and proliferation. Since platelet-rich plasma was proved to be a suitable source of growth factors, polymer nanofibers with incorporated platelet-rich plasma were produced from chitosan and poly(ethylene oxide) (50/50, w/w). Their morphology was characterized and their stability in aqueous medium was evaluated. The incorporated proteins were burst-released from nanofibers, but the fiber morphology was preserved for some days. Furthermore, results revealed that the electrospinning did not adversely affect the biological activity of platelet-rich plasma. The effects of nanofibers with incorporated platelet-rich plasma on cell proliferation, survival, morphology and mobility were examined. The mobility of cells growing on nanofibers decreased, due to cell penetration between nanofibers, however, it improved after the addition of growth factors. Additionally, growth factors improved cell morphology and increased the number of filopodia. The results of cell assays indicate a synergistic effect of fiber nanotopography and incorporated platelet-rich plasma growth factors.

We believe that nanofibers with incorporated platelet-rich plasma could be used in the therapy of chronic wounds, since they mimic the nanotopography of components of the natural extracellular matrix, while the platelet-rich plasma growth factors can simultaneously efficiently replace natural factors, which are necessary for normal wound healing and tissue regeneration.

Key words: wound dressings, polymer nanofibers, electrospinning, growth factors, platelet-rich plasma.

SEZNAM OKRAJŠAV

CS - hitosan

DMSO - dimetil sulfoksid

ECM - zunajcelično ogrodje (angl. »*extracellular matrix*«)

EGF - epidermalni rastni dejavnik (angl. »*epidermal growth factor*«)

FBS - fetalni goveji serum (angl. »*fetal bovine serum*«)

FGF - fibroblastni rastni dejavnik (angl. »*fibroblast growth factor*«)

IGF - inzulinu podoben rastni dejavnik (angl. »*insulin-like growth factor*«)

MEM - minimalni esencialni medij (angl. »*minimum essential medium*«)

MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij)

NV - nanovlakna

PBS - fosfatni pufer (angl. »*phosphate buffer saline*«)

PDGF - trombocitni rastni dejavnik (angl. »*platelet-derived growth factor*«)

PEO - polietilenoksid

RMA – relativna metabolna aktivnost

SEM - vrstična elektronska mikroskopija (angl. »*scanning electron microscopy*«)

TGF - transformirajoči rastni dejavnik (angl. »*transforming growth factor*«)

TK - trombocitni koncentrat

VEGF - žilni endoteljski rastni dejavnik (angl. »*vascular endothelial growth factor*«)

1 UVOD

1.1 RANE IN CELJENJE RAN

1.1.1 RANE

Rana je odprta poškodba kože in globljega tkiva ali sluznic, nastala zaradi fizikalno-kemijskih dejavnikov kot so delovanje mehanske sile, termičnega dejavnika, kemičnega dejavnika ali električne energije. Glede na čas celjenja, delimo rane na kronične in akutne. Kronične rane so vse sekundarno zdravljene rane, ki se ne zacelijo v času osmih tednov. Nastanejo lahko iz akutnih, zlasti kadar pride do vnetja ali kadar primarna oskrba rane ni bila ustrezna. Zanje je značilna dolga in intenzivna faza vnetja, med katero je povečano nastajanje citokinov, ki vzpodbujajo izražanje proteaz, hkrati pa zavirajo izražanje njihovih inhibitorjev in za celjenje potrebnih rastnih dejavnikov. Stanje še dodatno poslabšujejo reaktivne kisikove spojine, kopičenje nekroznega tkiva in kolonizacija bakterij. Nasprotno pa so v akutni rani vnetni citokini v ravnotežju z njihovimi inhibitorji. V tem primeru torej obstaja ravnotesje med nastajanjem in razgradnjo molekul, kar omogoča ustrezni potek fiziološkega procesa celjenja (1). Proces celjenja rane lahko razdelimo na štiri faze: (I) hemostazo, (II) vnetje, (III) proliferacijo in epitelizacijo ter (IV) zorenje brazgotine. Pri tem ne gre za zaporeden proces, ampak velik del omenjenih faz poteka sočasno (2, 3).

1.1.2 OSKRBA RANE

1.1.2.1 KLASIČNA (SUHA) OSKRBA RANE

Pri klasični oskrbi rane to najprej očistimo, nato pa prekrijemo z gazo, ki je prepojena s fiziološko raztopino ali antiseptiki. Gaza se na rani posuši in novonastalo granulacijsko tkivo se lahko vrašča v njene nitke, zato je vsako prevezovanje boleče, prav tako pa povzroča ponovno poškodbo tkiva. Gaza je tudi slaba bariera za delce, bakterije, izločke in pline, kar je lahko pogosto vzrok za nastanek okužb. Zaradi hitrega sušenja in ohlajanja rane se celjenje upočasni, saj celice in encimi za svoje delovanje potrebujejo vlažno okolje ter optimalno temperaturo (4, 5).

1.1.2.2 SODOBNA OSKRBA RANE

V zadnjih štirih desetletjih se je oskrba ran bistveno spremenila. Klasično tj. suho oskrbo je zamenjal koncept vlažne oskrbe rane. Sodobne obloge namreč omogočajo

vlažno okolje in v rani vzdržujejo telesno temperaturo. To pa sta glavni prednosti v primerjavi s klasičnimi oblogami. S sodobnimi oblogami lahko v rani dosežemo tudi nadzor nad prisotnostjo in vsebnostjo določenih proteoliznih encimov, radikalov, signalnih molekul kot so citokini in rastni dejavniki ter vplivamo na samo stanje v rani, npr. na hipoksijo in kontaminacijo z bakterijami ali njihovimi toksini (4, 6, 7).

Materiale iz katerih so sestavljeni sodobne obloge lahko, glede na njihov izvor delimo na: naravne (celuloza, bombaž, alginat, pektin, hitosan, kolagen) ter sintezne in polsintezne (poliamidi, poliestri, poliuretani, polipropileni, celulozni acetati, polivinilkloridi, akrilati, silikoni) (4). Večinoma so to polimeri, ki lahko kemijsko in/ali fizikalno vežejo vlago oz. izločke iz rane. To je značilnost predvsem hidrofilnih polimerov, ki pri tem nabrekajo in tvorijo gele. Sodobne obloge lahko delimo tudi na: hidrogele, hidrokoloide, pene, alginate in poliuretanske filme (4).

1.2 NANOVLAKNA

Nanovlakna (NV) so vlakna s premeri nanometrskih velikosti in teoretično neomejeno dolžino. Njihovo proučevanje se je v zadnjih letih močno razmahnilo, zato se je povečala tudi njihova uporaba. Zanimiva so za področja, kjer sta pomembna veliko razmerje med površino in volumnom materiala ter velika poroznost. Trenutno so NV v fazah razvoja za uporabo v biomedicini (npr. umetni tkivni nadomestki, tkivno inženirstvo, implantati, dostavnici sistem za vnos zdravilnih učinkovin, obloge za rane), na področju senzorjev, filtracije, sončnih celic, idr. Najpogosteje metoda izdelave NV je elektrostatsko sukanje (angl. »*electrospinning*«) (8, 9).

1.2.1 IZDELAVA NANOVLAKEN Z ELEKTROSTATSKIM SUKANJEM

Elektrostatsko sukanje je metoda, ki omogoča izdelavo dolgih vlaken z nanometrskim premerom ob uporabi visoke električne napetosti. Naprava za elektrostatsko sukanje je sestavljena iz treh glavnih delov (Slika 1):

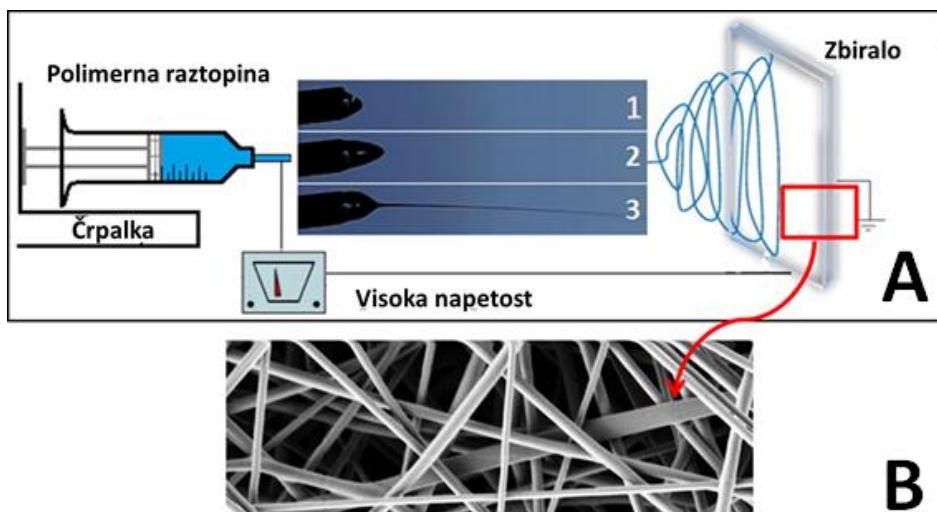
- generatorja, ki ustvarja visoko napetost,
- injekcijske brizge s kovinsko iglo in
- prevodnega ozemljenega zbirala na katerem se nabira produkt elektrostatskega sukanja (10).

Pri elektrostatskem sukanju uporabljamo za nastanek električno nabitega curka raztopine polimera izvor visoke napetosti. Konstanten pretok polimerne raztopine

zagotovimo s črpalko, gravitacijsko silo ali s stisnjениm zrakom. Ko na kapljico polimerne raztopine apliciramo napetost, ta dobi naboj. Ko elektrostatske odbojne sile premagajo sile površinske napetosti, se kapljica preoblikuje v Taylorjev stožec, ta pa naprej v curek, ki potuje proti ozemljenemu zbiralu (Slika 1A). Med potovanjem curka topilo izhlapi, na zbiralu pa se nabirajo posušena NV (Slika 1B) (10, 11, 12).

Izdelava NV z elektrostatskim sukanjem je zaradi vpliva številnih parametrov zelo kompleksen proces. Na njihovo izdelavo tako vplivajo:

- lastnosti polimerne raztopine (narava, koncentracija, molekulska masa in porazdelitev molekulske mase polimera, viskoznost in prevodnost raztopine, hlapnost topila),
- procesni parametri (aplicirana napetost, pretok polimerne raztopine, razdalja med konico igle in zbiralom, vrsta zbirala) in
- dejavniki okolja (relativna vlaga in temperatura) (13).



Slika 1: Shema procesa elektrostatskega sukanja (A) in NV slikana z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (B). Fotografije 1, 2 in 3 prikazujejo razvoj curka iz kapljice polimerne raztopine (1-kapljica, 2-Taylorjev stožec, 3-curek).

1.2.2 NANOVLAKNA IN CELJENJE RAN

NV so zaradi svojih lastnosti primerna za oblikovanje sodobnih oblog za rane. Izdelamo jih lahko iz različnih vrst biokompatibilnih polimerov, ki jim dajejo različne mehanske lastnosti in hitrosti razgradnje, to pa pomembno vpliva na njihove interakcije s celicami. Glavna prednost NV je njihova strukturna podobnost z naravnim zunajceličnim ogrodjem (ECM), zato spodbudijo celično rast in obnovo tkiv. Dodatna prednost je tudi

ta, da nam metoda elektrostatskega sukanja omogoča izdelavo NV iz materialov, ki so sestavine naravnega ECM, poleg tega pa še vgrajevanje različnih zdravilnih učinkovin, tudi biomolekul kot so proteini. Poleg uporabe NV za sodobne obloge, so ta primerna tudi za izdelavo tkivnih nadomestkov, saj so zaradi svoje edinstvene nanofibrilarne strukture sposobna učinkovito posnemati kompleksno biokemijsko in struktorno okolje, kateremu so celice izpostavljene v zdravem tkivu. Gradniki naravnega ECM, kot so kolagenska, elastinska in keratinska vlakna, so večinoma nanometrskih dimenzij (12). Ker je obnašanje celic močno pogojeno tudi z okoljem v katerem rastejo (npr. podlaga), je pomembno, da s tkivnimi nadomestki v čim večji meri posnemamo strukturo in velikosti gradnikov naravnega ECM. Ustrezni tkivni nadomestki iz NV morajo morfološko in kemijsko oponašati naravne tkivne komponente, omogočati 3D razraščanje celic in tako celicam zagotavljati kompleksen skupek kemijskih ter fizikalnih signalov, ki vodijo v učinkovito regeneracijo poškodovanega tkiva (14, 15). Rezultati dosedanjih raziskav kažejo, da na rast, diferenciacijo, funkcijo in morfologijo celic na površinah biomaterialov najbolj vplivajo naslednji dejavniki:

- adsorpcija serumskih sestavin,
- sestava ECM, ki ga izločajo celice, medtem ko rastejo na biomaterialu,
- adhezijske molekule, ki so izražene na celicah in
- citoskeletalni mehanizmi (16).

S spremenjanjem narave površine NV lahko dosežemo selektivno adsorpcijo proteinov, pri tem pa v splošnem velja, da večja kot je površina NV, večja bo adsorpcija proteinov. Pomembne so tudi interakcije med NV in celicami, saj so lahko lastnosti celic, ki rastejo na NV, odvisne od morfologije vlaken (16). Celični odziv na NV pa ni odvisen le od njihovih morfoloških lastnosti (premer, trdnost), ampak tudi od kemijskih lastnosti (narava polimera), ki jih lahko dodatno modificiramo s površinsko vezavo specifičnih molekul ali pa z vgrajevanjem biološko aktivnih snovi vanje. Te snovi se nato sproščajo iz NV in tako vplivajo na celični odziv. Primer takih biološko aktivnih snovi so rastni dejavniki, pridobljeni iz različnih virov, npr. iz trombocitnega koncentrata (TK) (14, 15).

1.3 TROMBOCITNI KONCENTRAT

TK je frakcija krvi, ki vsebuje visoko koncentracijo trombocitov in rastnih dejavnikov v zelo majhnem volumnu plazme. Koncentracija trombocitov je v njem 3 do 5-krat višja

kot v krvi. TK vsebuje vsaj osem različnih rastnih dejavnikov, vključno s trombocitnim rastnim dejavnikom (PDGF), transformirajočim rastnim dejavnikom (TGF), inzulinu podobnim rastnim dejavnikom (IGF), žilnim endotelijskim rastnim dejavnikom (VEGF), osnovnim fibroblastnim rastnim dejavnikom (bFGF) in epidermalnim rastnim dejavnikom (EGF) (17, 18). Njihovi učinki so predstavljeni v Tabeli 1.

Tabela 1: Rastni dejavniki prisotni v TK in njihova funkcija (17).

Rastni dejavnik	Mesto delovanja - tarčne celice/tkivo	Funkcija
EGF	Žilne celice, celice kože	Rast celic, kemotaktično delovanje
	Fibroblasti, druge celice	Diferenciacija celic, spodbujanje izločanja citokinov, zapiranje rane
PDGF	Fibroblasti, gladke mišične celice, hondrociti, osteoblasti, mezenhimske izvorne celice	Spodbujanje celične rasti, kemotaktično delovanje, spodbujanje angiogeneze in rasti granulacijskega tkiva
TGF	Celice žilne stene, celice kože	Sinteza kolagena
	Fibroblasti, monociti	Zaviranje rasti celic, apoptoza
	Osteoblasti	Diferenciacija, aktivacija celic
IGF	Kosti, celice žilne stene, koža, druga tkiva	Rast in diferenciacija celic, kemotaktično delovanje
	Fibroblasti	Spodbujanje sinteze kolagena
VEGF	Celice žilne stene	Rast in migracija celic, angiogeneza, zaviranje apoptoze
bFGF	Žile, gladke mišične celice, koža	Rast celic
	Fibroblasti, druge celice	Migracija celic, angiogeneza

Trombociti imajo ključno vlogo pri hemostazi, medtem ko rastni dejavniki pomembno vplivajo na različne faze celjenja ran in regenerativne procese, npr. na kemotakso, proliferacijo, diferenciacijo in angiogenezo. Trombociti proizvajajo in izločajo tudi številne druge snovi, ki so pomembne za celjenje ran, npr. fibronektin, vitronektin in sfingozin 1-fosfat. Prednost uporabe TK kot vira različnih rastnih dejavnikov, v primerjavi z uporabo posameznih rastnih dejavnikov je posnemanje dejanskega dogajanja *in vivo*. Trombociti namreč ob aktivaciji sprostijo več različnih rastnih dejavnikov. Celjenje ran ob uporabi TK naj bi bilo 2-3-krat hitrejše kot normalno, pri čemer zdravljenje z avtolognim TK izključuje tveganje za pojav imunskih reakcij in prenos bolezni. Po drugi strani pa obstaja teoretična nevarnost, da bi s TK vnešeni rastni dejavniki lahko spodbudili kancerogenezo, oz. da bi prevelika izpostavitev matičnih celic rastnim dejavnikom povzročila njihovo nepopolno in/ali nepravilno diferenciacijo.

Kljub takim pomislikom pa večina raziskav kaže, da je uporaba TK povsem varna (19, 20).

1.3.1 PRIPRAVA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA

Pri odvzemu dodajo krvi citrat, ki veže Ca^{2+} ione in s tem prepreči kaskado strjevanja krvi. Kri nato centrifugirajo, da se sestavine porazdelijo v 3 plasti: (I) s trombociti revna plazma (angl. »*platelet poor plasma*«), (II) TK ali s trombociti bogata plazma (angl. »*platelet rich plasma*«) in (III) plast eritrocitov. Običajno poteka centrifugiranje v dveh korakih. S prvim, pri višjih obratih (angl. »*hard spin*«) ločijo s trombociti revno plazmo od eritrocitov in TK. Z drugim, pri nižjih obratih (angl. »*soft spin*«), pa ločijo eritrocite od TK (17).

1.3.2 KLINIČNA UPORABA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA

Formulacije s TK so zanimive za uporabo predvsem na področju celjenja ran, dentalne medicine in medicine športa ter veterine, z namenom, da bi z njihovo uporabo spodbudili regeneracijo mehkega in/ali kostnega tkiva ter pospešili zdravljenje okužb (14, 17, 18). V kliničnih raziskavah se TK najpogosteje uporablja v obliki injekcij (17), intenzivno pa raziskujejo tudi druge dostavne sisteme (21). Večina formulacij je zasnovana na osnovi dostavnih sistemov, ki so jih razvili za vnos posameznih rastnih dejavnikov.

1.4 DOSTAVNI SISTEMI ZA VNOS RASTNIH DEJAVNIKOV PRI REGENERACIJI TKIV

Rastni dejavniki so proteini, ki vplivajo na različne celične procese, pomembne za regeneracijo tkiv (22). Zanimivi so za uporabo v tkivnem inženirstvu, pri čemer pa za njihovo uspešno klinično aplikacijo potrebujemo ustrezni dostavni sistem. Vse klinično odobrene oblike zdravljenja, ki vključujejo rastne dejavnike, temeljijo na uporabi biokompatibilnih nosilcev, ki so ključnega pomena za doseganje terapevtskega učinka.

Pri razvoju dostavega sistema z rastnimi dejavniki je potrebno izbrati primeren material in ustrezni postopek vgrajevanja rastnih dejavnikov (23). Najbolj razširjeni dostavni sistemi so: 3D-ogrodja, hidrogeli in partikularni nosilci. Najbolj uveljavljene metode vgrajevanja rastnih dejavnikov so: njihovo vključevanje (ujetje) v nosilec ali ogrodje med njegovo izdelavo ter adsorpcija in kovalentna vezava na že izdelan nosilec/ogrodje.

Za pripravo dostavnih sistemov se uporabljo biokompatibilni materiali naravnega ali sinteznega izvora. Za dostavo rastnih dejavnikov se najpogosteje uporabljo naravni materiali, kot so: kolagen, želatina, alginat, agarosa, hialuronska kislina, fibrin in elastin. Med sinteznimi materiali pa se najpogosteje uporabljo polimlečna kislina, poliglikolna kislina, kopolimer mlečne in glikolne kisline, polietilenoksid (PEO) in polikaprolakton (22).

1.4.1. 3D-OGRDJAJA

Glavna prednost uporabe 3D-ogrodij v regenerativni medicini je ta, da omogočajo sočasno dostavo različnih rastnih dejavnikov in nudijo fizično oporo za rast novega tkiva, tj. omogočajo pritrjanje, proliferacijo in vraščanje celic. 3D-ogrodja lahko izdelamo z različnimi metodami, kot so: vlivanje raztopin in talin polimerov, liofilizacija, fazna separacija ter polimerizacija *in situ*. Rastne dejavnike lahko vgradimo v 3D-ogrodje z adsorpcijo ali z vključevanjem v ogrodje med samo izdelavo. Ker imajo vsa 3D-ogrodja veliko specifično površino, je za takšne sisteme značilno hipno sproščanje (angl. »burst release«) vgrajenih proteinskih molekul, kar pa je v večini primerov neželjeno. Takojošnjemu sproščanju rastnih dejavnikov se lahko izognemo z njihovo kovalentno vezavo na 3D-ogrodje (22, 24).

V terapiji se trenutno že uporablja 3D-ogrodje iz kolagena z vgrajenim kostnim morfogenim proteinom 2 (INFUSE[®]-BMP-2) za zdravljenje zlomov dolgih kosti in regeneracijo medvretenčnih ploščic. Za zdravljenje medvretenčne fuzije pa se uporablja 3D-ogrodje iz kolagena z vgrajenim kostnim morfogenim proteinom 7 (OP-1TM Putty). Kot kostni nadomestek pa je na voljo 3D-ogrodje na osnovi β-trikalcijevega fosfata, z vgrajenim PDGF (AugmentTM Bone Graft) (22).

1.4.2 HIDROGELI

Hidrogeli za razliko od 3D-ogrodij ne nudijo mehanske opore za rast celic, vendar pa za razliko od 3D-ogrodij za njihovo uporabo ni potreben kirurški poseg, ki predstavlja določeno tveganje za bolnika. Hidrogele namreč lahko injiciramo na tarčno mesto, saj so zaradi visoke vsebnosti vode fleksibilni in brez težav zapolnijo prizadeto območje. Prav tako kot v primeru 3D-ogrodij so tudi v hidrogelu rastni dejavniki lahko mehansko ujeti ali kovalentno vezani na njegove gradnike (22).

V terapiji se že uporablja hidrogel karboksimetilceluloze z vgrajenim PDGF (REGRANEX®) za zdravljenje diabetičnih razjed spodnjih okončin (22). Za zdravljenje peridontitisa pa je v predkliničnih raziskavah gel hidroksipropilceluloze z vgrajenim FGF (25).

1.4.3 PARTIKULARNI NOSILCI

V to skupino dostavnih sistemov spadajo mikro- in nanodelci. Partikularni nosilci omogočajo različne načine vnosa in boljše prodiranje v obolenlo mesto kot v primeru 3D-ogrodij in hidrogelov (21).

Danes raziskujejo različne nanodelce z vgrajenimi rastnimi dejavniki (22), npr. porozne silicijeve nanodelce s FGF (26), magnetne nanodelce s FGF (27) ter hitosanske nanodelce z vgrajenim hepatocitnim rastnim dejavnikom (28). V zadnjem obdobju so zelo aktualne tudi raziskave kombinacij partikularnih dostavnih sistemov in hidrogelov, ki omogočajo različne profile sproščanja ter vgrajevanje različnih rastnih dejavnikov (22, 29, 30). Podatkov, da bi se partikularni sistemi ali kombinacije partikularnih dostavnih sistemov in hidrogelov že klinično uporabljali, pa v literaturi nismo zasledili.

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je s postopkom elektrostatskega sukanja izdelati polimerna NV z vgrajenimi rastnimi dejavniki iz TK ter ovrednotiti njihovo ustreznost za izdelavo sodobnih oblog za celjenje ran in uporabo v tkivnem inženirstvu.

Prvi cilj naloge bo ovrednotenje vpliva TK na rast in morfologijo kožnih celic. V ta namen bomo izbrali celični liniji keratinocitov in dermalnih fibroblastov, saj je naš cilj pripraviti NV za uporabo pri celjenju kožnih ran. Ugotavliali bomo vplive TK na preživetje, proliferacijo, morfologijo in mobilnost celic ter določili, katera koncentracija TK je optimalna za celično rast.

Drugi cilj naloge bo izdelava polimernih NV z vgrajevanjem odtaljenega TK, pri čemer bomo poskusili vgraditi čim večjo količino. Kot osnovni polimer za izdelavo NV bomo izbrali CS, saj je biokompatibilen, biorazgradljiv in deluje antibakterijsko, zaradi slabe vodotopnosti pa bo zagotavljal tudi večjo obstojnost NV v vodnem mediju. Ker pa je glede na predhodne raziskave, elektrostatsko sukanje same raztopine CS težavno, ji bomo dodali PEO, ki je enostaven za elektrostatsko sukanje, prav tako pa je biokompatibilen in biorazgradljiv. S spremjanjem procesnih parametrov elektrostatskega sukanja bomo, ob konstantnih parametrih okolja, izdelali NV z in brez vgrajenega TK ter jih ovrednotili s pomočjo SEM analize. Da bomo lahko ocenili, kako hitro se vgrajeni rastni dejavniki sproščajo iz NV, bomo izvedli ustrezen test sproščanja proteinov. Ovrednotili bomo tudi vpliv elektrostatskega sukanja na biološko aktivnost sestavin TK ter tako proučili smiselnost njihovega vgrajevanja v NV med samim postopkom elektrostatskega sukanja.

Tretji cilj naloge bo ovrednotenje bioloških odzivov celičnih linij keratinocitov in dermalnih fibroblastov na NV z in brez vgrajenega TK *in vitro*. Tako bomo proučili vplive samih polimerov, nanotopografije vlaken ter vgrajenih rastnih dejavnikov na celični odziv. V ta namen bomo s pomočjo invertne svetlobne in fluorescenčne mikroskopije ter spektroskopije vrednotili proliferacijo, preživetje, morfologijo in mobilnost celic.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

- Trije vzorci TK, pripravljeni na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija, pridobljeni iz polne krvi krvodajalcev (zlitje, odstranjeni levkociti, obdelani s psoralenom):
 - 370 ml TK iz krvi krvne skupine AB, Rh D pozitivna,
 - 345 ml TK iz krvi krvne skupine A, Rh D negativna (Slika 2) in
 - 355 ml TK iz krvi krvne skupine AB, Rh D negativna.
- Polietilenoksid (MM 900.000 g/mol, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Hitosan (Nizkomolekularni, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Triton® X-100 (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- DMSO (čistota \geq 99,9 % Merck, Nemčija)
- Brezvodna ocetna kislina (Merck, Nemčija)
- Destilirana voda (Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- Okrogla stekelca premera 5, 15 in 30 mm ter krovna stekelca (20 x 20 mm) (Thermo Scientific, Nemčija)
- Plošče s 6, 12 in 96 vdolbinami ter plostenke za gojenje celic (TPP, Švica)
- Celična linija človeških keratinocitov (NCTC2544, ICLC, Univerza v Genovi, Italija)
- Celična linija človeških dermalnih fibroblastov (149BR, Health Protection Agency, Velika Britanija)
- Minimalni esencialni medij (MEM, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Fetalni goveji serum (Gibco®, Invitrogen, ZDA)
- Neesencialne aminokisline (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Glutamin (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Antibiotik/antimikotik (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Sestavine za izdelavo fosfatnega pufra s pH 7,4: NaCl (Merck, Nemčija), KCl (Merck, Nemčija), Na₂HPO₄·12H₂O (Merck, Nemčija), KH₂PO₄ (Merck, Nemčija) in HCl (Merck, Nemčija)
- Tripansko modrilo (Trypan Blue 0,25 %, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Tripsin (Sigma-Aldrich, Nemčija)

- Reagent MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) (Cell Titer 96® Aqueous One Solution cell Proliferation Assay, Promega, Madison, ZDA)
- Barvili Hoechst 33342 (Riedel de Haen, Nemčija) in Faloidin-tetrametilrodamin B izotiocianat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Bradfordov reagent (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.2 APARATURE

- Aparatura za elektrostatsko sukanje:
 - Plastična brizga, 20 ml (B-Braun, ZDA)
 - Kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm (Linari Engineering, Italija)
 - Črpalka (R-99E, RazelTM, Italija)
 - Generator visoke napetosti (HVG-P60-R-EU, Linari Engineering, Italija)
 - Planarno zbiralo
- Čitalec mikrotitrskih ploščic Safire™ (Tecan, Švica)
- Precizna tehtnica XS205 (Mettler Toledo, ZDA)
- Liofilizator Beta 1-8K (Christ, Nemčija)
- Tehtnica EB-1200C (Tehtnica, Slovenija)
- Magnetno mešalo (IKA®, Nemčija)
- SEM (Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija)
- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka (Iskra Pio, Slovenija)
- Invertni svetlobni mikroskop CKX41 (Olympus, Japonska)
- Fotoaparat (Olympus, Japonska)
- Centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- Neubauerjeva komora (Brand, Nemčija)
- Inkubator za celične kulture (Sanyo, Japonska)

3.3 GOJENJE CELIC

3.3.1 PRIPRAVA MEDIJEV

Keratinocite smo gojili v mediju MEM, z dodatkom 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) neesencialnih aminokislin (cistein, tirozin in glutamin), 2 mM L-glutamina in 100 U/ml antibiotika/antimikotika. Za gojenje fibroblastov smo uporabljali MEM, z dodatkom

15 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) neesencialnih aminokislin (cistein, tirozin in glutamin), 2 mM L-glutamina in 100 U/ml antibiotika/antimikotika. V primeru gojenja keratinocitov in fibroblastov v mediju brez FBS smo delež FBS v osnovni recepturi nadomestili z MEM.

3.3.2 GOJENJE IN PRESAJANJE CELIC

Celice smo gojili v gojitvenih plastenkah ($S = 75 \text{ cm}^2$), v ustreznem, zgoraj opisanem mediju. Ko so celic prerasle ~70 % površine platenke, smo jih naselili v nove platenke s svežim medijem tako, da smo iz platenke s celicami najprej odlili medij in celice 2-krat sprali s po 1,5 ml PBS. Nato smo dodali 1 ml raztopine tripsina in počakali, da so se celice ločile od podlage. Dodali smo 4 ml medija za gojenje celic, da smo inaktivirali tripsin, ter celično suspenzijo prenesli v 15 ml centrifugirko, ki smo jo centrifugirali 5 min pri 1300 vrtljajih/min. Supernatant smo zavrgli, celični sediment pa resuspendirali v ustreznem volumnu svežega medija. Celično suspenzijo smo prenesli v sveže gojitvene platenke, v katere smo že predhodno odpipetirali po 12 ml svežega medija, tako da je bila končna gostota naselitve celic 3500 celic/cm^2 . Platenke smo inkubirali pri 37°C in 5 % CO_2 v zraku do ~70 % preraščenosti.

3.3.3 DOLOČANJE ŠTEVILSKE KONCENTRACIJE CELIC

Ko smo celice tripsinizirali in pripravili njihovo homogeno suspenzijo iz nastalega sedimenta po centrifugiranju, smo $10 \mu\text{L}$ le-te odpipetirali in ji dodali $10 \mu\text{L}$ raztopine tripanskega modrila, ki selektivno obarva mrtve celice. Nato smo vzorec nanesli na Neubauerjevo komoro in s štetjem pod svetlobnim mikroskopom določili številsko koncentracijo živih in mrtvih celic v vzorcu. Iz dobljenih podatkov smo izračunali (Enačba 1) delež živih celic v vzorcu.

$$N = \frac{(n_1+n_2+n_3+n_4)}{4} \times 10^4 \times F \quad \text{Enačba 1}$$

Nštevilo celic na ml vzorca

n_ištevilo celic v posameznem kvadratu hemocitometra

Ffaktor redčenja

3.4 PRIPRAVA VZORCA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA

Vzorec TK, ki smo ga uporabili v naših raziskavah kot vir rastnih dejavnikov, smo pripravili tako, da smo tri sveže vzorce TK različnih donorjev (Slika 2) združili in dobro premešali, da smo dobili homogeno mešanico. To smo nato razdelili na manjše alikvote in jih zamrznili na -80 °C. Vzorce TK smo pred uporabo odtalili, saj so v predhodnih raziskavah, kjer so primerjali vpliv svežega, liofiliziranega in zmrznenega TK na rast celične linije keratinocitov, ugotovili, da rast celic najbolj stimulira prav slednji (31, 34).



Slika 2: Vzorec TK.

3.4.1 DOLOČANJE SUHE SNOVI V VZORCU TROMBOCITNEGA KONCENTRATA

V 5 predhodno stehtanih epruvetk smo odpipetirali po 1 ml svežega TK, zamrznili pri -80 °C in liofilizirali (0,090 mbar, sobna temperatura, 24 h). Po končani liofilizaciji smo epruvetke ponovno stehtali in nato iz razlike mas po in pred liofilizacijo določili maso suhe snovi v 1 ml TK. Na enak način smo ugotavljali tudi vsebnost suhe snovi v FBS.

3.5 IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANOVLAKEN

3.5.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

3.5.1.1 RAZTOPINA CS/PEO

Polimerno raztopino zmesi CS/PEO 50:50 (m/m) smo pripravili iz 2 % (m/m) raztopine CS in 3 % (m/m) raztopine PEO, ki smo ju pripravili ločeno z raztopljanjem polimerov v 3 % (v/v) ocetni kislini. To smo pripravili z redčenjem brezvodne ocetne kisline. Raztopini smo ločeno mešali 3 h, da sta se polimera popolnoma raztopila, nato pa ju združili tako, da smo v končni raztopini dobili enaka masna deleža obeh polimerov. Dodali smo še Triton® X-100 (0,3 %, m/v) in DMSO (10 %, v/v) ter raztopino mešali na magnetnem mešalu še nadaljnji 2 h.

3.5.1.2 RAZTOPINA CS/PEO Z DODANIM TROMBOCITNIM KONCENTRATOM

Polimerno raztopino zmesi CS in PEO smo pripravili iz 2,0 % oz. 2,5 % (m/m) raztopine CS in 3,0 % oz. 3,5 % (m/m) raztopine PEO, ki sta bili pripravljeni ločeno z raztopljanjem polimerov v 3 % (v/v) ocetni kislini. Raztopini smo mešali 3 h, da sta se polimera popolnoma raztopila, nato pa smo ju združili v razmerju CS/PEO 60:40, (m/m) in dodali Triton® X-100 (0,3 %, m/v) ter DMSO (10 %, v/v). Končno raztopino smo mešali še 2 h nato pa ji dodali različne količine TK:

- 1.) 250 µl TK k 4,75 g raztopine zmesi CS/PEO ($w_{(TK)} = 7,9 \%$)
- 2.) 500 µl TK k 4,5 g raztopine zmesi CS/PEO ($w_{(TK)} = 15,2 \%$)
- 3.) 1000 µl TK k 4,0 g raztopine zmesi CS/PEO ($w_{(TK)} = 28,8\%$)
- 4.) 141 mg liofilizata TK k 4,5 g raztopine zmesi CS/PEO ($w_{(TK)} = 52,3 \%$).

3.5.2 IZDELAVA NANOVLAKEN Z ELEKTROSTATSKIM SUKANJEM

Plastično brizgo, 20 ml, smo napolnili s polimerno raztopino in nanjo namestili kovinsko iglo. Brizgo smo vpeli v črpalko, ki zagotavlja stalen pretok raztopine med elektrostatskim sukanjem. Visoko napetost, ki jo proizvaja generator visoke napetosti, smo priključili na konico igle. Kot zbiralo smo uporabili ploščato plastično stojalo, prevlečeno z aluminijasto folijo. Procesni parametri pri izdelavi NV brez TK so bili: pretok polimerne raztopine 0,6 ml/h; razdalja med konico igle in zbiralom 18 cm; napetost 20 kV. Pri izdelavi NV z vgrajenim TK pa smo testirali različne vrednosti procesnih parametrov s ciljem izdelati NV brez vozlov. Pretok polimerne raztopine smo spremenjali od 1,6 ml/h do 2,67 ml/h, razdaljo od 15,0 cm do 19,5 cm in napetost od 18,25 kV do 25 kV. V komori za elektrostatsko sukanje smo ves čas vzdrževali konstantno relativno vlažnost (33–34 %) in temperaturo (26–28 °C).

Za vrednotenje celičnega odziva *in vitro* smo NV elektrostatsko sukali na različno velika okrogla krovna stekelca (premeri 5, 15 ali 30 mm), ki smo jih s prevodnim trakom pritrtili na aluminijasto folijo zbirala. Velikost krovnih stekelc, ki smo jih uporabili v posameznem poskusu, se je prilegala velikosti vdolbinic gojitvenih plošč.

3.5.3 VREDNOTENJE NANOVLAKEN

3.5.3.1 MORFOLOGIJA

Morfologijo izdelanih NV smo vrednotili s SEM. Vzorce NV, zbrane na aluminijasti foliji smo z dvostranskim prevodnim trakom prilepili na kovinske nosilce. Slike vzorcev

smo posneli pri pospeševalni napetosti 1 kV in z uporabo sekundarnega detektorja. Povprečni premer NV smo določili s programom ImageJ tako, da smo posameznemu vzorcu izmerili premer 30-im naključno izbranim NV.

3.5.3.2 STABILNOST NANOVLAKEN V VODNEM MEDIJU

Vzorce NV smo inkubirali v fosfatnem pufru (pH 7,4) 72 h, jih posušili pri sobnih pogojih in pripravili vzorce za SEM analizo.

3.5.3.3 VPLIV ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA NA BIOLOŠKO AKTIVNOST TROMBOCITNEGA KONCENTRATA

Da bi preverili vpliv elektrostatskega sukanja na biološko aktivnost proteinov v TK, smo brizgo napolnili s samim TK in ga izpostavili procesnim parametrom, ki smo jih uporabljali za pripravo NV z vgrajenim TK. TK, ki smo ga uspeli zbrati na zbiralu, smo postrgali, stehtali in pripravili vodne raztopine TK z enakimi masnimi koncentracijami, kot smo jih že predhodno testirali na celicah (predhodno zamrznjeni TK). Vpliv elektrostatskega sukanja na biološko aktivnost celic smo vrednotili tako, da smo primerjali relativno metabolno aktivnost (RMA) keratinocitov, ki so bili izpostavljeni TK, ki smo ga predhodno izpostavili pogojem elektrostatskega sukanja, s tisto RMA keratinocitov, ki smo jo izmerili ob izpostavitvi enakim koncentracijam predhodno samo zamrznjenega TK.

3.5.3.4 VREDNOTENJE SPROŠČANJA PROTEINOV IZ NANOVLAKEN

Za vrednotenje sproščanja proteinov iz NV smo izbrali metodo po Bradfordu, z uporabo barvila Coomassie modro. V ta namen smo z zbirala v epruvetko prenesli približno 17 mg NV z vgrajenim TK in jim dodali 1,5 ml PBS. V vsaki izbrani časovni točki (10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 24 h) smo nato odvzeli po 10 µl vzorca, ki smo mu dodali po 300 µl reagenta. Po 10 min inkubiranja pri sobni temperaturi smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic izmerili absorbanco vzorca pri 595 nm (32). Količino sproščenih proteinov smo določili s pomočjo umeritvene premice, ki smo jo pripravili v koncentacijskem območju od 8 do 939 µg liofilizata TK na ml PBS (pH 7,4) (Priloga-Slika P1).

3.6 VREDNOTENJE RASTI, MORFOLOGIJE, PREŽIVETJA IN MOBILNOSTI CELIC

3.6.1 PROLIFERACIJA

Celično rast (proliferacijo) smo posredno kvantitativno ovrednotili z določanjem metabolne aktivnosti celic s testom MTS. Test temelji na aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze, ki reducira reagent MTS v rdeče obarvan produkt. To pretvorbo omogočajo NADPH- ali NADH-dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah. Koncentracijo nastalega produkta smo določili spektrofotometrično, in sicer pri valovni dolžini 490 nm, s čitalcem mikrotitrskih ploščic. RMA celic smo izračunali s pomočjo Enačbe 2:

$$RMA = \frac{A_{vzorca\ s\ celicami} - A_{vzorca\ brez\ celic}}{A_{medija\ s\ celicami} - A_{medija\ brez\ celic}}$$
 Enačba 2

3.6.1.1 UGOTAVLJANJE VPLIVA TROMBOCITNEGA KONCENTRATA NA PROLIFERACIJO CELIC

V posamezno vdolbinico mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali po 80 µl suspenzije celic (4000 celic) v mediju brez FBS. V tiste vdolbinice, ki so predstavljale ozadje (tj. vzorec brez celic), smo odpipetirali le po 80 µl medija brez FBS. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 24 h, da so se celice pritrstile na podlogo, in jim nato dodali po 20 µl ustrezeno razredčenega vzorca TK (TK smo razredčili z medijem brez FBS) tako, da so bile končne koncentracije TK s katerimi so bile celice v stiku: 0,000, 0,024 (0,05 %, v/v), 0,047 (0,1 %, v/v), 0,118 (0,25 %, v/v), 0,235 (0,5 %, v/v), 0,470 (1 %, v/v), 0,940 (2 %, v/v), 2,350 (5 %, v/v), 4,700 (10 %, v/v) in 7,050 (15 %, v/v) mg/ml, poleg tega smo določenim celičnim kulturam dodali po 20 µl ustrezeno razredčenega FBS, tako da je bila njegova koncentracija 10 % (v/v) (keratinociti) oz. 15 % (v/v) (fibroblasti). Zaradi lažjega sledenja rezultatom, bomo v nadaljevanju koncentracijo TK v rastnem mediju namesto v mg suhe snovi TK na ml medija (m/v, %), podajali v ml TK na ml medija (v/v, %).

RMA smo nato določili 24, 48 in 72 h po dodatku vzorca TK k celicam tako, da smo v vsako vdolbinico mikrotitrsko ploščo dodali po 10 µl reagenta MTS ter inkubirali 2 h pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku. S čitalcem mikrotitrskih ploščic smo izmerili absorbanco vzorca pri 490 nm ter izračunali RMA (Enačba 2).

3.6.1.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA NANOVLAKEN NA PROLIFERACIJO CELIC

V ta namen smo uporabili NV elektrostatsko sukana na okrogla krovna stekelca premera 5 mm. Krovna stekelca z NV smo prenesli na dna vdolbinic mikrotitrskih plošč in nanje previdno odpipetirali bodisi po 80 µl suspenzije celic v mediju brez FBS (4000 celic/vdolbinico), ali po 80 µl medija brez FBS (ozadje oz. vzorec brez celic). Nato smo, v primeru testiranja samih (praznih) NV, v vsako vdolbinico dodali po 20 µl ustrezno razredčenega vzorca TK ali po 20 µl ustrezno razredčenega FBS ali pa po 20 µl medija brez FBS. V primeru testiranja NV z vgrajenim TK pa smo v vsako vdolbinico dodali po 20 µl medija brez FBS.

RMA smo določili po 24, 48 in 72 h tako, da smo v vsako vdolbinico dodali po 10 µl reagenta MTS in inkubirali 2 h pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku. Nato smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic izmerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm in izračunali RMA celic (Enačba 2). Poleg tega pa smo sproti z invertnim svetlobnim mikroskopom spremljali tudi preraščenost podlage s celicami.

3.6.2 PREŽIVETJE

Vzorce za neposredno določanje števila živih in mrtvih celic s pomočjo štetja pod svetlobnim mikroskopom smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3 *Določanje številske koncentracije celic*. Preživetje celic smo ugotavljali po 24, 48, 72 in 96 h inkubiranja pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku.

3.6.3 MORFOLOGIJA

NV smo elektrostatsko sukali na krovna stekelca (20 x 20 mm), ki smo jih nato položili na dna gojitvene plošče s šestimi vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo dodali po 3 ml ustreznega medija in 3x10⁴ celic ter nato izvedli inkubacije 24 oz. 72 h pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku. Preparate za mikroskopiranje smo pripravili tako, da smo medij odstranili, celice pa 10 min fiksirali s 500 µl 4 % raztopino paraformaldehida v PBS (pH 7,4). Jedra celic smo barvali s 500 µl raztopine barvila Hoechst 33342 v PBS (5 µg/ml), in sicer 30 min, zaščiteno pred svetlobo. Vzorce smo nato sprali s 500 µl PBS in nato barvali še aktinska vlakna s 500 µl raztopine barvila Faloidin-tetrametilrodamin B izotiocianat v PBS (5 µg/ml), prav tako 30 min, zaščiteno pred svetlobo. Po barvanju smo preparate 2-krat sprali s po 500 µl PBS in na vsak preparat nanesli kapljico reagenta Prolong antifade, ki preprečuje bledenje fluorescenčnih barvil. Preparate smo

nato pritrdili na objektna stekelca in s fluorescenčnim mikroskopom opazovali morfologijo celic.

3.6.4 MOBILNOST

Mobilnost celic na rastni podlagi smo ugotavljali po predhodno opisani metodi (33) tako, da smo keratinocite oz. fibroblaste (5×10^6 celic/ml) suspendirali v 0,2 % (m/v) vodni raztopini agaroze, ogrete na temperaturo 37 °C. Posamezne kapljice (1,25 µl) s suspenzijo celic smo nanesli na različne testne rastne podlage (krovno stekelce, krovno stekelce z NV brez vgrajenega TK in krovno stekelce z NV z vgrajenim TK), ki smo jih predhodno namestili na dna vdolbin gojitvene plošče s 6 vdolbinami. Vzorce smo nato prenesli v hladilnik (4 °C, 15 min), kjer so kapljice agaroze s celicami gelirale. Potem smo v vsako vdolbino dodali po 2 ml ustreznega medija (medij brez FBS, medij z 10 oz. 15 % FBS, medij z 0,05 % TK ali medij z 2 % TK) in celice inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku. Celično mobilnost smo vrednotili po 24, 48, 72 in 96 h inkubacije tako, da smo v vsaki časovni točki posneli slike vzorca z digitalnim fotoaparatom nameščenim na invertni svetlobni mikroskop.

3.6.5 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV

Vse rezultate smo podali kot povprečja ± standardne deviacije (SD) in jih statistično vrednotili s Studentovim t-testom. V primeru testov proliferacije in vrednotenja sproščanja proteinov iz NV, je bila povrečna vrednost izračunana na podlagi petih (N = 5), pri določanju števila živih oz. mrtvih celic pa na podlagi desetih ponovitev (N = 10). Kot statistično značilne smo upoštevali vse tiste z vrednostmi p < 0,05.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 TROMBOCITNI KONCENTRAT IN NJEGOV VPLIV NA CELIČNO RAST

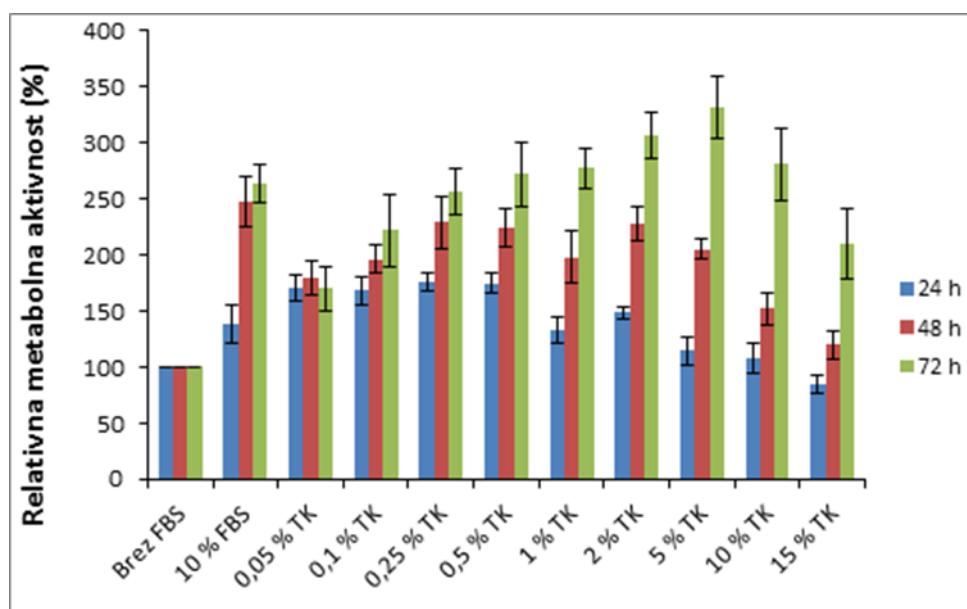
4.1.1 VPLIV TROMBOCITNEGA KONCENTRATA NA KERATINOCITE

V naši raziskavi smo kot vir rastnih dejavnikov uporabili mešanico treh različnih TK. Vzorce združenih TK smo zamrznili na -80 °C in jih pred uporabo odtalili. Tako smo povzročil lizo trombocitov in sproščanje znotrajceličnih rastnih dejavnikov (31). Kvalitativne sestave TK (identifikacija in analiza vsebnosti posameznih rastnih dejavnikov) nismo določali. V vseh poskusih smo uporabljali kar celotno zmes, ki smo jo dobili po odtalityvi TK. Da bi lahko primerjali vpliv TK z vplivom FBS, ki je običajno prisoten v rastnem mediju, na rast celic, smo gravimetrično določili vsebnost suhih snovi v obeh vzorcih. Ugotovili smo, da je povprečna masa suhe snovi v 1 ml TK 46,94 mg, medtem ko je 1 ml FBS vsebuje 584 mg.

4.1.1.1 PROLIFERACIJA

Celično proliferacijo smo določili posredno z določanjem RMA celic. Na podlagi rezultatov (Slika 3) lahko sklepamo, da imata dodatka FBS in TK podoben učinek na celično rast. Oba vsebujeta rastne dejavnike in vzpodbujata rast celic. Način odziva celic pa kaže na to, da sta njuni sestavi (vrsta in količina rastnih dejavnikov) različni. Najbolj podoben celični odziv, kot v primeru dodatka 10 % FBS, smo dosegli z uporabo 2 % TK. Iz tega lahko sklepamo, da so bodisi sestava in učinkovitost rastnih dejavnikov ali pa njihova koncentracija v TK večji od tistih v FBS, saj je, kot smo že omenili, masa suhe snovi v TK mnogo manjša od tiste, določene v enakem volumnu FBS. Dodatno smo opazili, da so se celični odzivi na različne koncentracije TK spremišnjali s časom. Po 24 h so največjo RMA izkazovale tiste celice, ki smo jih gojili v mediju z 0,25 % TK, po 48 h pa tiste, ki smo jih gojili v mediju z 2 % TK. Po 72 h so bile metabolno najbolj aktivne celice, ki so rastle v mediju z dodatkom 5 % TK. Iz tega lahko sklepamo, da prisotnost prevelikih koncentracij rastnih dejavnikov privede do nepričakovanih celičnih odzivov, kar so ugotovili tudi drugi raziskovalci (21, 34). Takšna razlaga se sklada s paradigmo o celičnem odzivu, ki je optimalen le v točno določenem koncentracijskem območju rastnih dejavnikov. V primeru nizke koncentracije TK v mediju je očitno bila količina rastnih dejavnikov v prvi časovni

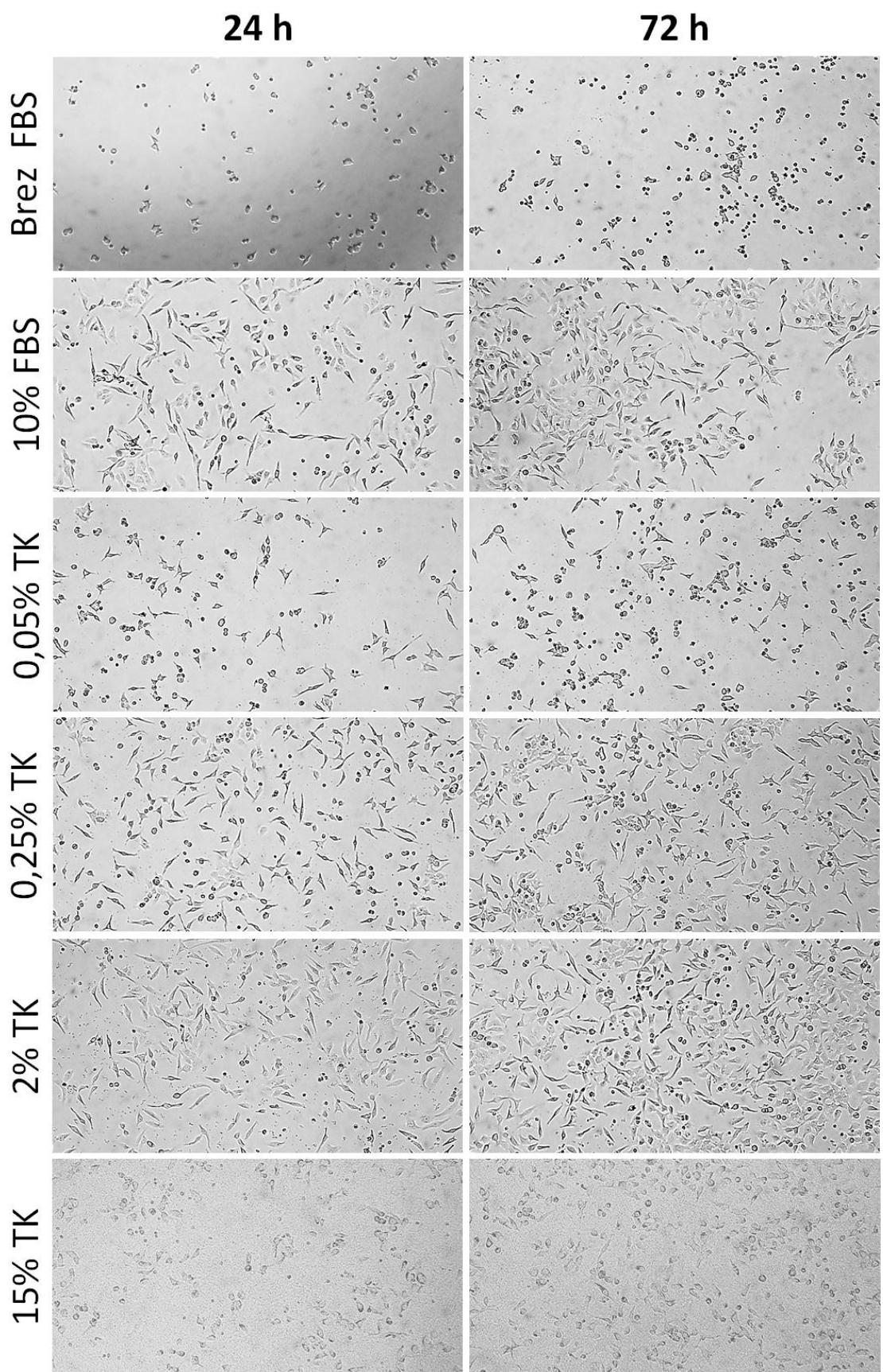
točki optimalna, v kasnejših pa je bil porast RMA, zaradi njihovega pomanjkanja, manjši. Pri višjih koncentracijah TK (od 1 % do 5 %) je bila količina rastnih dejavnikov v prvi časovni točki previsoka, zato je bila RMA celic manjša, od pričakovane. Ker pa večja količina vnesenih rastnih dejavnikov predstavlja dolgotrajnežo zalogo, lahko opazimo porast v RMA celic šele v kasnejših časovnih točkah. Nadaljnje povečevanje koncentracije TK v mediju (10 % in 15 %) ni bilo smiselno, saj so celice tudi v kasnejših časovnih točkah izkazovale manjšo RMA, kot v primeru nižjih koncentracij. Dodatno je pri delu z vzorci, ki so vsebovali višje koncentracije TK, prihajalo do geliranja medija, kar bi lahko vplivalo tudi na rezultate celičnih testov, saj sta s tem otežena odmerjanje in enakomerna porazdelitev dodatka TK v celični kulturi. Zaključimo lahko, da je smiselen razvoj takega dostavnega sistema, ki bo zagotavljal nadzorovano sproščanje rastnih dejavnikov v medij in tako omogočal njihovo stalno optimalno koncentracijo.



Slika 3: RMA keratinocitov v odvisnosti od volumskih deležev TK ali FBS v mediju. Kot kontrolo smo uporabili kulturo, v kateri so celice rastle v mediju brez dodanega FBS.

Rezultate vrednotenja RMA celic smo podkrepili tudi s spremeljanjem preraščenosti gojitvenih površin z invertnim svetlobnim mikroskopom. Na Sliki 4 vidimo, da celice za uspešno rast nujno potrebujejo rastne dejavnike, saj tiste, ki smo jih gojili v mediju brez FBS izkazujejo za keratinocite neznačilno, bolj kroglasto morfologijo. Opazili smo, da so keratinociti sprva kroglasti, a pritrjeni, nato pa se s podaljševanjem časa

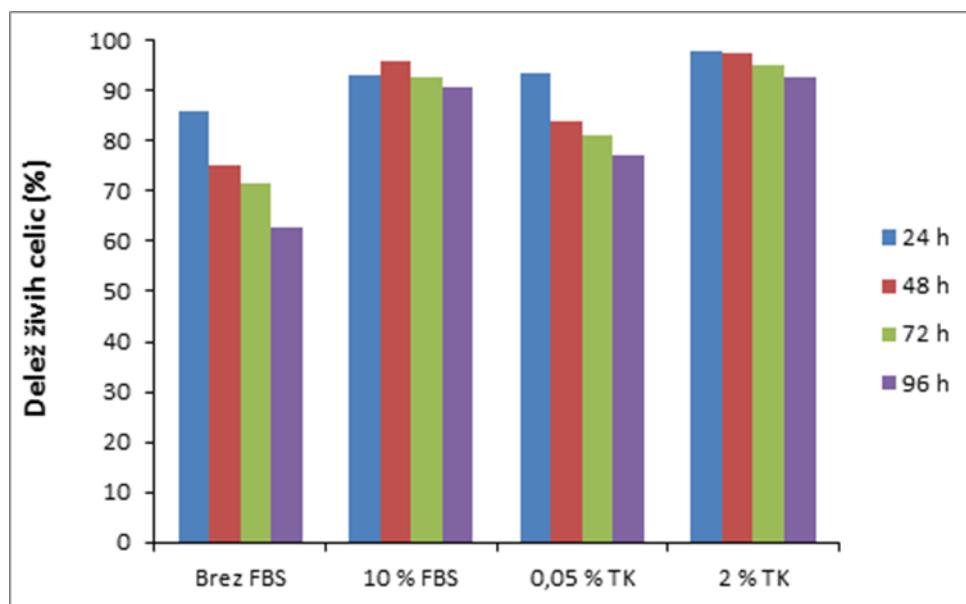
inkubiranja ločijo od podlage, kar kaže na njihovo odmiranje. V tem primeru tudi po 72 h nismo opazili povečane preraščenosti podlage. Že najmanjši dodatek rastnih dejavnikov v obliki TK pa je povzročil morfološko spremembo večine celic. Ob tem se je povečala tudi preraščenost podlage s celicami, kar smo potrdili tudi s testom MTS. Slike preraščenosti celičnih kultur po 24 h inkubiranju korelirajo z rezultati testa MTS, saj je bila preraščenost največja pri tistih keratinocitih, ki so rastli v mediju z 0,25 % TK. Prav ta vzorec pa je izkazoval tudi največjo RMA. Po 72 h je bila preraščenost največja v kulturi z dodatkom 2 % TK, kar lahko pripisemo ravno zadostni količini vnesenih rastnih dejavnikov. V primeru nižjih količin dodanega TK, pa smo v sistem verjetno vnesli take količine rastnih dejavnikov, ki so v začetnih časovnih točkah uspešno spodbujale celično proliferacijo, s časom pa je rastnih dejavnikov pričelo primanjkovati. Nadaljnje povečave koncentracije TK do 15 % pa, v nasprotju s pričakovanji, ni dodatno povečalo RMA celic, temveč jo je zmanjšalo, kar se je odražalo tudi v zmanjšani preraščenosti rastne podlage.



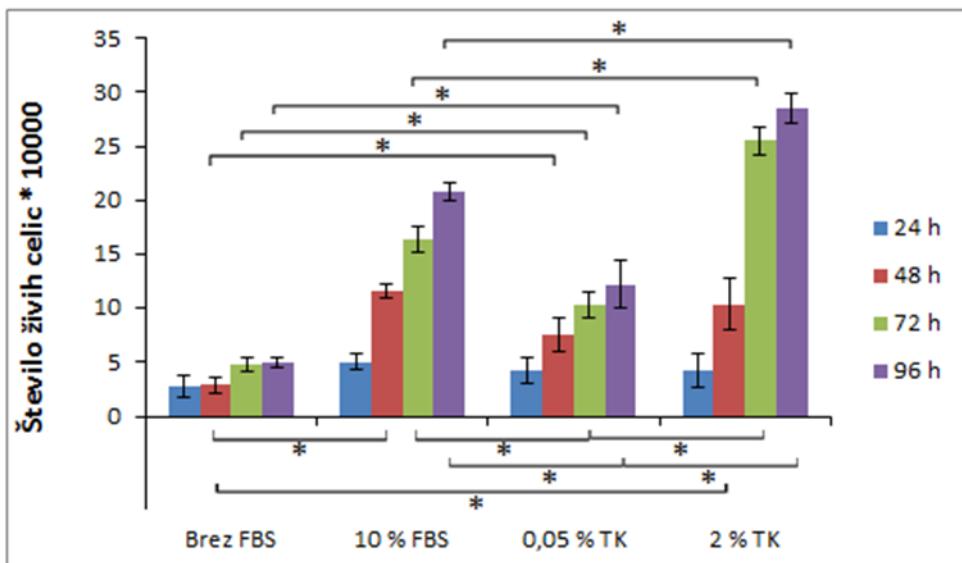
Slika 4: Preraščenost rastne podlage s keratinociti, v odvisnosti od dodanega volumskega deleža TK ali FBS v rastni medij.

4.1.1.2 PREŽIVETJE

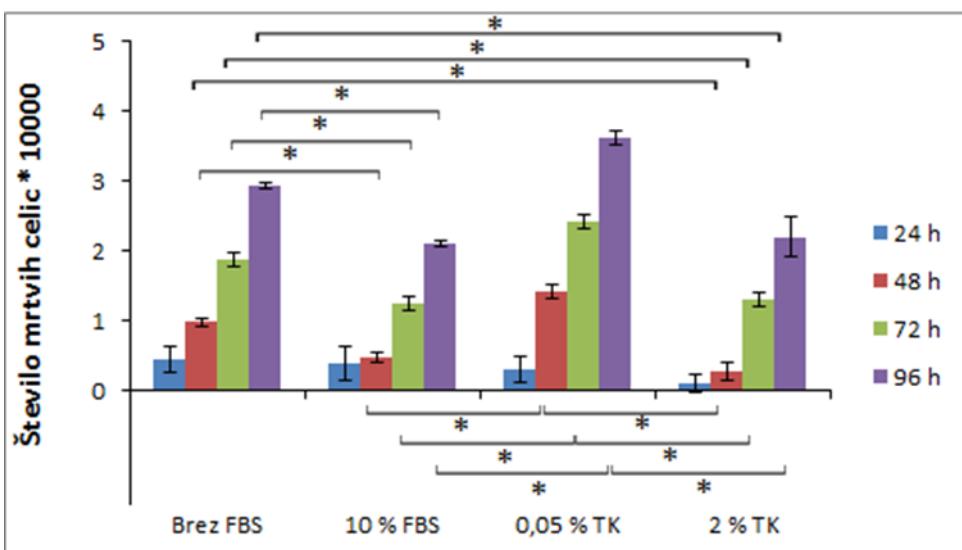
Za izvedbo testa preživetja smo v vse vdolbinice gojitvene plošče prenesli enako število celic. Ker nam relativni delež živih celic v kulturi (Slika 5) ne poda celostne informacije o njihovi kvantitativni sestavi, smo poleg tega določili še absolutno število živih in mrtvih keratinocitov (Slike 6 in 7). Rezultati kažejo, da smo z dodatkom 2 % TK v medij najbolj spodbudili celično rast, pri čemer je bil delež živih celic najbolj primerljiv s tistim v kulturah, ki smo jih gojili v običajnem rastnem mediju z 10 % FBS. Razlika med celicami v obeh omenjenih kulturah je bila ta, da je bila proliferacija in s tem število živih celic po 72 in 96 h v kulturi z 2 % TK statistično značilno večje kot v kulturi z 10 % FBS (Slika 6). V primeru celic, ki smo jih gojili v mediju brez FBS, pa so te slabo proliferirale, poleg tega pa smo opazili, da so obsežno odmirale, saj se je delež živih celic izrazito zmanjševal s podaljševanjem časa inkubiranja. Že najmanjši proučevani dodatek TK (0,05 %) v brezserumski medij pa je povzročil statistično značilno povečanje števila živih celic po 48 h, kljub temu pa je bilo število živih celic v kulturi po 72 in 96 h še vedno statistično značilno manjše kot v celičnih kulturah gojenih v mediju z 2 % TK ali 10 % FBS. Neoptimalna sestava medija, se je odražala tudi v izrazitem porastu števila mrtvih celic po 48, 72 in 96 h inkubacije (Slika 7). Število mrtvih celic v zadnjih treh časovnih točkah je bilo ob uporabi medija brez FBS oz. medija z 0,05 % TK statistično značilno večje od tistega v celičnih kulturah z dodatkom 10 % FBS oz. 2 % TK.



Slika 5: Vplivi različnih volumskih deležev TK ali FBS v gojitvenem mediju na delež živih keratinocitov v celičnih kulturah.



Slika 6: Vplivi različnih volumskih deležev TK ali FBS v gojitvenem mediju na število živih keratinocitov v celičnih kulturah (* označuje statistično značilne razlike, $p < 0,05$).

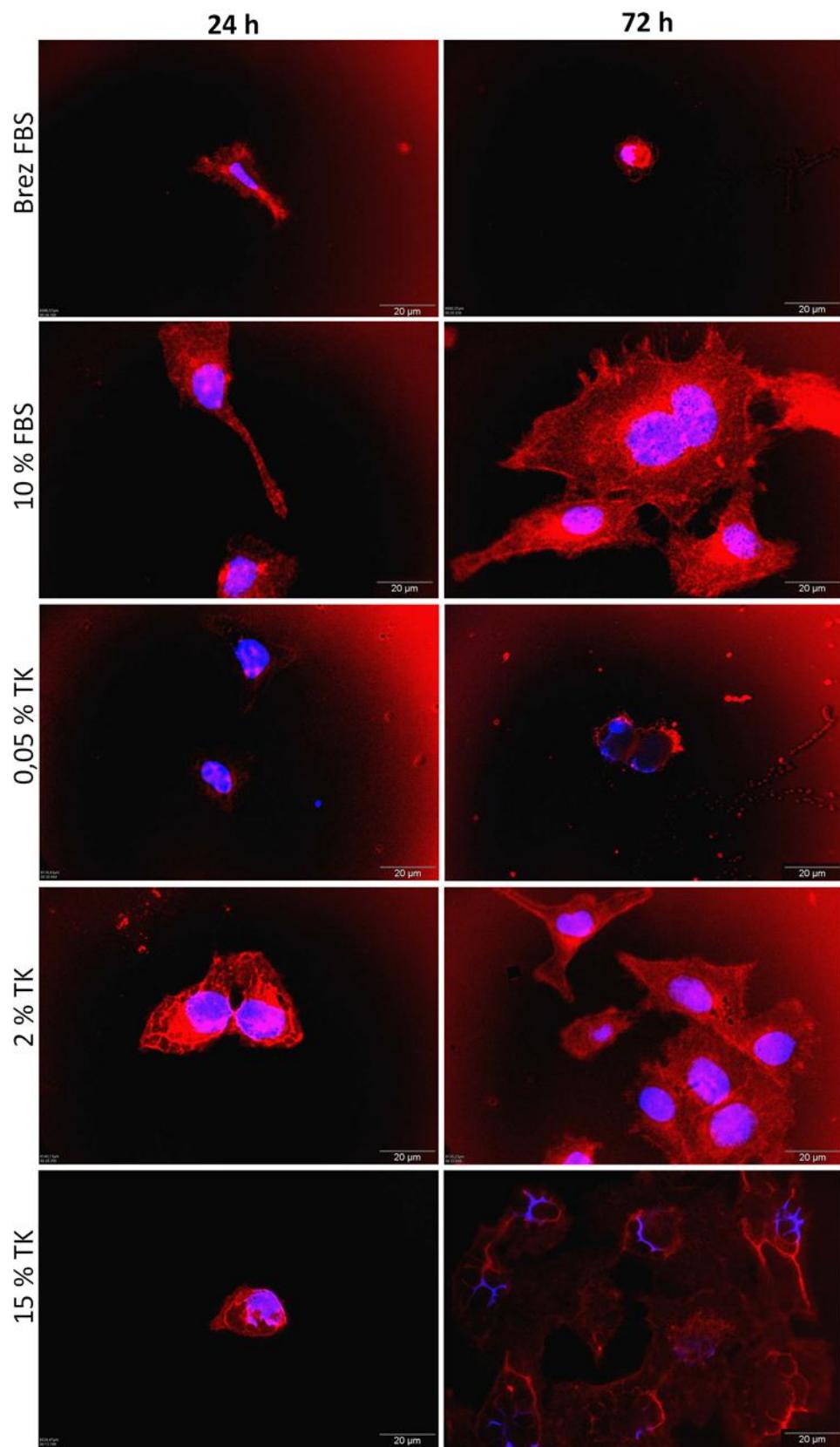


Slika 7: Vplivi različnih volumskih deležev TK ali FBS v gojitvenem mediju na število mrtvih keratinocitov v celičnih kulturah (* označuje statistično značilne razlike, $p < 0,05$).

4.1.1.3 MORFOLOGIJA

Vpliv TK na celično morfologijo je bil odvisen od koncentracije in časa oz. od trajanja izpostavljenosti (Sliki 4 in 8). V primeru, ko smo keratinocite gojili v mediju brez FBS, torej brez rastnih dejavnikov, smo opazili bolj kroglasto morfologijo, kot pri celicah, ki so rastle v običajnem mediju za keratinocite (10 % FBS). Razlika v morfologiji je

najbolj očitna po 72 h inkubaciji. Domnevamo, da je kroglasta morfologija keratinocitov posledica pomanjkanja oz. odsotnosti rastnih dejavnikov, ki so nujno potrebni za normalno rast celic. V primeru uporabe medija brez FBS smo pod invertnim svetlobnim mikroskopom opazili tudi številne mrtve celice, ki so prosto plavale v mediju. Že z dodatkom minimalne količine TK (0,05 %) v medij se je morfologija določenega deleža celic v prvi časovni točki spremenila v bolj razširjeno in je bila primerljiva s tisto v kontrolni kulturi (10 % FBS) (Slika 4). Poleg tega smo pod svetlobnim mikroskopom opazili manjše število celic, ki so se ločile od podlage. Ker pa je bila količina rastnih dejavnikov zelo majhna, smo po 72 h tudi v primeru celic, ki so rastle v mediju z 0,05 % TK, opazili, da je imela večina celic kroglasto morfologijo. Oblika celic, ki so rastle v mediju z 2 % TK je bila primerljiva z morfologijo keratinocitov, ki smo jih gojili v običajnem rastnem mediju. Nadaljnje povečevanje koncentracije TK v mediju pa je pripeljalo do neželenih sprememb v celični morfologiji. Celice so po 24 h gojenja v takih pogojih namreč izkazovale bolj kroglasto morfologijo, po 72 h pa so postale nekoliko bolj razraščene, vendar pa smo obenem opazili izrazito prizadetost njihovih jeder. Po 72 h inkubiranja je bil citoskelet keratinocitov normalen (celice so bile razraščene in so tvorile medcelične povezave) le v primeru, ko smo jih gojili v mediju z 10 % FBS ali 2 % TK, v vseh ostalih primerih pa aktinski filamenti niso bili več vidni, kar je znak poškodb celičnega citoskeleta (Slika 8). Iz rezultatov lahko ugotovimo, da dodatek 2 % TK v medij predstavlja kompromis med kratkoročnim (24 h) in dolgoročnim vplivom rastnih dejavnikov na celično rast in da je najbolje oponašal običajen medij za keratinocite (10 % FBS). Nadaljnje povečevanje koncentracije TK (15 %) v mediju ni bilo smiselno, saj smo po 24 in 72 h opazili spremenjeno, kroglasto morfologijo celic (Slika 8). Poleg tega smo s testom metabolne aktivnosti celic (Slika 3) in s slikanjem kultur z invertnim mikroskopom (Slika 4) jasno dokazali negativen vpliv visokih koncentracije TK tudi na celično proliferacijo.

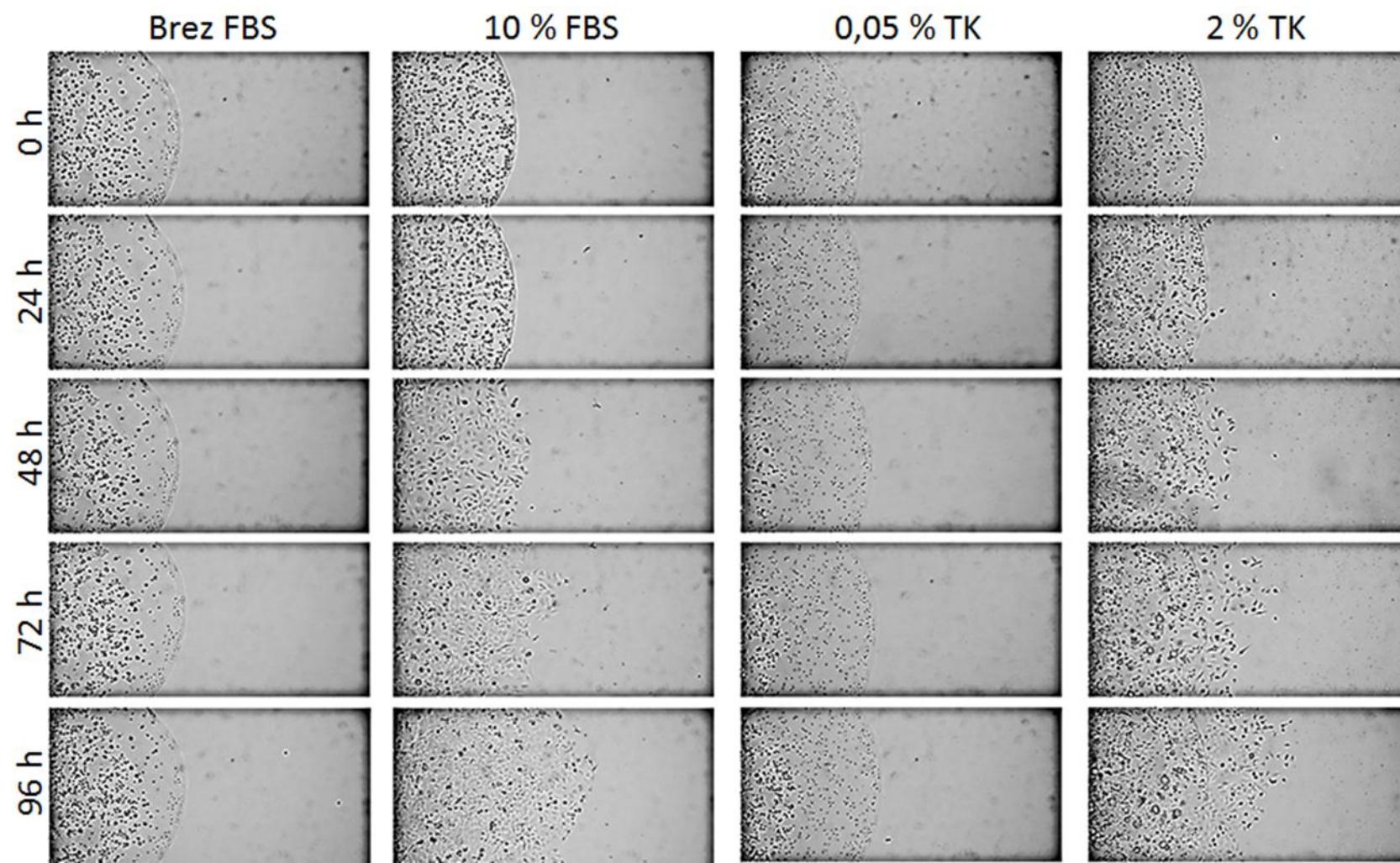


Slika 8: Morfologija keratinocitov v odvisnosti od volumskih deležev TK ali FBS v mediju po 24 in 72 h inkubacije. Celična jedra smo obarvali z barvilm Hoechst 33342 (modro), aktinske filamente pa s Faloidin rodaminom (rdeče).

4.1.1.4 MOBILNOST

S pojmom mobilnost adherentnih celičnih linij, med katere sodijo tudi keratinociti in fibroblasti, ne označujemo le »premikanja« posameznih celic, ampak predvsem širjenje oz. razraščanje gojene populacije celic. Mobilnost celic je tako odvisna predvsem od obsega celične proliferacije in učinkovitosti razraščanja hčerinskih celic po rastni podlagi (33).

Ugotovili smo, da so bile celice, ki so rastle v mediju brez FBS praktično nemobilne (Slika 9), kar je lahko posledica minimalne proliferacije. Podobno so se obnašale tudi celice, ki smo jih gojili v mediju z 0,05 % TK. V primeru uporabe medija z 2 % TK pa so bili keratinociti podobno mobilni kot tisti, gojeni v običajnem rastnem mediju z 10 % FBS. V obeh primerih smo namreč opazili, da sta liniji celic presegli robova agaroznih kapljic in da sta se s podaljševanjem časa inkubacije še naprej širili. V primerih uporabe medijev brez FBS in z 0,05 % TK pa je celična linija v agaroznih kapljicah ostala nespremenjena kljub temu, da so se celice delile.



Slika 9: Vplivi volumskih deležev TK ali FBS v mediju na mobilnost keratinocitov.

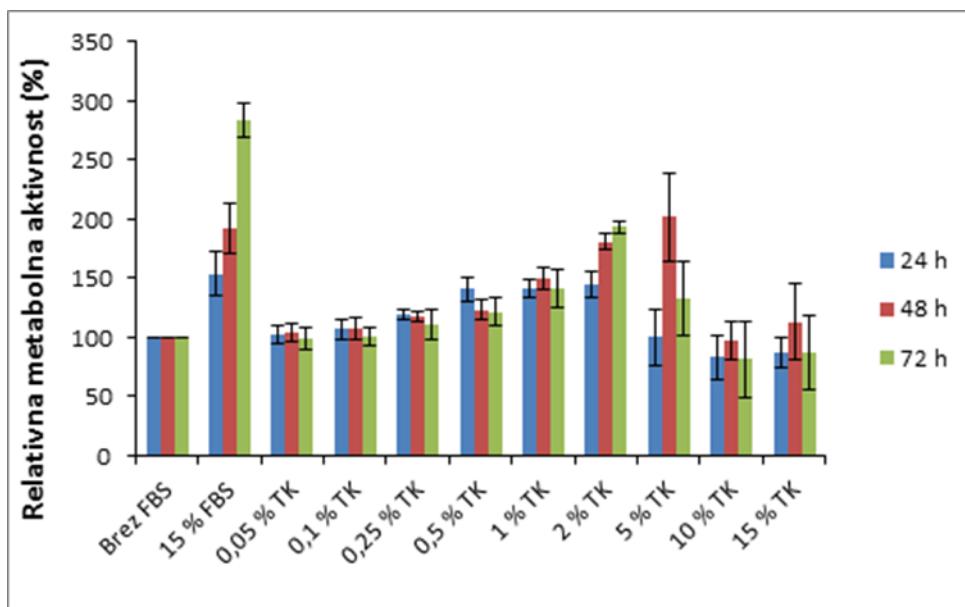
4.1.2 VPLIV TROMBOCITNEGA KONCENTRATA NA FIBROBLASTE

4.1.2.1 PROLIFERACIJA

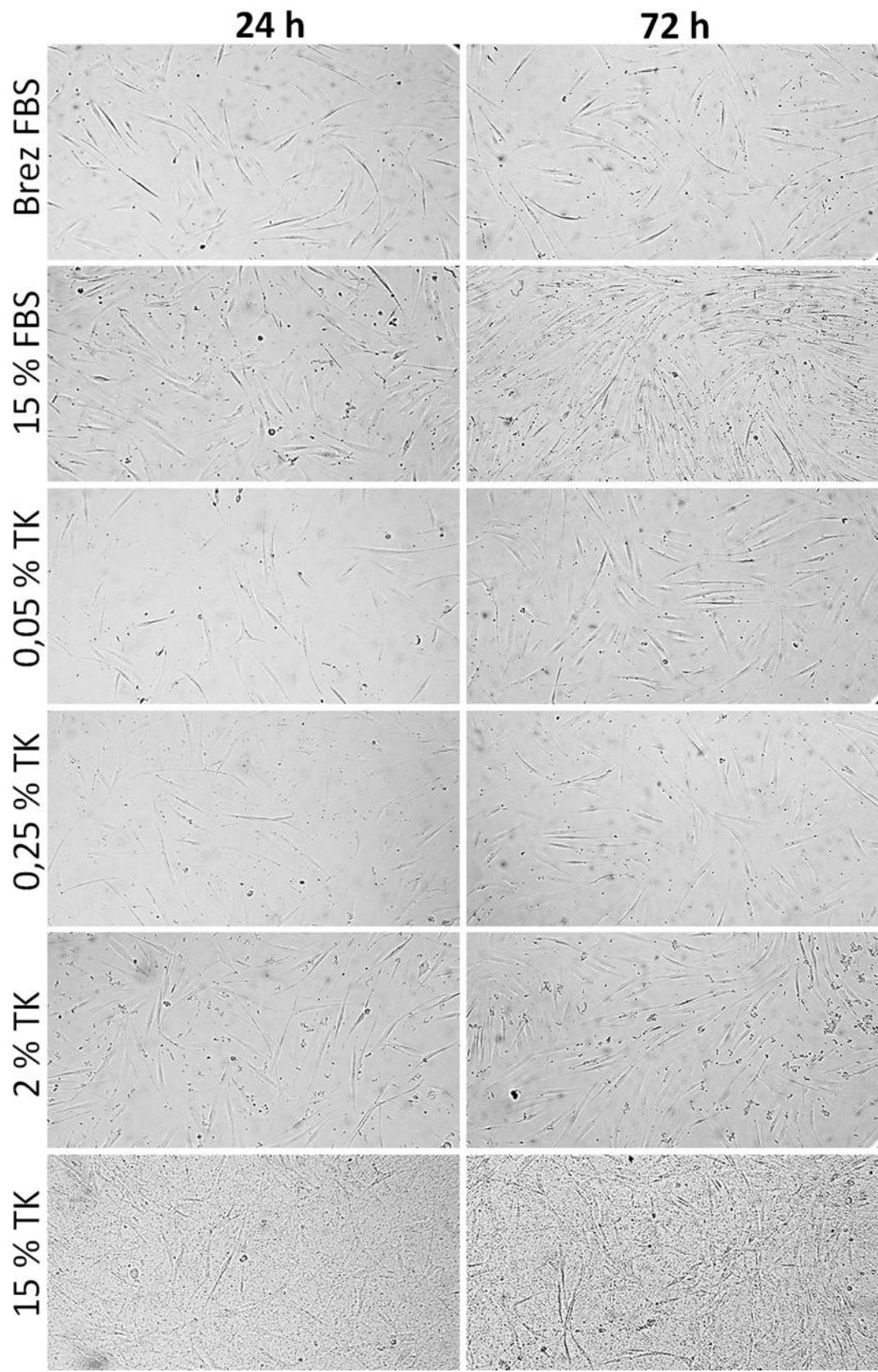
RMA fibroblastov, ki smo jih gojili v medijih z različnimi vsebnostmi TK ni v nobenem primeru presegla RMA celic, ki so rastle v mediju z dodatkom 15 % FBS (Slika 10). Vzrok za to bi lahko bil v bistveno manjši količini in različnosti rastnih dejavnikov, ki smo jih v medij vnesli s TK, v primerjavi s FBS. Masa suhe snovi v 1 ml TK je bila bistveno manjša kot v primeru FBS, kar bi lahko pomenilo tudi manjšo vsebnost rastnih dejavnikov, a za potrditev te predpostavke bi bile potrebne nadaljne analize.

Fibroblasti potrebujejo za normalno rast večjo vsebnost FBS v mediju (15 %) kot keratinociti (10 %), zato v našem primeru koncentracije TK manjše od 0,5 % niso spodbudile njihove metabolne aktivnosti niti v začetni časovni točki (24 h). Koncentracije med 0,5 % in 2 % TK pa so stimulirale metabolno aktivnost le v prvi časovni točki (24 h). Po 72 h se je sicer najbolje izkazal učinek 2 % TK, vendar pa je bila določena RMA fibroblastov še vedno precej nižja od tiste, ki smo jo izmerili v prisotnosti normalnega rastnega medija (15 % FBS). Kljub temu, da fibroblasti, glede na sestavo osnovnega medija, potrebujejo večjo količino rastnih dejavnikov, pa je bila uporaba TK nad 5 % neučinkovita, saj je bil celični odziv primerljiv s tistim v kontrolnem vzorcu (medij brez FBS). Tudi v primeru fibroblastov je v kulturah, ki so vsebovale 5 % ali več TK, prišlo do geliranja medija, kar je seveda vplivalo na rezultate testa (nepravilno odmerjanje ali neenakomerna porazdelitev vzorca TK v mediju).

Rezultate RMA podpirajo tudi izsledki preraščenosti podlage (Slika 11). Ta je bila največja pri celicah, ki so rastle v mediju s 15 % FBS, sledili pa so fibroblasti, ki smo jih gojili v mediju z 2 % TK. Tako pri fibroblastih kot pri keratinocitih se je, glede na celični odziv, dodatek 2 % TK izkazal kot najustreznejši.



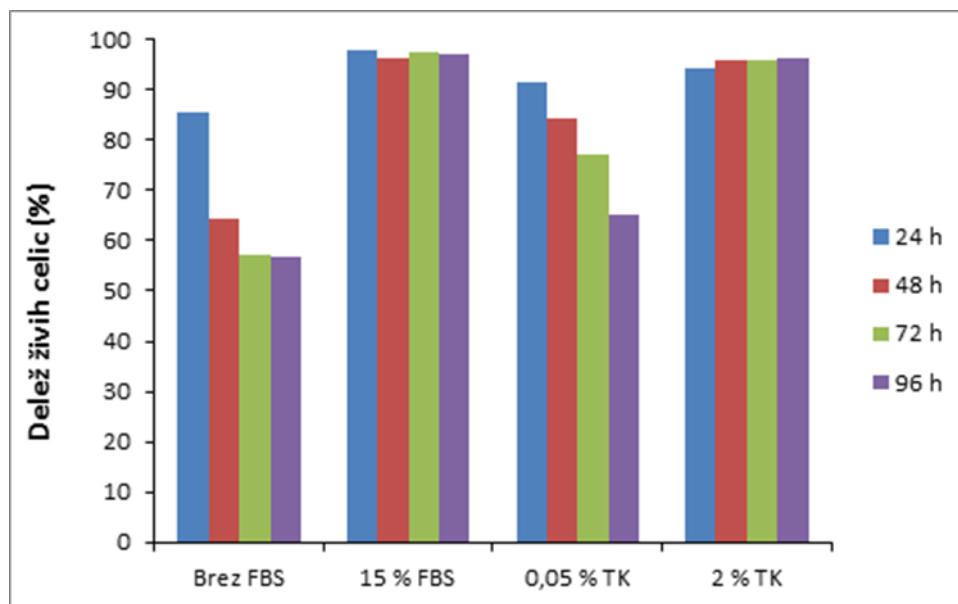
Slika 10: RMA fibroblastov v odvisnosti od volumskih deležev TK ali FBS v mediju. Kot kontrolo smo uporabili kulturo, v kateri so celice rastle v mediju brez dodanega FBS.



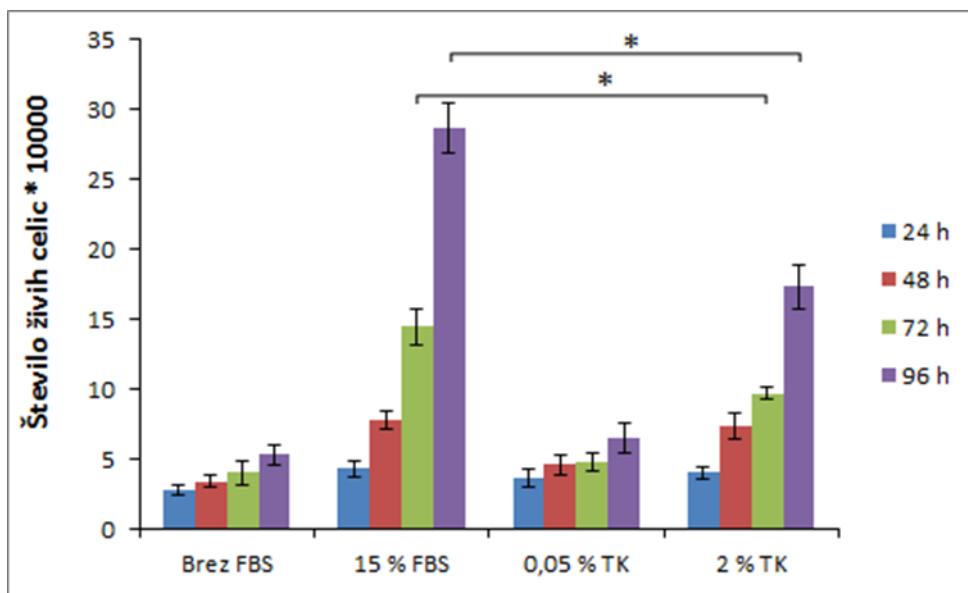
Slika 11: Preraščenost rastne podlage s fibroblasti v odvisnosti od dodanega volumskega deleža TK ali FBS v rastni medij.

4.1.2.2 PREŽIVETJE

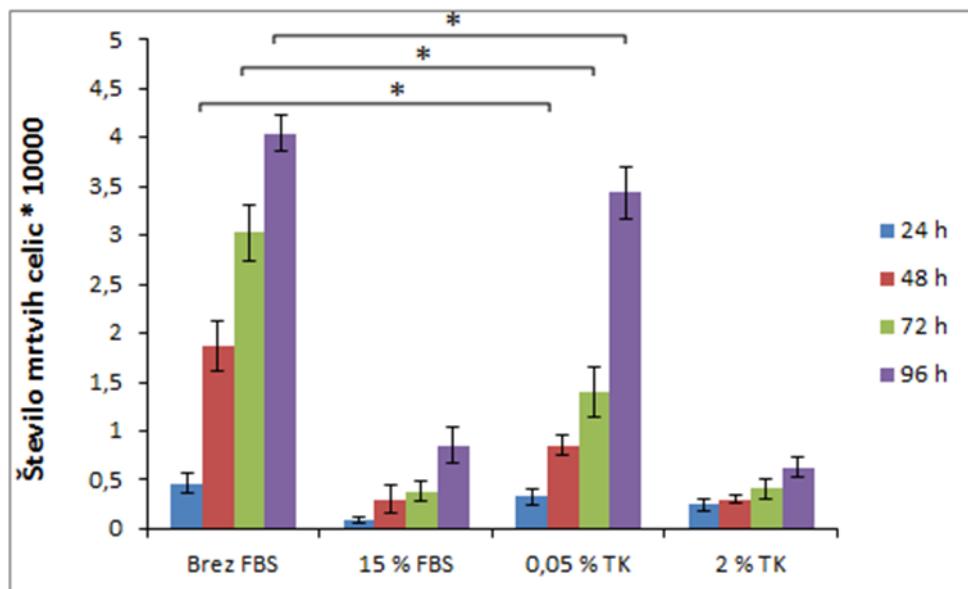
Delež živih fibroblastov, ki smo jih gojili v mediju brez FBS je s časom upadal, kar lahko pripisemo pomanjkanju oz. odsotnosti rastnih dejavnikov (Slika 12). Enak trend smo opazili tudi pri gojenju celic v mediju z 0,05 % TK, le da je v tem primeru delež živih celic upadal nekoliko počasneje. Ko smo primerjali število živih celic med obema vzorcema, pa nismo ugotovili statistično značilne razlike. Delež živih celic, ki so rastle v mediju z 2 % TK je bil primerljiv s tistim, ki smo ga določili v kulturah gojenih v rastnem mediju za fibroblaste. Razlika pa se je pokazala v absolutnem številu živih celic (Slika 13). To je bilo namreč pri celicah, ki so rastle v mediju s 15 % FBS, statistično značilno večje, vendar šele po 72 in 96 h inkubacije. Ti rezultati se skladajo z izsledki testa MTS (Slika 10). Število mrtvih celic v kulturi z medijem brez FBS po 48, 72 in 96 h je bilo statistično značilno večje od tistega v kulturi z 0,05 % TK. V primerjavi s celičnima kulturama, ki smo ju gojili v mediju s 15 % FBS ali 2 % TK, smo opazili izrazito odmiranje celic oz. porast števila mrtvih celic tudi pri celicah, ki so rastle v mediju z 0,05 % TK. V vzorcih celičnih kultur s 15 % FBS in 2 % TK pa je bilo število mrtvih celic medsebojno primerljivo (Slika 14).



Slika 12: Vplivi različnih volumskih deležev TK ali FBS v gojitvenem mediju na delež živih fibroblastov v celičnih kulturah.



Slika 13: Vplivi različnih volumskih deležev TK ali FBS v gojitvenem mediju na število živih fibroblastov v celičnih kulturah (*statistično značilne razlike, $p < 0,05$).



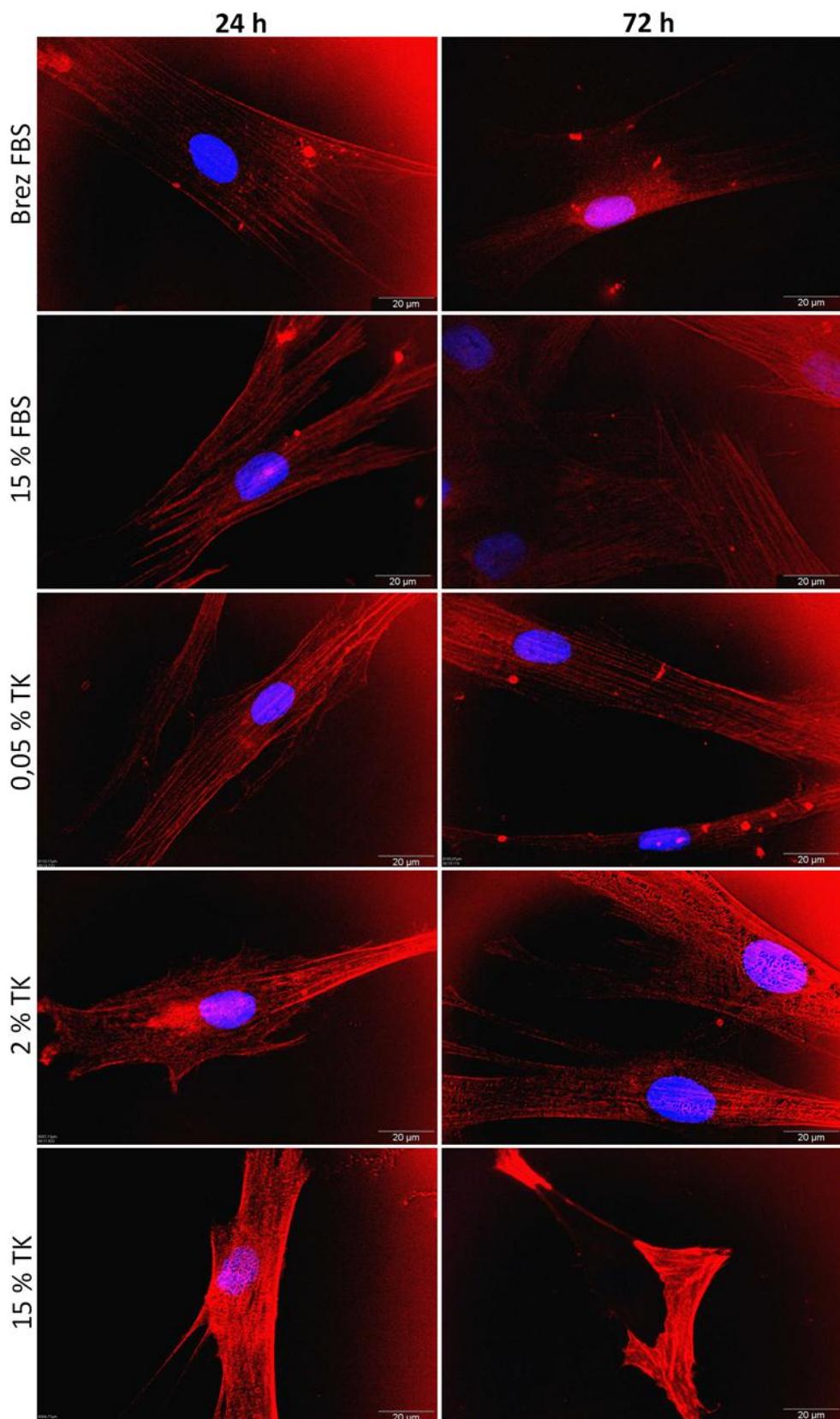
Slika 14: Vplivi različnih volumskih deležev TK ali FBS v gojitvenem mediju na število mrtvih fibroblastov v celičnih kulturah (*statistično značilne razlike, $p < 0,05$).

4.1.2.3 MORFOLOGIJA

Za razliko od keratinocitov ima prisotnost/odsotnost rastnih dejavnikov v rastnem mediju manjši vpliv na morfologijo fibroblastov. Tudi fibroblasti, ki so rastli v mediju brez FBS, so po 24 h vretenaste oblike in so morfološko primerljivi s fibroblasti, ki so rastli v mediju s 15 % FBS (Slika 15). Po 72 h je postala njihova morfologija bolj

kondenzirana, aktinski filamenti pa so bili manj izraziti. Za razliko od keratinocitov, pri fibroblastih dodane visoke koncentracije TK niso povzročile morfoloških sprememb celic iz vretenastih oblik v bolj kroglaste. Pomanjkanje rastnih dejavnikov ali visoka koncentracija TK (15 %) v mediju pa sta po 72 h gojenja povzročila bolj kondenzirano morfologijo celic, z manj izrazitimi aktinskimi filamenti. Manjši učinek sestave medija oz. prisotnosti rastnih dejavnikov na obliko fibroblastov lahko pripisemo počasnejšemu celičnemu metabolizmu in diferenciaciji, ki sta značilna za fibroblaste. Čas, v katerem se keratinociti podvojijo, je 21 h (35), medtem ko je ta čas pri fibroblastih od 36 do 48 h (36). Zaradi narave celic se torej vpliv sestave medija na njihovo proliferacijo in posledično morfologijo pokaže šele kasneje, v kolikor je čas, v katerem se celice podvojijo, daljši.

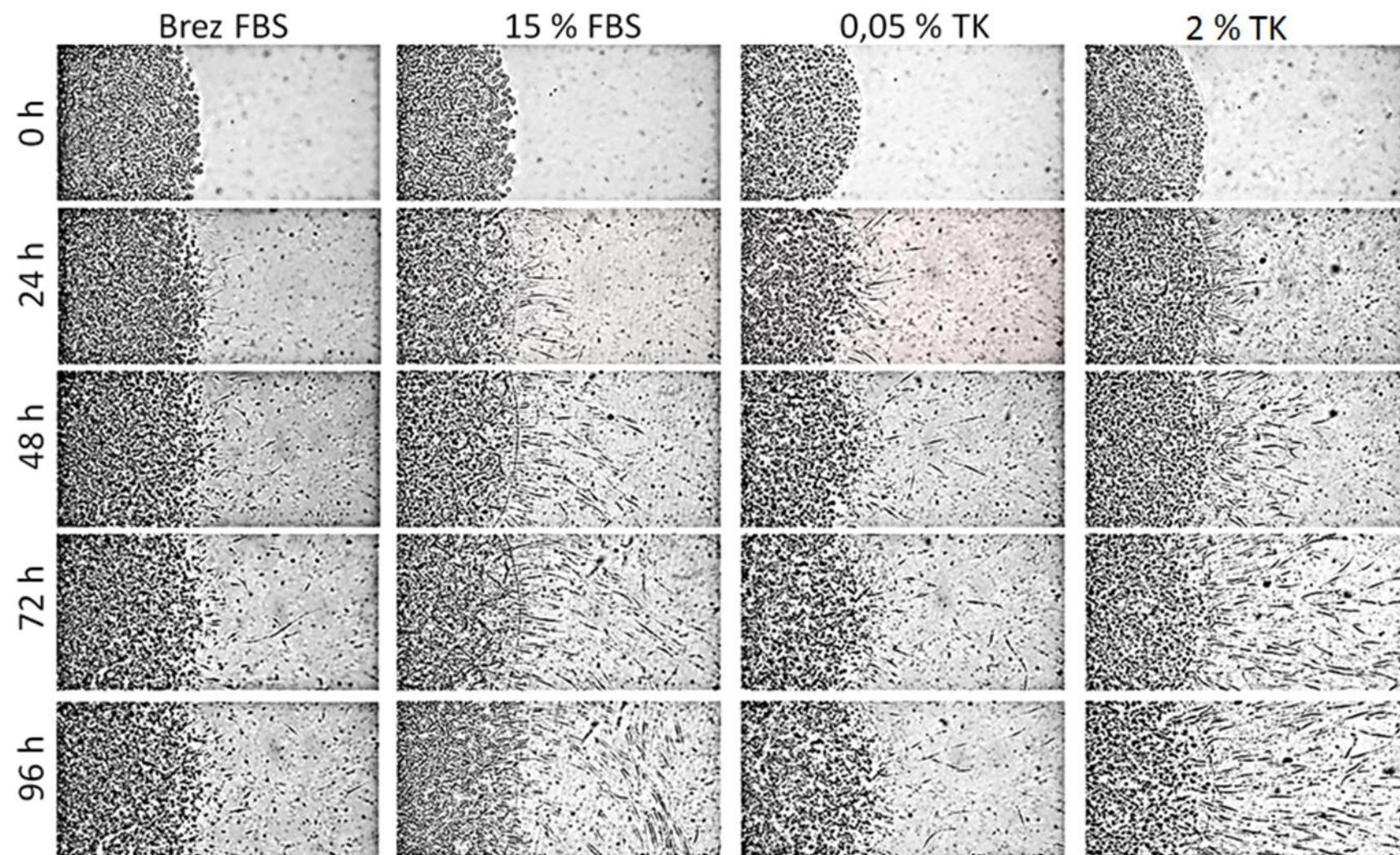
Pri najvišji testirani koncentraciji TK (15 %) smo po 72 h opazili slabše barvanje celičnih jeder in to kljub nespremenjenemu postopku barvanja celic, zato lahko sklepamo, da je med gojenjem fibroblastov prišlo do sprememb v zgradbi oz. njihovi strukturi jeder. To bi lahko bila posledica previsoke koncentracije TK v rastnem mediju.



Slika 15: Morfologija fibroblastov v odvisnosti od volumskih deležev TK ali FBS v mediju po 24 in 72 h inkubacije. Celična jedra smo obarvali z barvilkom Hoechst 33342 (modro), aktinske filamente pa s Faloidin rodaminom (rdeče).

4.1.2.4 MOBILNOST

Ker so fibroblasti večji oz. daljši ($\sim 60 \mu\text{m}$) od keratinocitov ($\sim 30 \mu\text{m}$) in se po celični delitvi bolj razširijo po rastni podlagi (v smeri migracije celic), je njihova tovrstna mobilnost večja od tiste, ki jo izkazujejo keratinociti. Ko smo celice gojili v mediju brez dodanega FBS, smo opazili slabo mobilnost fibroblastov, medtem ko je postala ta že ob minimalnem dodatku TK (0,05 %) po 24 h opazna in primerljiva z mobilnostjo tistih celic, ki so rastle v mediju s 15 % FBS ali 2 % TK (Slika 16). Po 72 h pa so bili fibroblasti v mediju brez FBS in v tistem z 0,05 % TK bistveno slabše mobilni, kot celice, ki smo jih gojili v medijih s 15 % FBS ali z 2 % TK, kar lahko pripisemo odsotnosti oz. pomanjkanju rastnih dejavnikov. Kot smo omenili, pa so bili keratinociti v medijih brez FBS in z 0,05 % TK popolnoma nemobilni. Dobra celična mobilnost v časovnem obdobju 72 h v primerih, ko so fibroblasti rastli v medijih s 15 % FBS ali 2 % TK, je korelirala tudi z njihovo bistveno večjo RMA (večji obseg proliferacije) (Slika 10). Poleg tega, da so bili fibroblasti bolj mobilni od keratinocitov, smo za razliko od slednjih, pri fibroblastih opazili vsaj minimalno mobilnost tudi v vzorcih kultur brez dodanega FBS ali z dodatkom 0,05 % TK.



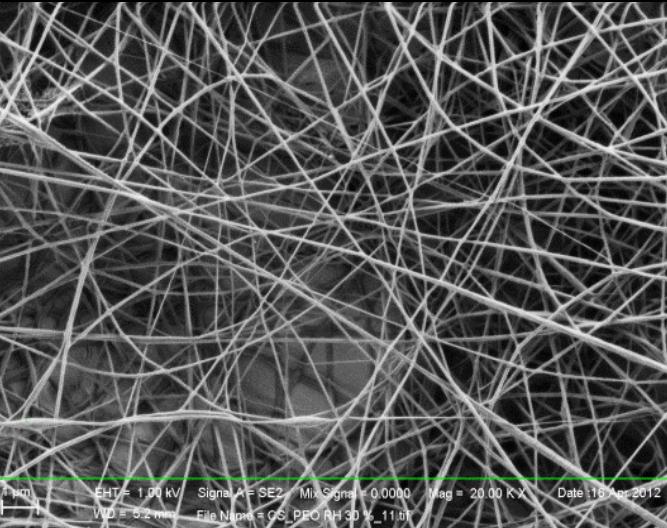
Slika 16: Vplivi različnih volumskih deležev TK ali FBS v mediju na mobilnost fibroblastov.

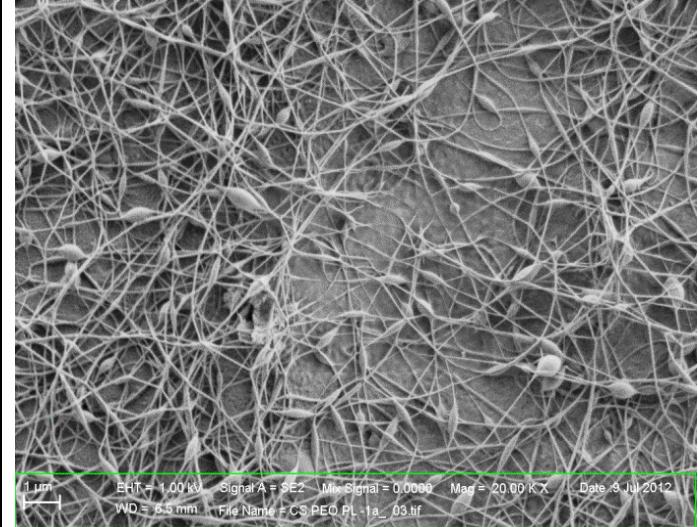
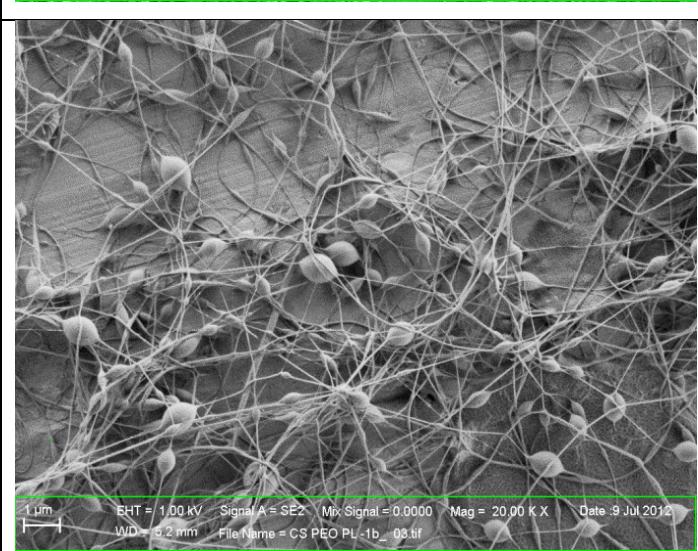
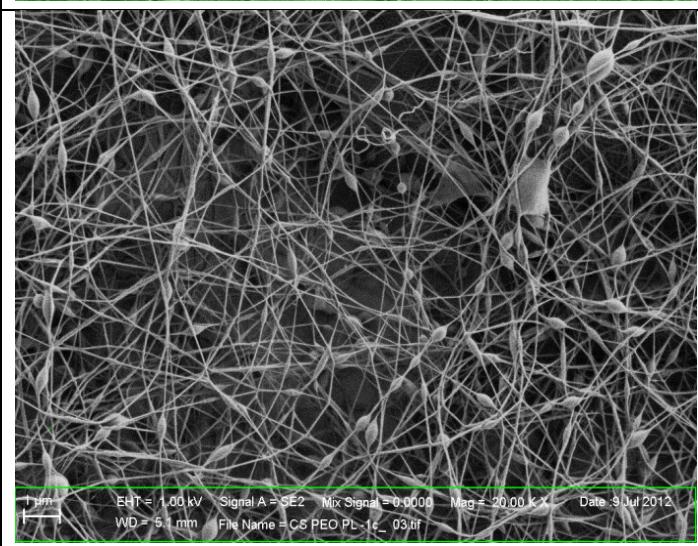
4.2 LASTNOSTI IZDELANIH NANOVLAKEN

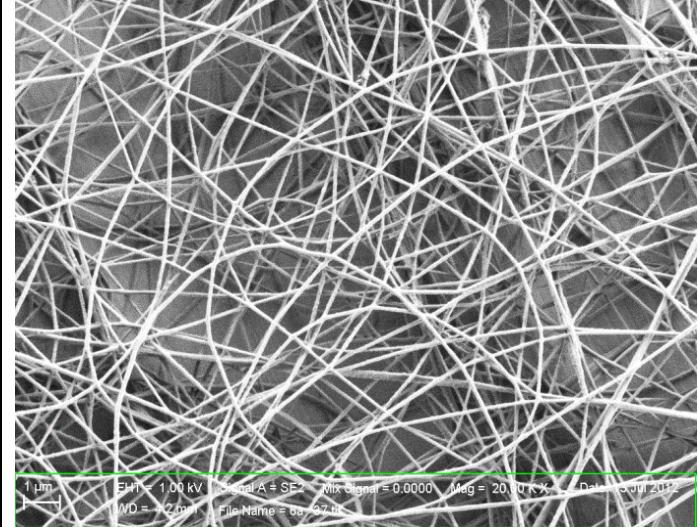
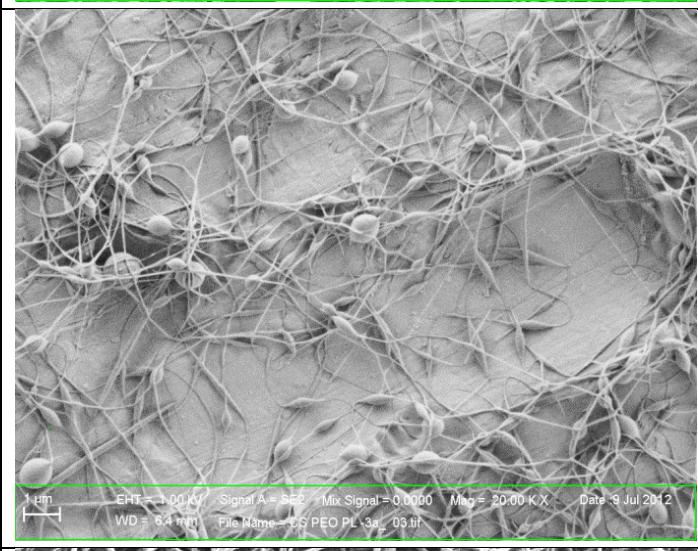
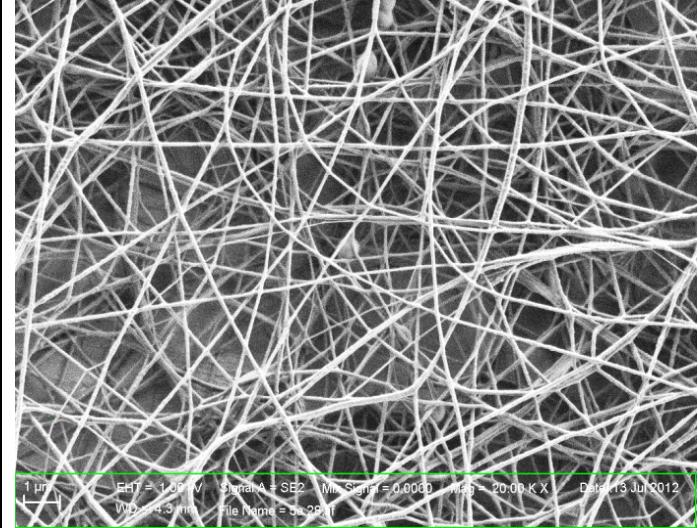
4.2.1 MORFOLOGIJA

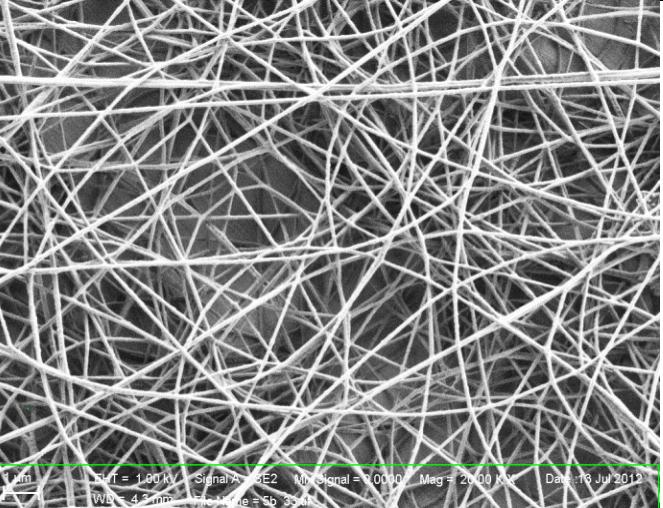
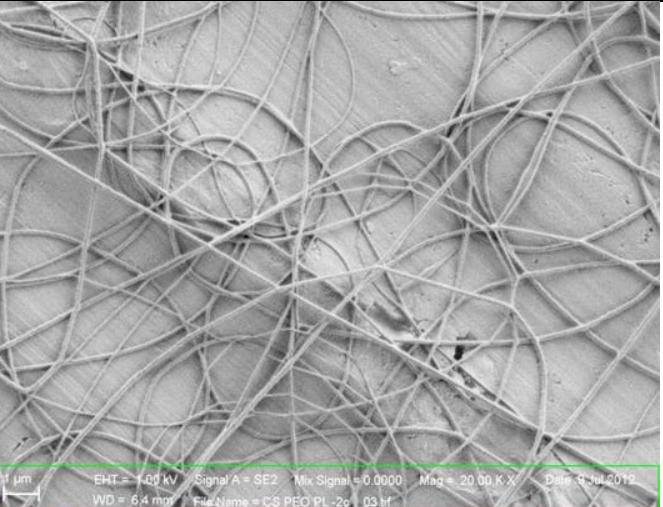
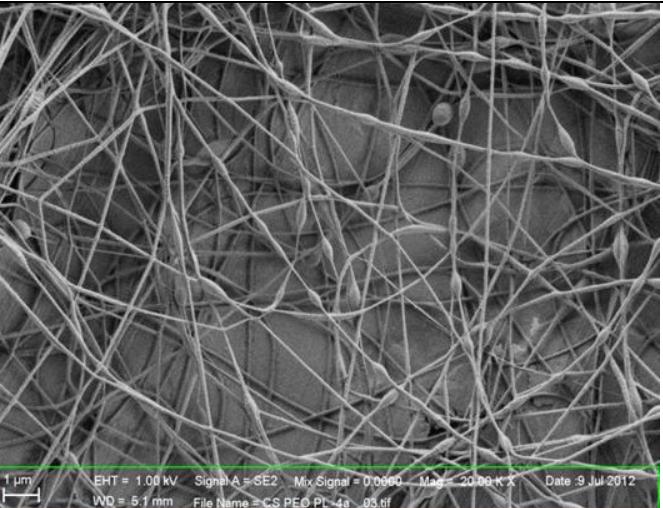
Pri izdelavi NV z vgrajenim TK smo najprej testirali procesne pogoje, s ciljem, da bi izdelali NV brez vozlov. Pretok polimerne raztopine smo spreminjali od 1,6 ml/h do 2,67 ml/h; razdaljo med konico in zbiralom od 15,0 cm do 19,5 cm ter napetost od 18,25 kV do 25 kV. Za sprotno, grobo oceno morfologije produktov elektrostatskega sukanja smo uporabili svetlobni mikroskop. Vzorce z najbolj homogenim videzom oz. vlaknatim izgledom smo vrednotili še s SEM, dobljene slike pa smo obdelali s programom ImageJ. Z metodo elektrostatskega sukanja smo žeeli izdelati vlakna nanometrskega premera, saj le taka uspešno oponašajo strukturne elemente naravnega ECM (premer vlaken v naravnem ECM je 50–300 nm) (12). Prav tako so dokazali, da so za optimalen celični odziv potrebna homogena NV, saj že takšna z vozli bistveno slabše spodbudijo celično proliferacijo (33). Slika 17 prikazuje izbrane vzorce produktov elektrostatskega sukanja z vgrajenimi 7,9 % (m/m), 15,2 % (m/m), 28,8 % (m/m) in 52,3 % (m/m) TK (suha snov), glede na celotno maso NV. Glede na morfološke lastnosti izdelanih NV smo za nadaljnje delo izbrali vzorca z različnima masnima deležema vgrajenega TK, ki sta bila brez vozlov in sta imela homogeno porazdelitev debeline vlaken, s premeri v nanometrskem območju:

- 1D ($w_{(TK \text{ v } NV)} = 7,9\%$; premer = $68 \pm 19 \text{ nm}$; Slika 17)
- 2C ($w_{(TK \text{ v } NV)} = 15,2\%$; premer = $81 \pm 19 \text{ nm}$; Slika 17).

**		Sestava: 3,00 g 2 % CS + 2,00 g 3 % PEO Pogoji el. sukanja: U = 20,0 kV, l = 18,0 cm, Φ = 0,6 ml/h Pogoji okolja: T = 27,1 °C, RH = 33 % Premer NV: $82,26 \pm 22,23 \text{ nm}$
----	--	--

1A	 <p>Scanning electron micrograph showing a dense, interconnected network of fibers with numerous small, rounded, protruding particles. A scale bar in the bottom left corner indicates 1 μm.</p> <p>Image parameters: EHT = 1.00 kV, Signal A = SE2, Mix Signal = 0.0000, Mag = 20.00 KX, Date: 9 Jul 2012, WD = 6.5 mm, File Name = CS PEO PL-1a_03.tif</p>	Sestava: 2,85 g 2 % CS + 1,90 g 3 % PEO + 250 μl TK Pogoji el. sukanja: U = 20,1 kV, l = 15,0 cm, Φ = 1,53 ml/h Pogoji okolja: T = 27,1 °C, RH = 33 % Premer NV: $91,96 \pm 127,25$ nm w(TK v NV): 7,9 % (m/m)
1B	 <p>Scanning electron micrograph showing a dense, interconnected network of fibers with numerous small, rounded, protruding particles. A scale bar in the bottom left corner indicates 1 μm.</p> <p>Image parameters: EHT = 1.00 kV, Signal A = SE2, Mix Signal = 0.0000, Mag = 20.00 KX, Date: 9 Jul 2012, WD = 6.2 mm, File Name = CS PEO PL-1b_03.tif</p>	Sestava: 2,85 g 2 % CS + 1,90 g 3 % PEO + 250 μl TK Pogoji el. sukanja: U = 20,1 kV, l = 18,0 cm, Φ = 1,73 ml/h Pogoji okolja: T = 27,1 °C, RH = 33 % Premer NV: $77,21 \pm 129,37$ nm w(TK v NV): 7,9 % (m/m)
1C	 <p>Scanning electron micrograph showing a dense, interconnected network of fibers with numerous small, rounded, protruding particles. A scale bar in the bottom left corner indicates 1 μm.</p> <p>Image parameters: EHT = 1.00 kV, Signal A = SE2, Mix Signal = 0.0000, Mag = 20.00 KX, Date: 9 Jul 2012, WD = 5.1 mm, File Name = CS PEO PL-1c_03.tif</p>	Sestava: 2,85 g 2 % CS + 1,90 g 3 % PEO + 250 μl TK Pogoji el. sukanja: U = 25,0 kV, l = 18,0 cm, Φ = 2,67 ml/h Pogoji okolja: T = 27,1 °C, RH = 33 % Premer NV: $66,95 \pm 57,81$ nm w(TK v NV): 7,9 % (m/m)

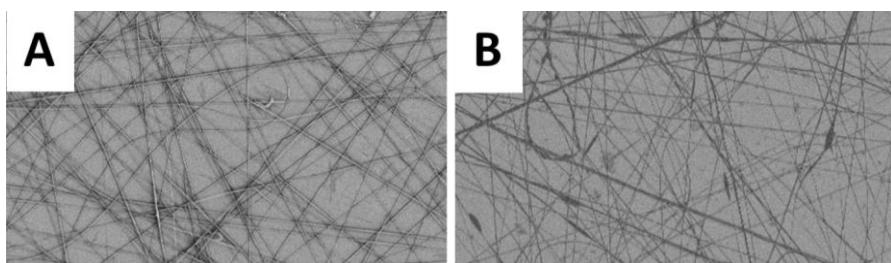
1D	 <p>1 μm EHT = 1.00 kV Signal A = SE2 Mix Signal = 0.0000 Mag = 20.0 KX Date: 5 Jul 2012 WD = 4.2 mm File Name = 01 CS PEO PL-3a_07.tif</p>	Sestava: 2,85 g 2,5 % CS + 1,9 g 3,5 % PEO + 250 µl TK Pogoji el. sukanja: U = 18,25 kV, l = 18,2 cm, Φ = 1,67 ml/h Pogoji okolja: T = 27,0 °C, RH = 34 % Premer NV: $68,43 \pm 18,76$ nm w(TK v NV): 7,9 % (m/m)
2A	 <p>1 μm EHT = 1.00 kV Signal A = SE2 Mix Signal = 0.0000 Mag = 20.00 KX Date: 9 Jul 2012 WD = 6.4 mm File Name = 01 CS PEO PL-3a_03.tif</p>	Sestava: 2,70 g 2 % CS + 1,80 g 3 % PEO + 500 µl TK Pogoji el. sukanja: U = 20,0 kV, l = 18,0 cm, Φ = 1,53 ml/h Pogoji okolja: T = 27,0 °C, RH = 33 % Premer NV: $115,30 \pm 164,86$ nm w(TK v NV): 15,2 % (m/m)
2B	 <p>1 μm EHT = 1.00 kV Signal A = SE2 Mix Signal = 0.0000 Mag = 20.00 KX Date: 13 Jul 2012 WD = 4.3 mm File Name = 01 CS PEO PL-3a_01.tif</p>	Sestava: 2,7 g 2,5 % CS + 1,8 g 3,5 % PEO + 500 µl TK Pogoji el. sukanja: U = 20,0 kV, l = 17,5 cm, Φ = 1,53 ml/h Pogoji okolja: T = 27,0 °C, RH = 34 % Premer NV: $75,12 \pm 21,57$ nm w(TK v NV): 15,2 % (m/m)

2C		<p>Sestava: 2,7 g 2,5 % CS + 1,8 g 3,5 % PEO + 500 μl TK</p> <p>Pogoji el. sukanja: $U = 20,3$ kV, $l = 19,5$ cm, $\Phi = 1,67$ ml/h</p> <p>Pogoji okolja: $T = 26,9$ °C, RH = 34 %</p> <p>Premer NV: $80,92 \pm 18,50$ nm</p> <p>w(TK v NV): 15,2 % (m/m)</p>
3A		<p>Sestava: 2,40 g 2,5 % CS + 1,60 g 3,5 % PEO + 1000 μl TK</p> <p>Pogoji el. sukanja: $U = 18,5$ kV, $l = 16,0$ cm, $\Phi = 1,93$ ml/h</p> <p>Pogoji okolja: $T = 27,3$ °C, RH = 33 %</p> <p>Premer NV: $89,52 \pm 24,27$ nm</p> <p>w(TK v NV): 28,8 % (m/m)</p>
4A		<p>Sestava: 2,70 g 2 % CS + 1,80 g 3 % PEO + 141 mg liofilizata TK</p> <p>Pogoji el. sukanja: $U = 23,8$ kV, $l = 15,5$ cm, $\Phi = 1,67$ ml/h</p> <p>Pogoji okolja: $T = 27$ °C, RH = 33 %</p> <p>Premer NV: $84,10 \pm 37,57$ nm</p> <p>w(TK v NV): 52,3 % (m/m)</p>

Slika 17: Slike SEM izbranih vzorcev NV brez (**) ali z vgrajenimi različnimi masnimi deleži TK in procesni parametri, ki smo jih uporabili pri posameznem elektrostatskem sukanju: (1A-1D) 7,9 % (m/m); (2A-2C) 15,2 % (m/m); (3A) 28,8 % (m/m) in (4A) 52,3 % (m/m).

4.2.2 OBSTOJNOST NANOVLAKEN V VODNEM MEDIJU

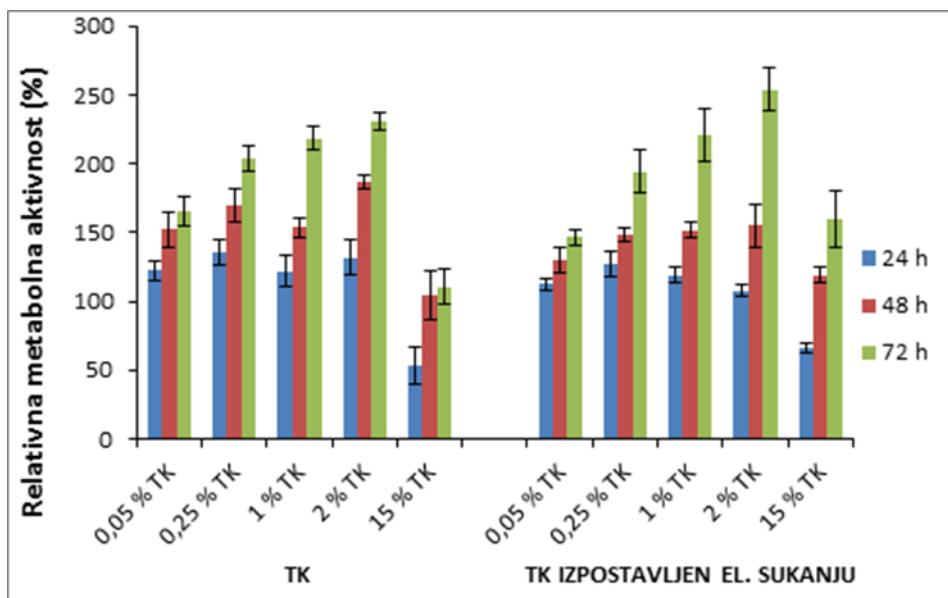
Rane predstavljajo vlažno okolje, zato želimo, da NV v njem čim dlje ohranijo svojo morfologijo in s tem nudijo podporo celicam za njihovo rast. S testom *in vitro* smo preverjali obstojnosti NV v vodnem mediju. Ugotovili smo, da so NV z vgrajenim TK v simuliranem vlažnem okolju rane, ki ga je predstavljal pufer PBS, stabilna, saj se njihova morfologija po 72 h inkubacije praktično ni spremenila (Slika 18). S tem smo dokazali, da je uporaba NV z izbrano sestavo povsem primerna za uporabo pri celjenju ran.



Slika 18: Slike SEM NV z vgrajenim TK: (A) takoj po izdelavi in (B) po 72 h inkubaciji v PBS.

4.2.3 VPLIV ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA NA BIOLOŠKO AKTIVNOST TROMBOCITNEGA KONCENTRATA

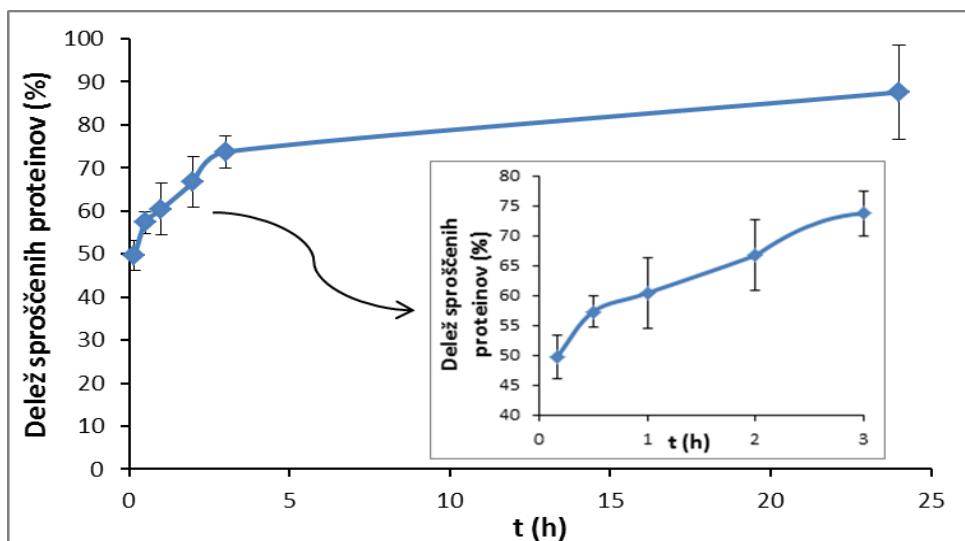
Tekom izdelave NV je vzorec izpostavljen stresnim pogojem, ki bi lahko zmanjšali ali uničili biološko aktivnost TK. Zato smo preverili kako elektrostatsko sukanje vpliva na biološko aktivnost TK. V ta namen smo TK izpostavili elektrostatskemu sukanju in preverili njegov vpliv na metabolno aktivnost celic. Ugotovili smo, da elektrostatsko sukanje nima bistvenega vpliva na biološko aktivnost TK (Slika 19), saj sta bila profila odzivnosti keratinocitov, ki so bili tretirani s TK, predhodno izpostavljenemu elektrostatskemu sukanju in tistih, ki so bili v stiku z intaktnim TK, povsem primerljiva. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je izdelava NV z vgrajenim TK z metodo elektrostatskega sukanja smiselna.



Slika 19: Vpliv TK in TK predhodno izpostavljenega elektrostatskemu sukanju na RMA keratinocitov. Odziv je v obeh primerih podan relativno glede na metabolno aktivnost celic, ki smo jih gojili v mediju brez FBS.

4.2.4 SPROŠČANJE PROTEINOV IZ NANOVLAKNEN

Sproščanje rastnih dejavnikov iz NV je bistvenega pomena za pospeševanje celjenja ran in regeneracijo tkiv. Ker v NV nismo vgradili enega samega rastnega dejavnika, temveč njihovo zmes v obliki TK, smo njihovo sproščanje iz NV ocenili posredno, in sicer z ugotavljanjem sproščanja proteinov. Časovni profil sproščanja proteinov (Slika 20) iz NV smo določili spektrofotometrično s pomočjo umeritvene krivulje (Priloga-Slika P1). Vidimo, da se je kar 70 % proteinov, vgrajenih v NV sprostilo že v prvih treh urah in da se po 24 h sprostijo praktično vsi. Zelo hitro sproščanje proteinov (angl. »burst release«) lahko pripišemo veliki specifični površini NV (velika površina stika med NV in medijem) in hidrofilnosti obeh polimerov iz katerih so ta izdelana (CS in PEO). Hidratacija polimerov povzroči nastanek por v strukturi NV, te pa omogočijo hitro difuzijo vgrajenih proteinov v medij. Glede na rezultate lahko sklepamo, da se bodo rastni dejavniki iz NV zelo hitro sprostili v rano, pri tem pa bodo NV ohranila svojo začetno morfologijo (Slika 18) skozi daljše časovno obdobje in tako zagotavljala podporo za rast celic.



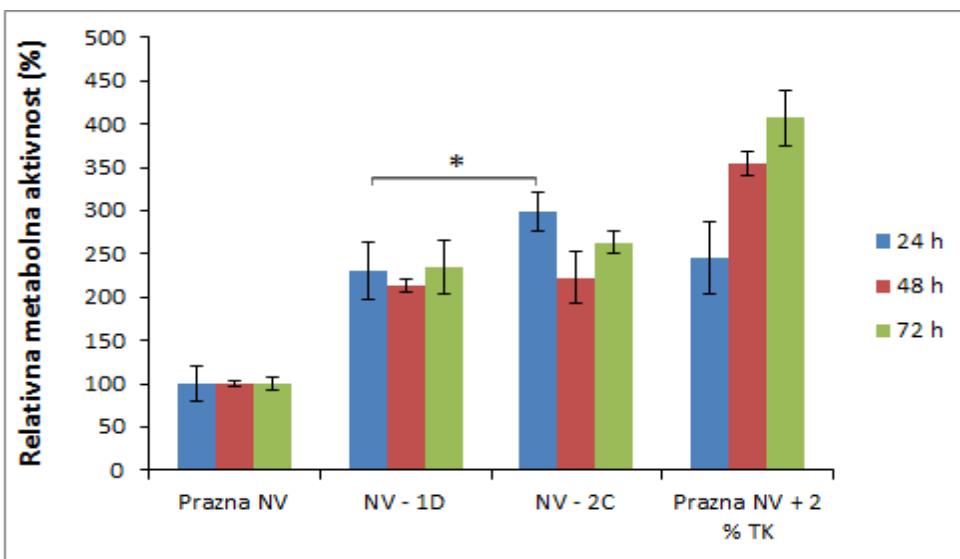
Slika 20: Časovni profil sproščanja proteinov iz NV z vgrajenim TK.

4.3 VPLIV NANOVLAKEN NA ODZIV CELIC

4.3.1 VPLIV NANOVLAKEN NA KERATINOCITE

4.3.1.1 PROLIFERACIJA

Ugotovili smo, da že minimalna količina TK, vgrajenega v NV, spodbudi celično rast (Slika 21). Večji kot je masni delež vgrajenega TK, večja je RMA celic v kulturi, kar vidimo na osnovi rezultatov po 24 h inkubacije. V kasnejših časovnih točkah pa te razlike niso več statistično značilne, kar bi lahko pripisali majhni količini vgrajenih rastnih dejavnikov v NV, ki se očitno porabijo že v prvih 24 h gojenja. To ugotovitev potrjujejo tudi slike preraščenosti gojitenih podlag (Priloga-Slika P2), saj smo najobsežnejšo preraščenost opazili pri tistih celicah, ki so rastle na praznih NV, v mediju z dodanim 2 % TK in tistih, ki smo jih gojili na NV-2C. Povprečna masa NV na krovnem stekelcu je bila le 0,24 mg. Na podlagi mase vzorca NV in njihove sestave, smo izračunali, da smo v celično kulturo z NV z vgrajenim TK vnesli le 0,04 % TK (NV-1D) oz. 0,08 % TK (NV-2C). Tako lahko zaključimo, da je bila visoka RMA celic, ki smo jo določili, v primeru praznih NV z dodanim 2 % TK, posledica vnosa veliko večje količine rastnih dejavnikov, saj smo z NV, ki smo jih skupaj s TK elektrostatsko sukali na krovna stekelca, vnesli v kulturo kar 22-krat (NV-2C) oz. 44-krat (NV-1D) manjšo količino TK. S tem poskusom smo ponovno dokazali, da je vgrajevanje TK v NV z metodo elektrostatskega sukanja ustrezno in da nam omogoča izkoriščanje sinergističnega učinka nanofibrilarne strukture NV in biološke aktivnosti proteinov v TK.



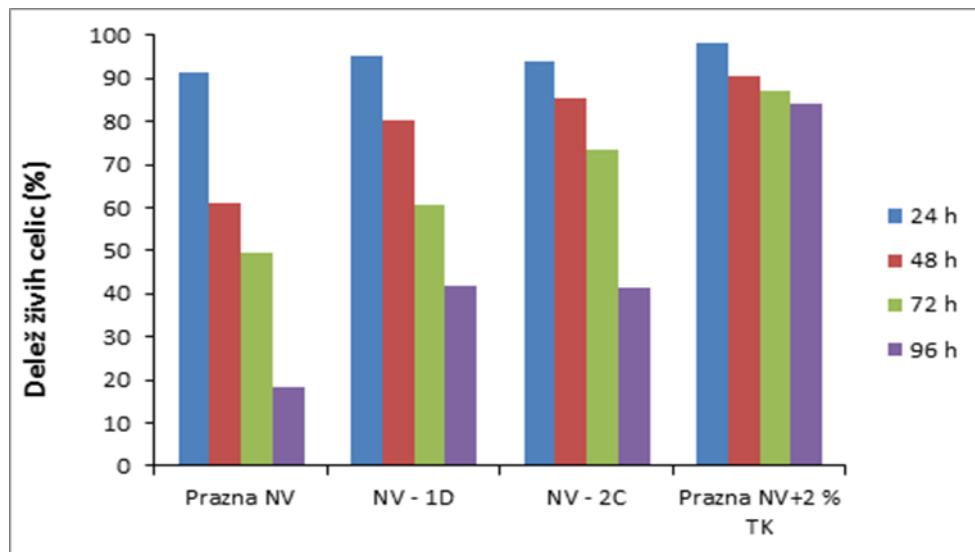
Slika 21: Vpliv NV z/brez vgrajenega TK na RMA keratinocitov. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK (*statistično značilna razlika, $p < 0,05$).

4.3.1.2 PREŽIVETJE

Preživetje smo določali s štejem živih in mrtvih keratinocitov. Celice smo morali pred štetjem najprej ločiti od podlage na kateri so rastle, zato smo jih tripsinizirali. To pa je pri vzorcih kultur z NV predstavljalo problem, saj je bil določen del celic ujet oz. vraščen med NV in jih zato nismo mogli ločiti od podlage niti s podaljšanim časom tripsiniziranja. Zato smo poleg štetja celic v Neubauerjevi komori (celice v suspenziji) uporabili tudi metodo štetja celic v vidnem polju (celice, ki jih nismo uspeli ločiti od podlage). Zavedamo se, da je zaradi kombinacije obeh metod verjetno prišlo do večjih napak, predvsem pri določanju absolutnega števila živih celic.

Rezultati na Sliki 22 kažejo, da celice za dolgotrajno preživetje nujno potrebujejo rastne dejavnike, ki smo jih v medij vnesli bodisi z NV s TK ali z dodatkom samega TK ali FBS v gojitveni medij. Preživetje celic, ki so rastle na praznih NV, je bilo po 24 h skoraj 100 %, nato pa je delež živih celic strmo padel. Zmanjševanje deleža živih celic v kasnejših časovnih točkah pa smo opazili tudi pri tistih, ki smo jih gojili na NV z vgrajenim TK (NV-1D in NV-2C) (Slika 22). Živost keratinocitov, ki so rastli na praznih NV v mediju z 2 % TK pa se je s časom le počasi zmanjševala, kar lahko pripisemo zadostni količini rastnih dejavnikov v mediju. Če primerjamo rezultate preživetja celic gojenih na NV z rezultati tistih, ki so rastle na krovnih stekelcih (Slika 5), vidimo, da je bil delež živih keratinocitov v kulturi z NV, predvsem v kasnejših

časovnih točkah, manjši. Vzrok za tak rezultat se verjetno skriva v težavah s štetjem celic, ki so se vrastla med NV. Glede na rezultate predhodnih raziskav pa bi lahko upravičeno pričakovali, da bo nanotopografija NV stimulirala proliferacijo in s tem delež živih celic v kulturi (33).

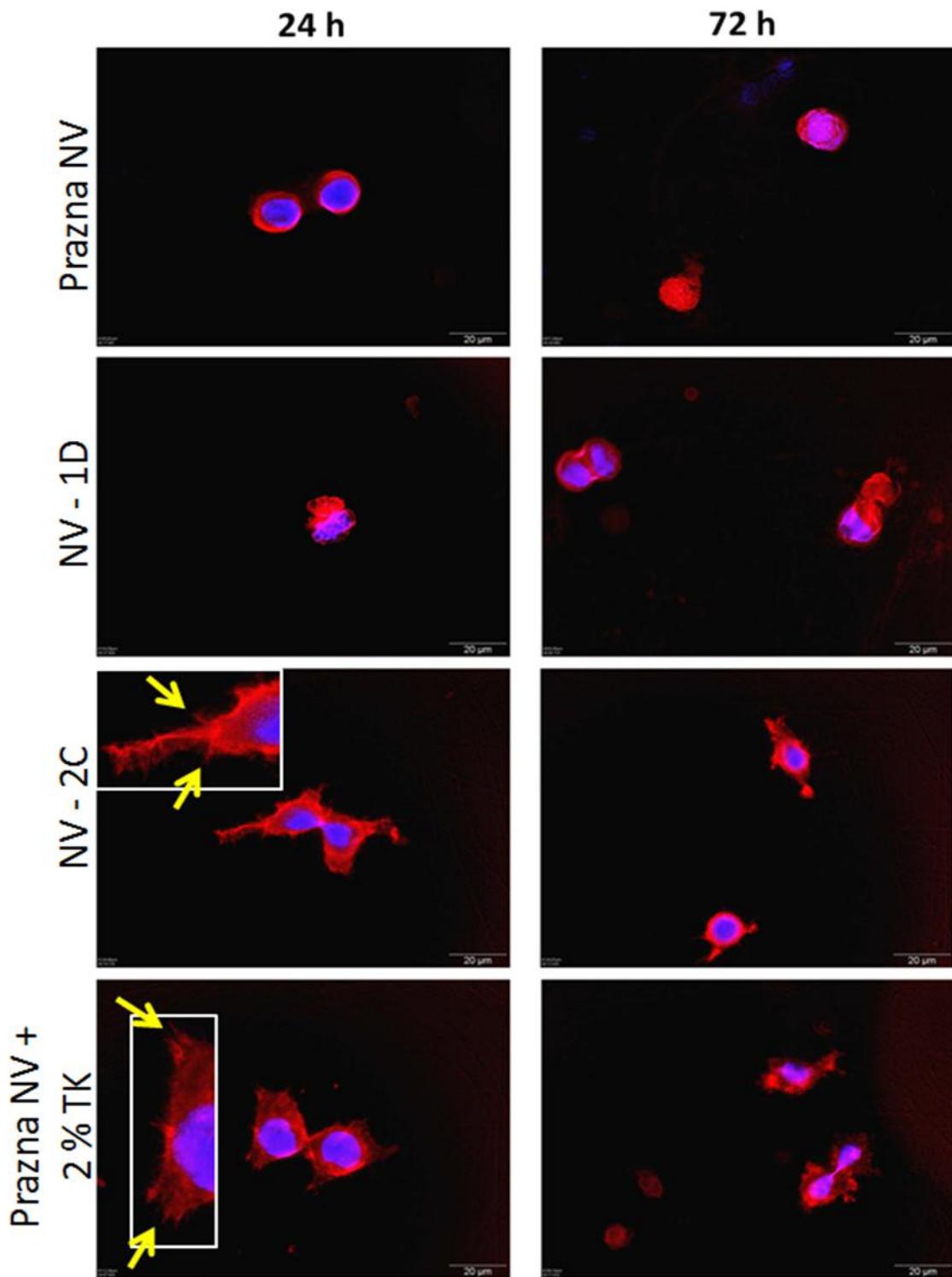


Slika 22: Vpliv različnih NV na delež živih keratinocitov v kulturah. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK (*statistično značilna razlika, $p < 0,05$).

4.3.1.3 MORFOLOGIJA

Ugotovili smo, da je morfologija keratinocitov, ki so rastli na praznih NV ali na NV z nižjo količino vgrajenega TK (NV-1D) kroglasta (Slika 23) in primerljiva s tisto, ki smo jo opazili pri celicah, ki so rastle v odsotnosti rastnih dejavnikov (Slika 8). Ob vnosu večje količine rastnih dejavnikov z NV (NV-2C) ali ob vnosu samega TK (2 %) v kulturo celic, ki je rastla na praznih NV, pa je bila oblika celic bolj razpotegnjena, a še vedno manj kot v primeru keratinocitov, ki smo jih gojili na stekleni podlagi, v mediju z dodatkom rastnih dejavnikov (Slika 8). Pri tem lahko opazimo tudi številčnejše celične izrastke, s katerimi se celice medsebojno povezujejo in pritrjujejo na NV (Slika 23). Pravilnejšo morfologijo celic v primeru višjih koncentracij TK lahko pripisemo večji količini rastnih dejavnikov, potrebnih za normalno rast keratinocitov. Kroglasta morfologija je lahko posledica mehkejše podlage na kateri rastejo celice, kar je posledica nabrekanja NV ob stiku z rastnim medijem. Dodaten vzrok zanjo pa je lahko tudi mehansko ujetje delov keratinocitov v pore med posameznimi NV (33). Kroglasta oblika celic je lahko posledica prenizke koncentracije TK v mediju, saj smo že pri

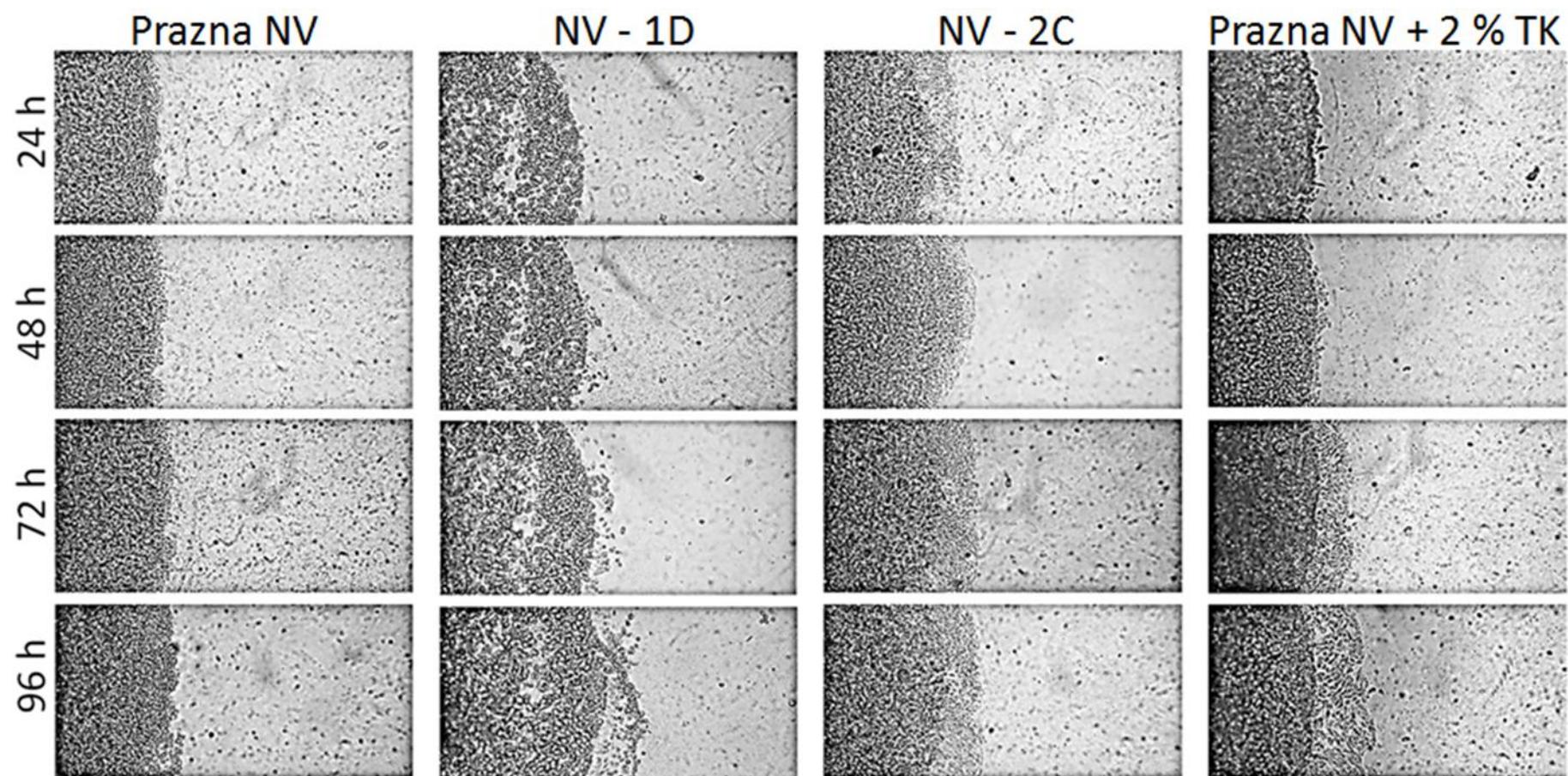
preučevanju vpliva samega TK dokazali, da postane v njegovi odsotnosti ali če je njegova koncentracija prenizka, morfologija celic kroglasta (Slika 8).



Slika 23: Vpliv različnih NV na morfologijo keratinocitov po 24 in 72 h inkubacije. Celična jedra smo obarvali z barvilkom Hoechst 33342 (modro), aktinske filamente pa s Faloidin rodaminom (rdeče). Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK.

4.3.1.4 MOBILNOST

Najmanjšo mobilnost smo opazili pri tistih keratinocitih, ki so rastli na praznih NV. V tem primeru so bile celice praktično popolnoma nemobilne (Slika 24). Vzrok za to je bila odsotnost rastnih dejavnikov v mediju. V predhodnih poskusih smo natančno dokazali, da je za to odgovorna prav odsotnost le-teh (Slika 9), poleg tega pa pride pri tistih celicah, ki rastejo na NV, do njihove zagozditve oz. njihovega vraščanja med NV. Pri celicah, ki smo jih gojili na NV z vgrajenim TK, prisotni rastni dejavniki spodbudijo njihovo proliferacijo, kar se, kljub mehanskemu zagozdenju celic, odraža v vsaj minimalni mobilnosti (vzorca NV-1D in NV-2C). Mobilnost tistih celic, ki smo jih gojili na praznih NV v prisotnosti medija z 2 % TK je bila največja. To lahko pripisemo tudi največjemu obsegu proliferacije tako tretiranih celic (Slika 24), ki je posledica zadostne količine vnesenih rastnih dejavnikov.

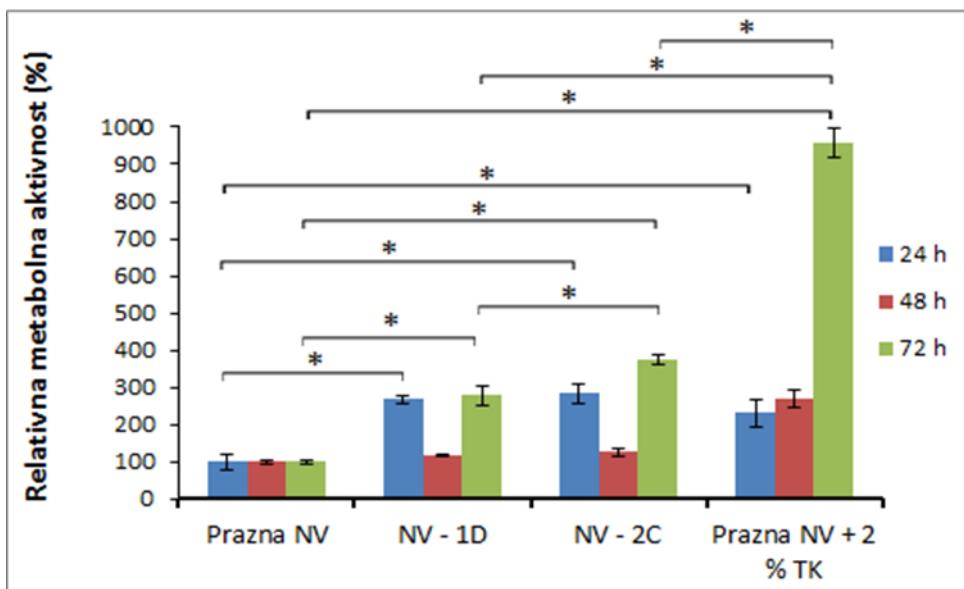


Slika 24: Vpliv različnih NV na mobilnost keratinocitov. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK.

4.3.2 VPLIV NANOVLAKEN NA FIBROBLASTE

4.3.2.1 PROLIFERACIJA

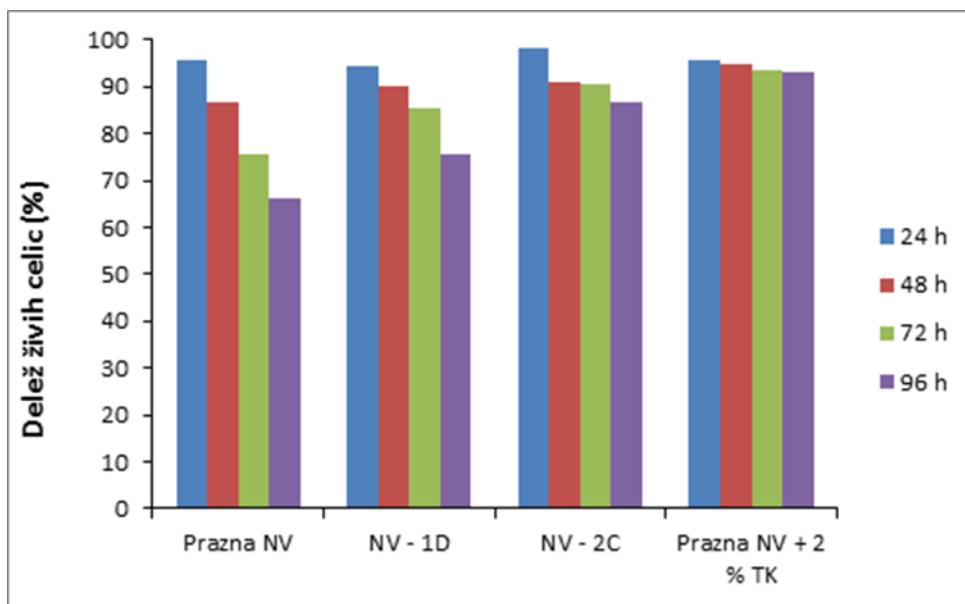
Z vnosom rastnih dejavnikov, bodisi v obliki NV z vgrajenim TK ali z njegovim dodatkom neposredno v medij, je bila RMA fibroblastov po 24 in 72 h gojenja statistično značilno večja od RMA tistih celic, ki so rastle na praznih NV (Slika 25). Že minimalne količine rastnih dejavnikov, ki smo jih v celične kulture vnesli z NV-1D ali NV-2C so ugodno vplivale na rast fibroblastov, kar potrjujejo tudi slike preraščenosti (Priloga-Slika P3). Večja kot je bila količina vgrajenega TK, večja je bila RMA celic, čeprav smo statistično značilne razlike med vzorcema ugotovili šele po 72 h. V obeh vzorcih smo opazili zmanjšanje RMA celic po 48 h. Tega ne znamo razložiti, upad aktivnosti pa je bil viden pri vseh ponovitvah tega poskusa (Slika 25). Kljub temu, da smo z vzorcema NV z vgrajenim TK povečali RMA fibroblastov, pa je bila ta po 72 h v obeh primerih statistično značilno nižja kot v primeru celic, ki smo jih gojili na praznih NV v mediju z 2 % TK. Vzrok za to bi lahko bil v tem, da smo z NV, z vgrajenim TK, ki smo jih elektrostatsko sukali na krovna stekelca, v celične kulture vnesli kar 22-krat (NV-2C) oz. 44-krat (NV-1D) manjšo količino rastnih dejavnikov kot jih je vseboval medij z 2 % TK. Velik porast RMA celic v kulturi, gojeni v mediju z 2 % TK po 72 h je bil viden tudi zaradi velikega upada le-te v kontrolnih celicah (odmiranje). Kontrolne celice, ki so rastle na praznih NV, so po 72 h inkubacije verjetno porabile že vse zaloge rastnih dejavnikov.



Slika 25: Vpliv različnih NV na RMA fibroblastov. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK (*statistično značilna razlika, $p < 0,05$).

4.3.2.2 PREŽIVETJE

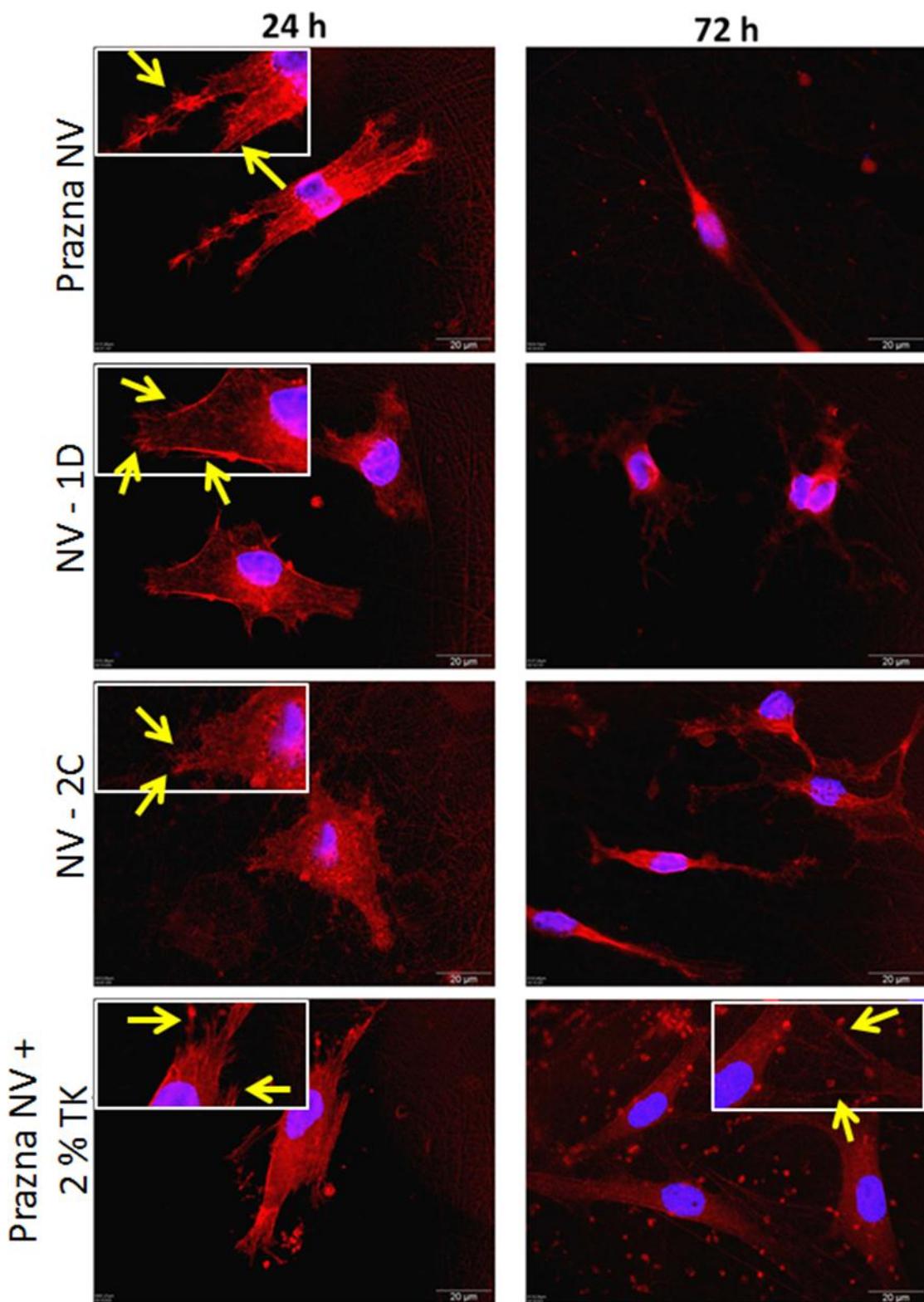
Tudi v primeru fibroblastov smo pri določanju števila celic s štetjem pod svetlobnim mikroskopom naleteli na enako težavo, kot pri keratinocitih, gojenih na NV. Na Sliki 26 vidimo, da je bil delež živih celic v času poskusa najbolj konstanten v vzorcu kulture, v kateri smo fibroblaste gojili na praznih NV, v medij pa dodali 2 % TK, saj so bile v tem primeru izpostavljene največji koncentraciji rastnih dejavnikov. Naši rezultati kažejo, da je TK, vgrajen v NV, ugodno vplival na preživetje fibroblastov, saj se je večji delež živih celic ohranil dlje časa kot v primeru kontrolne kulture na praznih NV. V primeru NV-2C z masnim deležem vgrajenega TK 0,08 % je delež živih celic pričakovano nekoliko večji kot v primeru NV-1D z 0,04 % TK. Če primerjamo deleže živih fibroblastov, ki so rastli na praznih NV, z deležem živih fibroblastov, ki smo jih gojili na steklu (Slika 12) lahko opazimo, da je bil ta večji v prvem primeru (na praznih NV). Pri keratinocitih pa je bil vpliv NV ravno nasproten, saj je bil delež živih keratinocitov, gojenih na NV, manjši od tistega v kulturah, ki so rastle na steklu. Tako v primeru fibroblastov kot v primeru keratinocitov, pa se je delež živih celic gojenih na NV povečal, če so te rastle v prisotnosti rastnih dejavnikov.



Slika 26: Vplivi različnih NV na delež živih fibroblastov v kulturah. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK.

4.3.2.3 MORFOLOGIJA

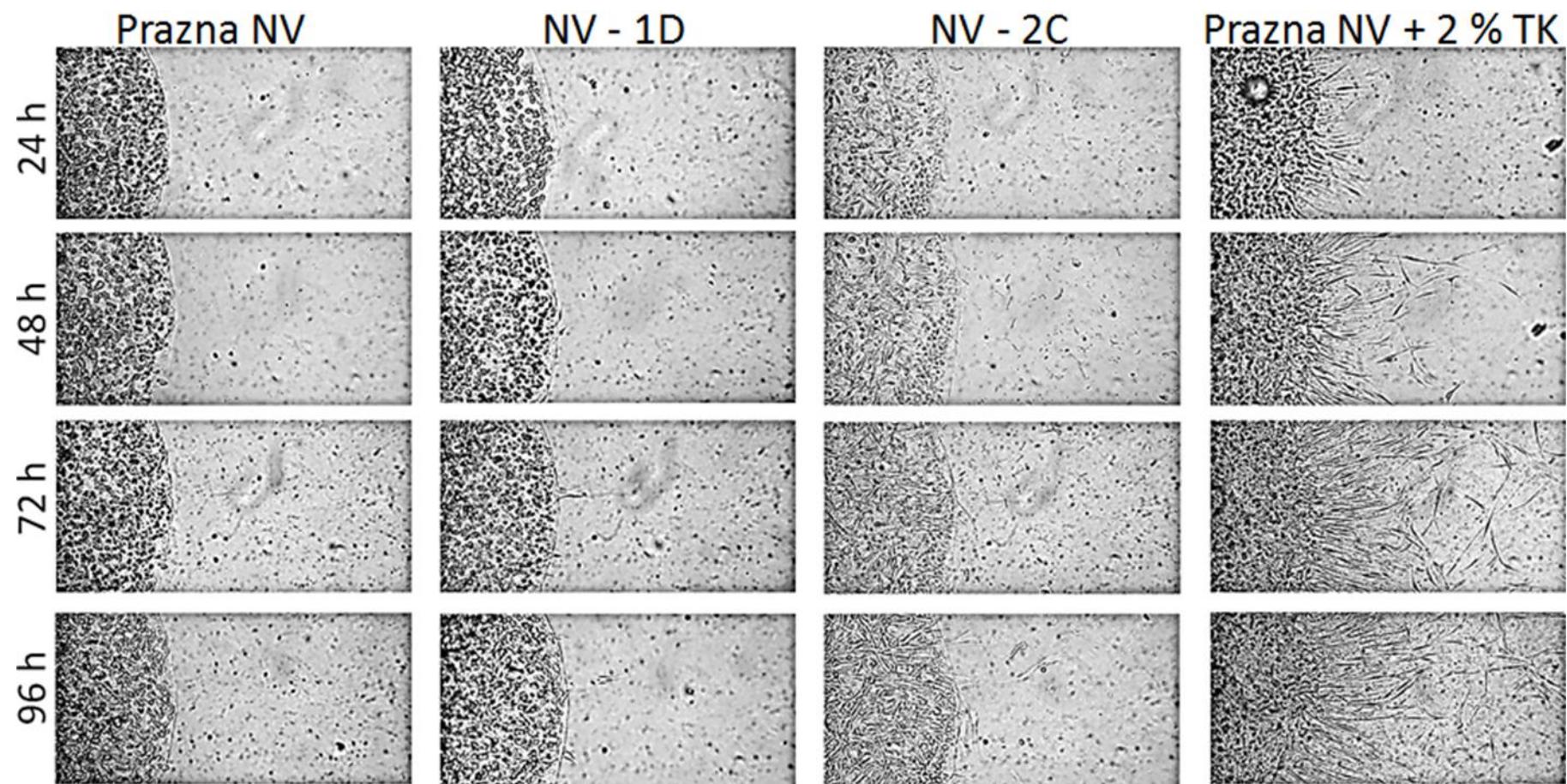
Na Sliki 27 lahko vidimo, da je bila morfologija fibroblastov, ki so rastli na NV po 24 h praktično neodvisna od količine rastnih dejavnikov prisotnih v mediju. Fibroblasti so se izrazito razrastli po podlagi in tvorili številne izrastke, s katerimi so se pritrjevali na NV oz. se povezovali s sosednjimi celicami. V nasprotju s fibroblasti, pa smo morfološke spremembe keratinocitov zaznali že po 24 h. Razliko v občutljivosti obeh vrst celic na prisotnost rastnih dejavnikov v mediju bi lahko pripisali različno hitremu metabolizmu. Ta je pri keratinocitih hitrejši, zato v njihovih kulturah pride do pomanjkanja rastnih dejavnikov v mediju. Po 24 h gojenja smo pri vseh fibroblastih, ki so rastli na NV, opazili urejene aktinske filamente, po 72 h pa se je značilna morfologija ohranila le še pri tistih, ki so rastli na praznih NV, v mediju z 2 % TK. Pri ostalih celičnih vzorcih, pa je izrazitost morfoloških sprememb naraščala z upadanjem količine rastnih dejavnikov v mediju. Oblika celic je namreč postala manj razraščena, hkrati pa v njih nismo več opazili urejenosti aktinskih filamentov.



Slika 27: Vpliv različnih NV na morfologijo fibroblastov po 24 in 72 h inkubacije. Celična jedra smo obarvali z barvilkom Hoechst 33342 (modro), aktinske filamente pa s Faloidin rodaminom (rdeče). Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK.

4.3.2.4 MOBILNOST

Rezultati testa celične mobilnosti kažejo, da so bili tudi fibroblasti, ki so rastli na NV le delno mobilni (Slika 28). Slaba mobilnost je posledica njihovega delnega vraščanja med NV. V primeru rasti na praznih NV pa je njihova slaba mobilnost tudi posledica pomanjkanja rastnih dejavnikov. Če primerjamo mobilnost fibroblastov, ki so rastli na steklu (Slika 16), z mobilnostjo tistih, ki so rastli na praznih NV, vidimo, da so bili fibroblasti na praznih NV popolnoma nemobilni, medtem ko smo v primeru celičnih kultur na steklu opazili vsaj minimalno mobilnost. Tak rezultat je posledica že omenjenega vraščanja fibroblastov v NV. Z vgradnjo TK v NV pa smo uspeli le malo izboljšali celično mobilnost, saj je učinek celičnega vraščanja očitno prevladal nad učinkom proliferacije, ki so jo spodbudili rastni dejavniki. Šele z dodatkom 2 % TK v medij, s čimer smo zagotovili 22-krat oz. 44-krat večjo koncentracijo rastnih dejavnikov kot v primeru NV z vgrajenim TK, smo opazili izrazito povečano mobilnost celic. Zato predviedevamo, da je mobilnost prav odraz večjega vnosa rastnih dejavnikov, ki izrazito pospešijo celično proliferacijo in razraščanje.



Slika 28: Vplivi različnih NV na mobilnost fibroblastov. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK.

5 SKLEP

Ugotovili smo, da TK stimulira rast keratinocitov in fibroblastov in je zato primeren vir rastnih dejavnikov za uporabo na področju celjenja ran. Odziv keratinocitov na prisotnost TK v mediju je bil povsem primerljiv s tistim, ki smo ga dosegli z običajnim rastnim medijem (10 % FBS). Pri fibroblastih pa z dodatkom TK nismo dosegli povsem primerljivega celičnega odziva kot v primeru, ko so celice rastle v običajnem mediju s 15 % FBS. Za spodbujanje celične rasti je bila v primeru obeh celičnih linij optimalna koncentracija TK v mediju 2 % (v/v).

Zaradi pozitivnih učinkov TK na celično rast smo v nadaljevanju z metodo elektrostatskega sukanja izdelali polimerna NV z vgrajenim TK. Polimerna NV brez vozlov smo uspeli izdelati iz zmesi polimerov CS/PEO 50:50 (m/m). Z vgrajevanjem TK vanje pa smo želeli še dodatno spodbuditi biološke odzive kožnih celic. Dokazali smo, da postopek elektrostatskega sukanja ne vpliva na biološko aktivnost TK, zato je izdelava NV, ki vsebujejo rastne dejavnike smiselna.

Dokazali smo, da naša NV v vodnem mediju ohranijo svojo morfologijo, kar je zelo pomembno za njihovo morebitno uporabo pri celjenju ran. Analiza sproščanja proteinov iz NV je pokazala, da polimeri, ki smo jih uporabili za njihovo izdelavo, ne omogočajo zadržanega sproščanja vgrajenih proteinov, zato bodo na tem področju potrebne še nadaljne raziskave. Zadržano sproščanje rastnih dejavnikov iz NV bi verjetno lahko dosegli z uporabo bolj hidrofobnih polimerov ali z izdelavo dvoslojnih NV.

Z biološkim vrednotenjem v kulturah kožnih celic smo potrdili, da so NV ustrezni dostavni sistem za rastne dejavnike, saj se je pri tem pokazal sinergistični učinek same nanotopografije NV in delovanja rastnih dejavnikov, ki smo jih v NV vgradili v obliki TK. Za bolj izražen celični odziv bi verjetno morali v NV vgraditi večje količine TK, kar bi lahko dosegli z vgrajevanjem njegovega liofilizata, in ne lizata. Izdelana polimerna NV z vgrajenim TK, bi z optimizacijo strukture in sestave, potencialno lahko uporabljali za celjenje kroničnih ran, saj nanofibrilarna struktura dobro oponaša gradnike ECM. Rastni dejavniki TK vgrajeni v NV pa bi lahko nadomestili fiziološke, ki so potrebni za normalno celjenje rane, s čimer bi pospešili nastajanje zdravega tkiva preko stimulacije normalne regenerativne kaskade.

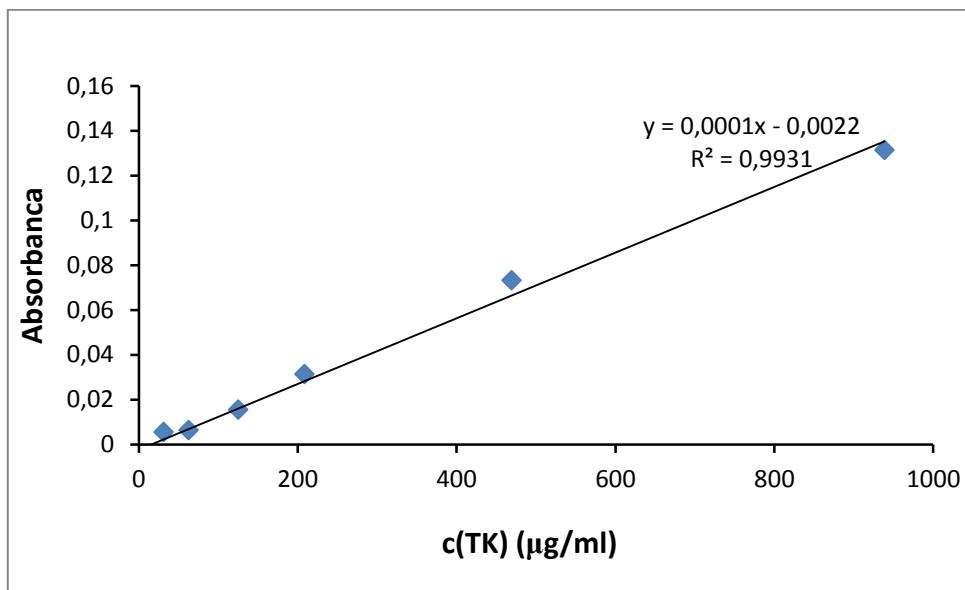
6 LITERATURA

- 1 Smrkolj V: Biologija celjenja prekinjenega tkiva, Žalec, Ljubljana, 1995: 36-49.
- 2 Broughton G, Janis J.E, Attinger C.E: The basic science of wound healing. Plast Reconstr Surg 2006; 117: 12-34.
- 3 Mutsaers S.E, Bishop J.E, McGrouther G, Laurent G.J: Mechanism of tissue repair: from wound healing to fibrosis. Int J Cell Biol 1997; 29: 5-17.
- 4 Cegnar M, Baumgartner S, Kristl J: Vlažna oskrba rane s sodobnimi oblogami. Med Razgl 2007; 46: 235-247.
- 5 Winfield J.H, Winfield A.J: Wound management, stoma and incontinence products, 3rd ed, Churchill Livingstone, 2004: 313-25.
- 6 Ovington L.G: Advances in wound dressings. Clin Dermatol 2007; 25: 33–38.
- 7 Yudanova T.N, Reshetov I.V: Modern wound dressings: manufacturing and properties. Pharm Chem J 2006; 40: 24-31.
- 8 Ramakrishna S, Fujihara K, Wee-Eong T, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R: Electrospun nanofibers: solving global issues. Mater Today 2006; 9: 40-50.
- 9 Bhardwaj N, Kundu S.C: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnol Adv 2010; 28: 325-347.
- 10 Gupta P, Elkins C, Long T, Wilkes G.L: Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. Polymer 2005; 46: 4799-4810.
- 11 Venugopal J, Low S, Choon A.T, Ramakrishna S: Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. J Biomed Mater Res 2008; 84: 34-48.
- 12 Bowlin G.L: Enhanced porosity without compromising structural integrity: The nemesis of electrospun scaffolding. J Tissue Sci Eng 2011; doi:10.4172/2157-7552.1000103e.
- 13 Pelipenko J, Kristl J, Rošic R, Kocbek P, Baumgartner S: Interfacial rheology: an overview of measuring techniques and its role in dispersions and electrospinning. Acta Pharm 2012; 62: 123-140.
- 14 Sell S.A, Wolfe P.S, Erickson J.J, Simpson D.G, Bowlin G.L: Incorporating platelet-rich plasma into electrospun scaffolds for tissue engineering applications. Tissue Eng Pt A 2011; 17: 2723-2737.

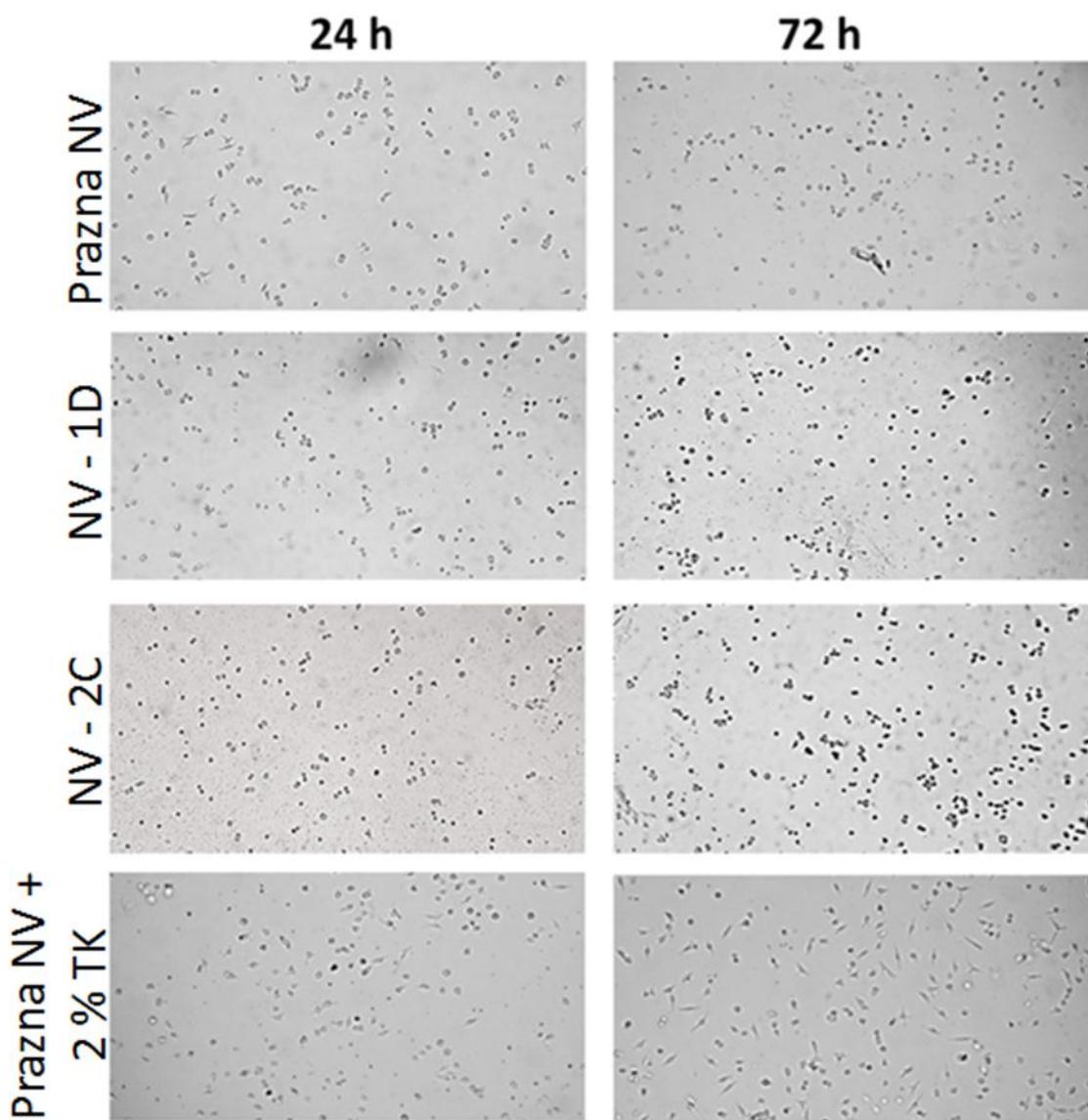
- 15 Wolfe P.S, Sell S.A, Erickse J.J, Simpson D.G, Bowlin G.L.: The creation of electrospun nanofibers from platelet rich plasma. *J Tissue Sci Eng* 2: 107. doi: 10.4172/2157-7552.1000107.
- 16 Beachleya V, Wena X: Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog Polym Sci* 2010; 35: 868-892.
- 17 Foster T, Puskas B.L, Mandelbaum B.R, Gerhard M.B, Rodeo S.A: Platelet-rich plasma, From basic science to clinical applications. *AJSM* 2009; 37: 2259-2272.
- 18 Boswell S.G, Cole B.J, Sundman E.A, Vasili Karas B.S, Fortier L.A: Platelet-rich plasma: A Milieu of bioactive factors. *Arthroscopy: The journal of arthroscopic & related surgery* 2012; 28: 429-439.
- 19 Caceres M, Hidalgo R, Sanz A, Martinez J, Riera P, Smith P.C: Effect of platelet-rich plasma on cell adhesion, cell migration and myofibroblastic differentiation in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2008; 79: 714-720.
- 20 Wang H.L, Avila G: Platelet rich plasma: Myth or reality?. *Eur J Dent* 2007; 1: 192-194.
- 21 Chen F, Zhang M, Wu Z: Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomater* 2010; 31: 6279-6308.
- 22 Piyush K: Delivery of growth factors for tissue regeneration and wound healing. *Biodrugs* 2012; 26: 163-175.
- 23 Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I: Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 37-41.
- 24 Yoon J.J, Chung H.J, Lee H.J: Heparin-immobilized biodegradable scaffolds for local and sustained release of angiogenic growth factors. *J Biomed Mater Res A* 2006; 79: 934-942.
- 25 Kodama N, Nagata M, Tabata Y: A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation. *Bone* 2009; 44: 699-707.
- 26 Zhang J, Postovit L.M, Wang D: In situ loading of basic fibroblasts growth factor within porous silica nanoparticles for a prolonged released. *Nanoscale Res Lett* 2009; 4: 1297-1302.
- 27 Skaat H, Ziv O, Shahar A: Enhancement of the growth and differentiation of nasal olfactory mucosa cells by the conjugation of growth factors to functional nanoparticles. *Bioconjug Chem* 2011; 22: 2600-2610.

- 28 Pulavendran S, Rose C, Mandal A.B: Hepatocyte growth factor incorporated chitosan nanoparticles augment the differenetiartion of stem cell into hepatocytes for the recovery of liver cirrhosis in mice. *J Nanotechnol* 2011; 9: 15.
- 29 Park K.H, Lee D.H, Na K: Transplantation of poly(N-isopropylacrylamide-co-vinylimidazole) hydrogel constructs composed of rabbit chondrocytes and growth factor-loaded nanoparticles for neocartilage formation. *Biotechnol Lett* 2009; 31: 337-346.
- 30 Koria P, Yagi H, Kitagawa Y: Self-assembling elastin-like peptides growth factor chimeric naoparticles for the treatment of chronic wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 1034-1039.
- 31 Freitas, Margarida. Combination of platelet-rich plasma and nanofibers application in wound healing: integrated masters in pharmaceutical sciences. Diplomska naloga. Ljubljana, 2012.
- 32 Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J: Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release* 2007; 120: 18-26.
- 33 Pelipenko J, Kocbek P, Govendarica B, Rošic R, Baumgartner S, Kristl J: The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 84: 401-411.
- 34 Mehta S, Watson J.T: Platelet rich concentrate: basic science and current clinical application. *J Orthop Trauma* 2008; 22: 433-438.
- 35 <http://bioinformatics.istge.it/hypercldb/totcl5235.html> (julij, 2013)
- 36 http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=90011807&collection=ecacc_gc (julij, 2013)

7 PRILOGE

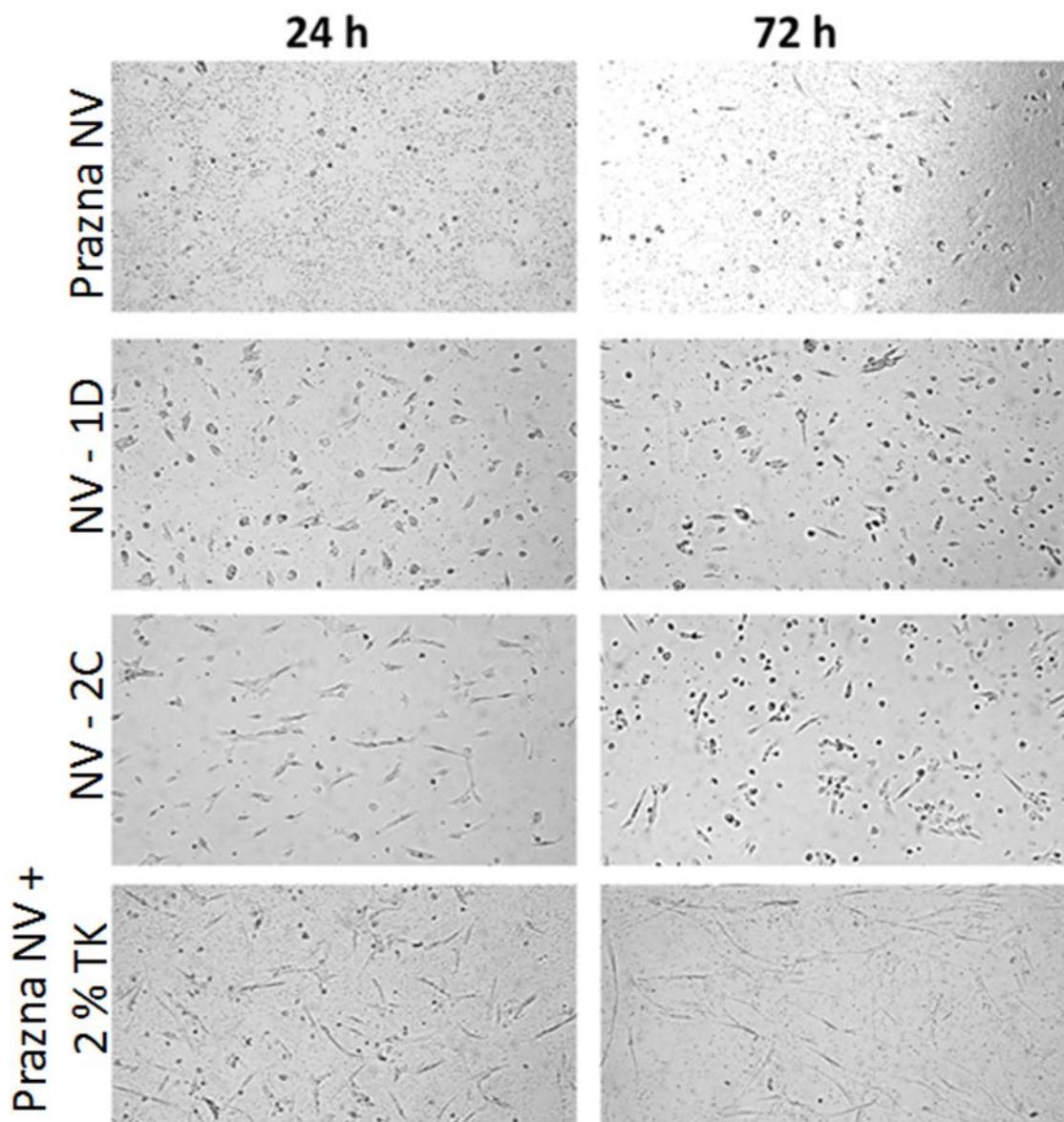


Slika P1: Umeritvena krivulja za spektrofotometrično določanje količine proteinov v TK po Bradfordu; C(TK) označuje koncentracijo suhe snovi v vzorcu TK.



Slika P2: Preraščenost rastne podlage s keratinociti, v odvisnosti od vrste NV in prisotnosti/odsotnosti TK. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK.

Zaradi neravne podlage in zaradi delnega prodiranja celic v globlje plasti nanofibrilarne strukture, je potrebno opozoriti, da s slikanjem keratinocitov zgolj v eni ravnini ne moremo zajeti vseh celic.



Slika P3: Preraščenost rastne podlage s fibroblasti, v odvisnosti od vrste NV in prisotnosti/odsotnosti TK. Vzorec NV-1D predstavlja NV z masnim deležem vgrajenega TK 0,04 %, NV-2C pa vzorec z 0,08 % TK.

Zaradi neravne podlage in zaradi delnega prodiranja celic v globlje plasti nanofibrilarne strukture, je potrebno opozoriti, da s slikanjem fibroblastov zgolj v eni ravnini ne moremo zajeti vseh celic.