Undersökning av brosktillväxt i hydrogeler med användning av histokemiska och immunohistokemiska färgningsmetoder

A study to analyze cartilage growth in hydrogels with histochemical and immunohistochemical staining methods.

Författare: Hamida Alaloush

Vårtermin 2024

Examensarbete: Grundnivå,15 högskolepoäng

Huvudområde: Biomedicinsk laboratorievetenskap

Biomedicinska analytikerprogrammet, inriktning laboratoriemedicin.

Institutionen för hälsovetenskaper, Örebro universitet.

Handledare: Mikael Ivarsson, lektor, Örebro Universitet

Examinator: Gabriella Lillsunde-Larsson, lektor, Örebro universitet

Sammanfattning

Ledbroskskador är svåra att läka på grund av låg regenerationsförmåga hos kondrocyter och brist på blodkärl i brosket. Olika kirurgiska tekniker används för att bota ledbroskskador men ett effektivt sätt inte har funnits än. Matrix-Assisted Chondrocyte Implantation (MACI) är baserad på att odla friska celler i hydrogeler och invänta broskbildning i dessa. Sedan implanteras det nya brosket i patienten. Syftet med studien var att undersöka brosktillväxt i kitosan-baserade hydrogeler med immunohistokemiska och histokemiska metoder samt att mäta cell-viabilitet i hydrogelerna med Cell Titer Blue Assay. Kondrocyterna odlades i kitosan- baserade hydrogeler i fem veckor. Vid åtta tidpunkter fixerades hydrogelerna för immun/histokemisk analys, samt sparades CellTiter-Blue-reaktionsblandning för viabilitetsmätning. CellTiter Blue-mätningen visade ökning av antalceller i hydrogelerna över en 27-dagarsperiod. Efter 34 dagar sågs ingen signifikant förändring i förhållande till 27 dagar. Sirius Red visade efter 34 odlingsdagar begränsad kollagen bildning i hydrogelerna medan Hematoxylin-eosinfärgningar visade det efter 27 odlingsdagar. Aggrekan bildning kunde inte påvisas i hydrogelerna med Alcian blue eller Safranin-O. Immunohistokemi med antikroppar mot-kollagen II eller aggrekan kunde inte påvisa dessa bindvävskomponenter i hydrogelerna. Mindre porstorlek i hydrogelerna kan vara ett sätt att förbättra broskbildning. Optimering av antigen avmaskning för att kunna påvisa antigen i både hydrogelerna och kontroller diskuteras.

Nyckelord: kitosan, CellTiterBlue, hydrogel, Sirius red, kollagen II.

Abstract

Damaged articular cartilage has a limited regenerative ability due to poor blood supply. Chondrocytes, are the main cells which are responsible for forming new cartilage, play a crucial role in this process. An effective therapy to heal damaged cartilage has not yet been found. Matrix-assisted chondrocyte implantation (MACI) represents new methods to heal cartilage injuries by seeding chondrocytes in hydrogels to grow new cartilage in vitro, which can later be implanted in the patient. The purpose of this study was to seed chondrocytes in Chitosan-based hydrogels in five weeks and investigate cartilage growth in hydrogels with immunohistochemical and histochemical methods and to measure cell viability in the hydrogels. Cell viability measurement showed an increase in the number of cells over 27 days in culture. After 34 days, there was no significant difference in relation to 27 days. Sirius red and hematoxylin-eosin stain revealed limited collagen formation in the hydrogels. Alcian blue or Safranin O could not reveal aggrecan formation in hydrogels. Immunohistochemistry with antibodies against collagen II or aggrecan could not reveal formation of aggrecan or collagen in the hydrogels. Smaller pore size can be a way to improve cartilage formation. Optimizing antigen retrieval methods to ensure that antibodies can effectively locate antigens are discussed.

Keywords: Chitosan, hydrogel, Sirius Red, collagen II, CellTiterBlue.

Innehållsförteckning

Introduktion 1
Brosk 1
Ledbrosk skador 3
Behandlningar för ledbroskskador 3
Hydrogeler 4
Kitosan 4
Odling av broskceller i hydrogeler 5
Cell-viabilitet 5
Histokemiska färgningsmetoder för brosk 5
Immunohistokemiska färgningar 6
Antigen avmaskning 8
Syfte 9
Metod och material 10
Isolering av kondrocyter från hyalint brosk 10
Odling och räkning av kondrocyter 10
Cell-viabilitet 11
Fixering av vävnaden och dehydrering före immun-/histokemi 13
Paraffininbäddning 13
Snittning 13
Histokemiska färgmetoder 14
Immunohistokemiska färgmetoder 15
Bedömning och tolkning av resultat 16
Resultat 17
Struktur hos hydrogeler 17
Cell viabilitet 17
Histokemiska färgningar 18
Immunohistofärgningar 21
Mekaniska egenskaper 22
Diskussion 24
För vidare studier 26
Slutsats 27
Referenser 28
Bilaga 1. 30

Introduktion

Brosk

Brosk är en viktig stödjevävnad i kroppen och förekommer i olika former beroende på plats i kroppen. Brosk ger benändarna släta ytor, vilket skyddar närliggande benen vid ledrörelse och belastning, och stödjer speciella områden såsom trakea och esofagus. Det finns tre olika typer av brosk; hyalint brosk, fibröst brosk och elastiskt brosk. Hyalint brosk omger benändarna i lederna, vilket skapar en slät, fast och flexibel benyta som gör att benens ytor lätt glider mot varandra (1). Ledbrosk är en väl organiserad, porös genomtränglig vävnad som är ansvarig för tryckabsorption under belastning. Hyalint brosk består av kondrocyter och extracellulär matrix (ECM). ECM består mest av vatten, kollagenfibrer och proteoglykaner samt icke-kollagena proteiner och glykoproteiner i mindre mängder (figur 1). Alla de här komponenterna är viktiga för att vatten skall kvarstå i ECM. Vid belastning pressas vattnet ut ur leden på grund av att ECM är poröst och genomsläppligt och för att minska belastningen absorberar proteoglykaner vattnet tillbaka till leden (2). Broskets semi-rigiditet beror på närvaro av proteoglykaner som varierar i mängd och karaktär mellan olika broskstyper (1).

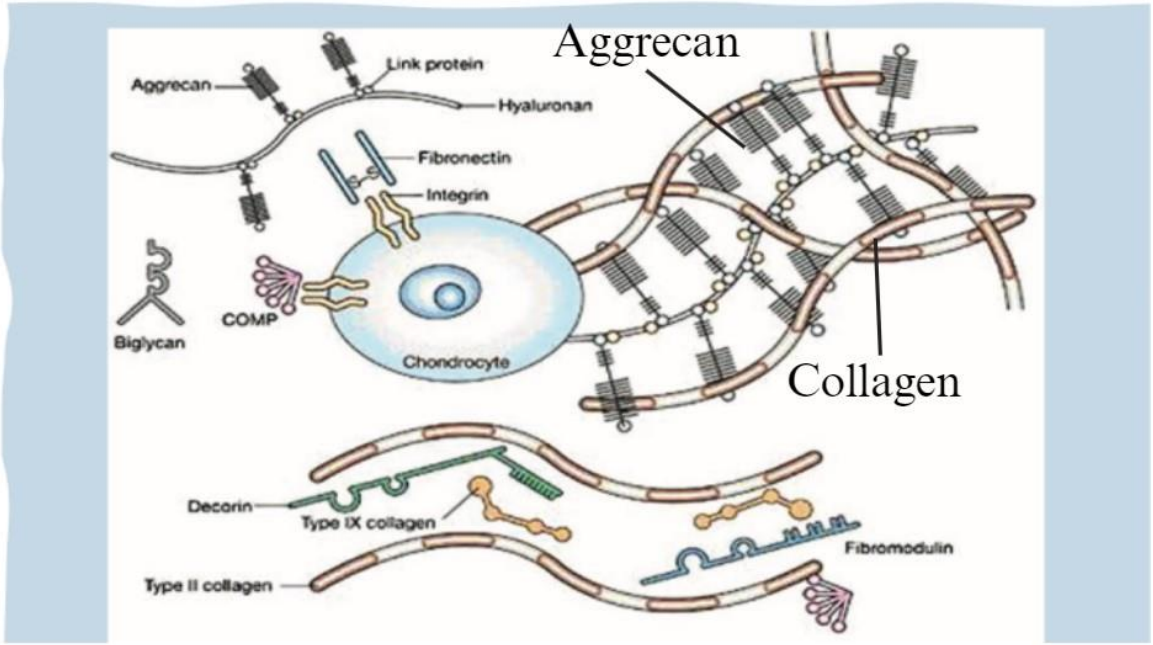
Ledbrosk har inga blodkärl, nerver eller lymfocyter och därför har den en låg förmåga för regeneration och att reparera sig själv vid olyckor eller degenerativa sjukdomar. Utbytet av metaboliter mellan broskceller och omgivning sker med diffusion genom vattnet i matrixen (1). Hyalint brosk består av fyra zoner beroende på förändringen av den mekaniska miljön; ytlig zon, transitionell zon, djup zon och kalcifierad zon där brosket binder till ben (3).

Kondrocyter

Kondrocyterna är de metaboliskt aktiva specialiserade cellerna som finns i hyalint brosk och differentieras från kondroblaster som är omogna celler som utvecklas från mesenkymala stamceller (1). Kondrocyterna varierar i form, storlek och antal beroende på anatomiskt område för brosket. Kondrocyter syntetiserar alla komponenter i broskmatrixen under utveckling, bland annat fiberbildande kollagen II och aggrekan som är de huvudsakliga proteoglykanerna i brosket (2). Förmågan för kondrocyter att bilda nytt brosk minskar med stigande ålder och även cellernas densitet i hyalint brosk minskar gradvis(3). Kondrocyterna kan reagera på olika tillväxtfaktorer, mekaniska belastningar och hydrostatiska tryck men de har en låg förmåga att genomgå celldelning (2).

Extracellulär matrix

Vatten utgör 80 % av ECM volym i hyalint brosk. Genom sin vattenbindande förmåga får brosket sin förmåga att motstå tryck och belastningar. Kollagen utgör 60% av broskets volym och det är mest kollagen II som förekommer. Andra typer av kollagen, framför allt I, IV, V, VI, IX och XI utgör en mindre andel av ECM och deras uppgift är att stabilisera kollagen II (2). I kondrocyterna bildar tre kedjor en trippelhelix som kallas för prokollagen. När prokollagen utsöndras ut till interacellulära utrymmet omvandlas den till kollagen av enzymer som klipper bort extra aminosyror i N-och C-terminaldelen. Kollagenmolekyler samlas för att bilda mogna kollagenfibrer(4). Proteoglykaner är den näst största makromolekylen i ECM och utgör 10% av våtvolymen. Proteoglykaner består av en proteinkärna med en eller flera linjära glykosaminoglykankedjor (GAG) som kan bestå av 100 monosackarider. Kedjorna sträcker sig ut från proteinkärnan och är separata från varandra på grund av elektriska repulsioner. Aggrekan är den största proteoglykanen och dess essentiella funktion är att stödja brosket med osmotiska egenskaper som är avgörande för belastningsmotståndet (2). Kollagen utgör de huvudsakliga fibrerna i bindväv och finns i de flesta typer av bindvävsceller. Kollagen ger flexibilitet och motstår dragning och sträckningen. Bindvävsceller producerar kollagena fibrer till den extracellulära matrixen. Det finns 28 typer av kollagen som kan vara fibrer, nätverk, eller proteiner som är bundna med cellmembran. Kollagen typ 1 är den huvudsakliga typen av kollagen och den finns i till exempel dermis i hud och ben. Kollagen typ II utgör huvudsaklig kollagen i hyalint brosk och består av fibrer. Kollagen III finns framför allt i lever, benmärg och lymfsorgan som stödjande nätverk (1).



Figur 1. Schemtiskt illustration av extracellulär matrixen av ledbrosk. De stora makromolekylerna som finns i ledbrosk är: Kollagen (främst kollagen II) och proteoglykaner (särskilt aggrekan). Icke-kollagena proteiner finns i mindre mängder. Kondrocyterna bildar de olika komponenterna. (2)

Ledbrosk skador

Olika faktorer såsom artros och trauma kan bryta ned brosket. I normalt brosk täcker ett tunt brosklager benen som möts i leden. Broskvätskan håller de här ytorna glatta för att glida utan friktion och underlättar rörelse. När brosket försvinner på grund av artros eller annan broskskada blir rörelse sämre och benen får en ökad belastning vilket leder till förlust av mobilitet och rörelse hos befolkningen särskild de äldre >55 år. (5)

Behandlningar för ledbroskskador

En effektiv och adekvat terapi för brosksregeneration som ger långsiktiga resultat har inte utvecklats ännu. Mikrofrakturering och Autologous Chondrocyt Implantation (ACI) är de mesta använda aktuella tekniker för broskreparationsterapier. Vid mikrofrakturreparation skapas små hål i det närliggande benet under det skadade brosket för att framkalla blödning till det defekta brosket. Detta leder till reparation av brosk genom migration av multipotent. a märgceller som bygger upp en broskliknande vävnad (fibröst brosk). Kollagen typ I är den dominerande kollagen typen i den nya fibrösa brosket (6). Metoden används för små

broskskador. Studier har dock visat att efter 1–1,5 år försämras reparations kvaliteten med försämring av biokemiska och biomekaniska egenskaper hos benen. Därför har mikrofrakturering en kortsiktig effekt (7). Autolog kondrocyt implantation (ACI) är en långsiktig behandling för broskskador. Kondrocyterna bildar ett hyalinliknande brosk som kan ha större förmåga att anpassa sig till defekten. Friska celler från leden avlägsnas från patienter och odlas i ett mono-lager. Sedan implanteras de tillbaka i patientens knä. I visa studier visades fibrös bildning och att bara 15% till 30% av patienter med ACI utvecklar hyalinliknande brosk. Med denna ACI-teknik kan det inte dock kontrollera tillväxt och kvalitet hos neobrosk i dagsläget. (4).

En utveckling av den ursprungliga ACI -tekniken innebär användande av tre-dimensionell matrix som bär i sig celler (matrix-assisted chondrocyte implantation, MACI). Matrisen kan bestå av hydrogeler som är gjorda av naturliga biopolymerer såsom kollagen och agaros eller syntetiska polymerer såsom polyglykolsyra. Varje material har olika fördelar för cellviabilitet och differentiering. Både odlade kondrocyter och mesenkymala stamceller kan användas för MACI. Cellerna som tas från patienten odlas och expanderas först in vitro och tillförs sedan till hydrogelerna. Efter broskbildningen i hydrogelerna implanteras de kirurgiskt i patienten. Olika biologiska nedbrytbara polymerer används för att bilda hydrogeler. De här polymererna kan vara kitosan, kollagen eller gelatin (3).

Hydrogeler

Utvecklingen av organiska polymera hydrogeler (syntetiska eller naturliga) kräver att de här materialen liknar ECM mikromiljön. Vid tillverkningen av hydrogeler måste hänsyn tas till att svällnings egenskaper och vattenupptagningsförmåga är höga i hydrogeler samt att hydrogelerna måste ha förmåga att behålla vatten och celler. Porositet av hydrogeler måste anpassas för att cellerna ska fastna i dem men samtidigt måste porerna inte vara för stora för att cellerna kan falla genom materialet vid odling. Hållfasthet är viktig för att hydrogeler skall bibehålla sin strukturella integritet och även för att motstå andra tryck från omgivande vävnad vid implantation (7) eftersom hydrogelerna ska vara som en mikromiljö för cellers vidhäftningen i skadade brosk och transportera näringsämnen till celler dessutom de ger adekvat styrka och stabilitet för skadade brosket (8).

Kitosan

Kitosan har visat sig vara ett lovande biomaterial inom vävnadstekniker för att den har en struktur som liknar extracellulär matrix, är antimikrobiell och har biologiskt nedbrytbara

egenskaper. Kitosan utvinns från skelett av insekter och kräftdjur och den har visat naturliga egenskaper i pH-känslighet och cytokompatibilitet (5). Kitosan kan användas för att tillverka nanopartiklar, scaffolds, hydrogeler och filmer som funkar som media för cellodling. Kitosanet kan stödja tillväxt och differentieringen av kondrocyter och stimulerar broskbildning (3). Kitosanet måste också ha egenskaper som tillåter lämpligt utbyte av näringsämnen, syre, elektrolyter och metabolisks avfall som kan förmedla mätbara data om cellviabilitet och funktion (8).

Odling av broskceller i hydrogeler

Kitosanet och andra biopolymerer används som tre-dimensionell stödjestruktur ”skaffold”_ i form av hydrogeler. Broskceller och mesenkymala celler som växer i dessa hydrogeler kan underlätta att skapa en bra mikromiljö för brosk med en godkvalitet. Kombinationen av scaffolds, näringsmedium och broskceller kan vara ett effektivt alternativ för att regenerera skadat brosk. Till näringsmedium tillsätts tillväxtfaktorer liksom TGF-β som stimulerar syntes av proteoglykaner och kollagen typ II eller differentiering av stamcellerna. Till medium tillsätts också speciella komponenter såsom prolin, insulin, transferin och selen (8).

Cell-viabilitet

I in-vitrocellodling används ofta cellproliferationsanalyser som kan mäta cellviabilitet, bedöma den biologiska funktionen eller indikera cytotoxicitet. Dessa analyser utnyttjar olika cellfunktioner såsom enzymatisk aktivitet eller cellmembranpermeabilitet (9). En analysmetod för analys av cellviabilitet är Celltiter Blue Assay (CTB) som baseras på mätning av cellers metaboliska tillstånd. CTB-Assay innehåller en mörkblå resazurin som reduceras till dess högfluorescerande produkt resorufin av metaboliskt aktiva celler. Fluorescence signalen är proportionell mot antalet livsdugliga celler. Fluorescence intensiteten mäts med en speciell plattläsare (10) (11).

Histokemiska färgningsmetoder för brosk

Histokemiska färgningsmetoder (HC) är vanliga metoder som används för att detektera olika komponenter i vävnader och utvärdera ECM-densitet (12). Principen är baserad på olika färgämnens bindning till specifika komponenter i vävnaden. Bindningen är i sin tur beroende av kemiska egenskaper hos de molekyler som bygger upp vävnaderna. Centrala egenskaper inkluderar molekylernas laddning, syra-bas egenskaper och hydrofobicitet. laddning och molekyler storlek samt på färgningen laddning (4).

Sirius red

Sirius red är en ofta använd histokemisk färgning för kollagenfibrer. Sirius Red användes först för kvalitativ uppskattning av kollagenfibrer men den användes senare i brett spektrum i kvantitativa uppskattningar av kollagen förekomst. Färgningen är snabb och ger starkt kontrast till kollagenfibrer (13). Sirius red färgar kollagena fibrer röda och bakgrunden gult(14). Cellkärnorna färgas svart med Weigert's Hematoxylin (1).

Safranin O

Safranin O är en katjoniska färgning som används för att färga de starkt negativt laddade glykosaminoglykanerna i brosk (15). Safranin O används i kombination med Fast green som är ett anjoniskt färgämne. Safranin O med Fast green färgar brosk orange/röd, cellkärnor svart och bakgrunden färgas blått/grönt (16).

Alcian Blue

Alcian Blue (AB) används för att detektera kolhydratinnehållande substanser. Alcian Blue är en stor konjugerad färgämnesmolekyl. Alcian blue används vid olika pH; hög PH 2,5 eller låg pH <1, 0.5 och detta för att särskilja mellan subtyper av kolhydratinnehållande substanser som kan joniseras med AB vid olika pH-värde. AB färgar mucinsyra och proteoglykaner blått och cellkärnor rött, Subtyper av mucinsyra och proteoglykaner såsom sulfomuciner kan påvisas vid ett mycket lågt pH-värde <1 medan vid pH>1 färgas svagt sulfaterade muciner som finns i bägarceller (17).

Hematoxylin & Eosin

Hematoxylin (H&E) är standardfärgning som har använts länge i patologi laboratorier som en rutinfärgning för olika vävnader. Eosinet färger cytoplasman och bindväv i olika nyanser av rosa och hematoxylinet färger kärnorna blått/lila. Den här rutinfärgen visar ett brett spektrum av cytoplasmatiska, nukleära och extracellulära komponenter (4).

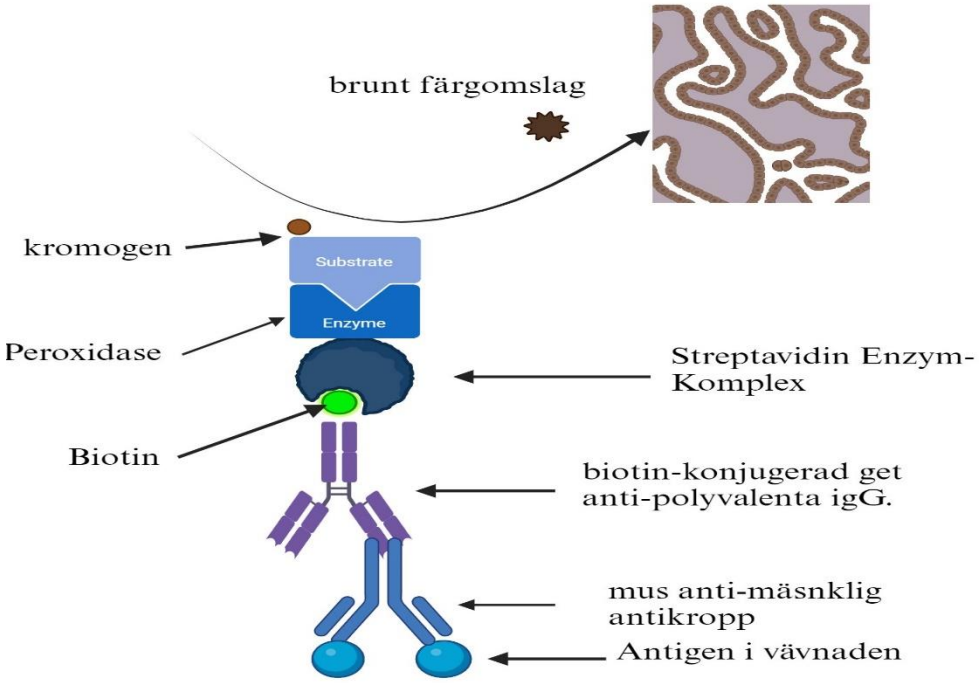
Immunohistokemiska färgningar

Immunohistokemiska färgningar (IHC) är en kombination av immunologiska och histokemiska tekniker som detekterar olika antigen eller markörer i vävnader. Inom IHC används polyklonala eller monoklonala, fluorescerande märkta eller enzym märkta antikroppar. Polyklonala antikroppar är inte specifika och kan binda till antigenen från olika

epitoper. De tillverkas genom att immunisera djur såsom kaniner eller getter med ett antigen då djurens immunsystem kan tillverka olika antikroppar mot olika epitoper för en och samma antigen medan monoklonala antikroppar binder specifikt till bara en epitop. Monoklonala antikropparna produceras genom att odla plasma B-lymfocyter in vitro, vilket tillverkar endast en antikroppstyp mot bara en epitop av antigenet. Polyklonala antikroppar kan korsreagera med andra antigen som har liknande struktur (17,18).

Immunohistokemiska tekniker

Det finns många IHC-tekniker som kan används för att detektera antigenen och den valda tekniken måste anpassas enligt olika parametrar liksom typ av prov till exempel frysnitt eller paraffininbäddade snitt eller cytologiska preparat. Principen för alla immunohistokemiska färgningsmetoder är baserade på antigen-antikroppreaktionen. Skillnaden mellan dem ligger i antal steg. Det finns direkta (en steg) -, indirekta (två steg) och (Strept)avidin-biotin (tre steg) IHC-metoder. Direkta metoder är baserade på en reaktion mellan antigen och en primär antikropp som är märkt med enzym eller fluoresence medan i indirekta metoder binder den primära antikroppen till antigenet och en sekundär antikropp binder till den primärantikroppen. Enzymer binder till den sekundära antikroppen och ett substrat binder till enzymer, vilket ger färgomslag som kan ses under mikroskop. (Strept)avidin-biotin metoder är tre-steg tekniker. I det första steget binder en okonjugerad primärantikropp till antigenet i vävnaden. I det andra steget används en biotinylerad sekundär antikropp som är producerade mot den primära antikroppen. I tredje steget binder antingen en komplex av enzym märkta biotin och streptavidin eller enzym-märkta streptavidin till den sekundära antikroppen. Dessa enzymer kan vara Horseradish peroxidase eller alkalisk fosfatas. Substrat med kromogen liksom diaminobenzidine chromogen (DAB) binder till enzymerna för att ge ett brunt färgomslag vid positivitet. Biotinylated antikroppar ger en hög detektionskvalitet och sensitivitet (17,18). Tre-stegstekniken illustreras schematiskt i Fig 2.



Figur 2. En schematisk bild som illustrerar (Strept)avidin-biotin metoden. (skapad av Alaloush H. i BioRender.com)

I vissa vävnader kan det finnas liknande enzymer (endogena) till de exogena enzymerna som används i IHC-tekniker, till exempel peroxidas. Då binder substratet till de endogena enzymerna och skapar ett falskt positivt färgomslag. Därför används ett ämne som blockerar specifika endogena enzymer, såsom Hydrogen Peroxide Block (HPB) eller ett ämne som blockerar ospecifikt såsom formaldehyd. Det är svårt att inaktivera peroxidas ospecifikt därför det är bäst att blockera den med HPB (18).

Antigen avmaskning

Innan färgningen med Immunohistokemiska färgningsmetoder måste antigenen avmaskas för att den primära antikroppen ska kunna binda till antigenen. Vävnadens fixering i formalin och bearbetningen av vävnaden i paraffin kan förändra vävnadens strukturella proteiner genom att bygga metylenbryggor mellan vissa antigener. Metylenbryggor maskerar antigenen och graden av maskningen varierar beroende på tiden som vävnad har legat i fixeringsmedel, koncentration av fixeringsmedel och temperatur. Avmaskning av vävnaden bryter de här metylenbryggorna mellan proteiner och gör antigenen tillgängliga. Avmaskningen sker enzymatiskt eller genom att utsätta vävnaden för värme. Värme baserade antigen avmasknings tekniker har visat förbättring i IHC. Denna tekniker är baserade på att utsätta vävnaden till värme över 100 C. Preparaten läggs i en buffert liksom Natrium Citrate lösning

i särskild pH och värms i en mikrovågsugn eller i en tryckkokare (12). Användningen av värmeavmaskning kan leda till förlust av snitt på glasen därför är det rekommenderat att använda en effektiv metod liksom silancoating för att undvika förlust av snitt. Värmeavmaskningen behöver inte optimeras för olika batcher av enzymer vilket gjort den populär. Antigen avmaskning med enzymer behöver optimeras för olika antigener och olika enzymer. Användningen av enzymer möjliggör avmaskning av antigener genom att bryta ned proteiner som maskerar antigenen. Enzymer liksom trypsin, proteinase K och hyaluronidas kan används. Enzymerna späds och förbereds och inkuberas med preparaten i 37 ^{o}C i en viss tid som varierar beroende på fixeringstid och fixeringsmedel. En lång fixeringstid behöver en lång bearbetningen av vävnaden. En lång tid i nedbrytande enzymer kan leda till förstörelse av vävnaden genom att ta bort proteiner och antigenen. Val av avmaskningsmetod (Värme eller enzymer) beror på antigenet som ska avmaskas och typen av vävnad (15).

Syfte

Syftet med studien är att undersöka förekomst av bildning av broskkomponenter (kollagen och aggrekan) vid 8 tidpunkter under en odlingsperiod av fem veckor samt analysera cell-viabilitet vid samma tidpunkter med CellTiter blue Assay. Undersökningen sker med histokemiska och immunohistokemiska färgningsmetoder.

Frågeställningar

1. Kan kondrocyterna växa till och bilda broskkomponenter i porösa kitosan-baserade 3D hydrogeler under en fem veckors period?
2. Hur ser celltillväxten ut i hydrogelerna mätt som metabolisk aktivitet?

Metod och material

Etiska överväganden: Vävnader för denna studie är tagen ifrån kasserad ortopedisk eller plastikkirurgisk materiel. Inga personuppgifter hanteras i det här projektet eftersom materialet är avidentifierat. Patientens samtycke togs för att använda materialet till forskning. Forskningen har etiktillstånd från EPM dnr 2009/092-samt 2011/45.

Isolering av kondrocyter från hyalint brosk

En schematisk illustration för de olika stegen från provtagning av brosk till cellodling i en 96-platta finns i figur 3.

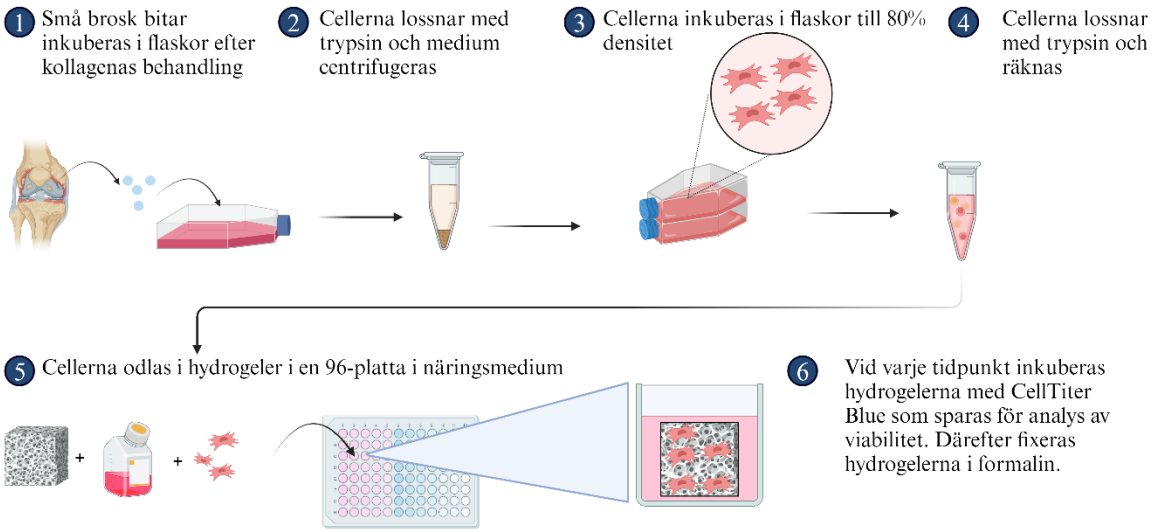
I den här studien användes broskceller från en patient som donerade överblivet ortopediskt material vid knäoperation. Hyalint brosk hackades och sönderdelades i <2 mm^2 bitar. Bitarna överfördes till ett plaströr med 5 ml Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) näringslösning (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA) med 1 mg/ml typ II kollagenas (Sigma-Aldrich, missouri, USA) sedan placerades i en vagga i värmeskåp i 18 timmar vid $37C^0$. Sedan tvättades provet genom att lösningen centrifugerades i 240 x g i fem minuter. Sedan hälldes superantanten av och tillsatts 10 ml fosfatbuffrad koksalt (PBS) (Thermofisher Waltham, Massachusetts, USA) till pellet. Provet centrifugerades igen vid 240 x g i fem minuter, superatanten hälldes av och provet tvättades en gång till. Efter tvättningen inkuberades cellerna med broskbitar i odlingsflaskor med 25 ml odlingsmedium (DMEM) kompletterat med 10% Fetal Bovine Serum (FBS), GlutaMax, insulin, transferrin, selen, prolin, askorbinsyra, dexametason, TGF-beta och antibiotika "komplett medium" (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA) tre veckor med byte av medium två gånger per vecka. Efter odlingen trypsinerades cellerna med 0,25% trypsin (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA) för att avlägsna cellerna från flaskans botten. Suspensionen centrifugerades i 260 x g under 5 minuter. Superantanten hälldes av och cellerna som fanns i pelleten frystes ner i flytande kväve tills början av studiens laboration.

Odling och räkning av kondrocyter

Nedfrysta celler tinades upp och odlades i två- 75 cm^2 -flaskor med komplett medium. Flaskorna inkuberades vid 37^oC i 5% CO_2 tills de uppnådde 80% densitet. Cellerna lossades från plasten med 0,25% trypsin och inkuberades vid 37^oC i 5% CO_2 i fem minuter. 20µl av lösningen tillfördes till en burkerkammare för cellräkning under mikroskop (Olympus LifeScience, Tokyo, Japan)

Odling av kondrocyter i hydrogeler

Torr kitosan frystorkat från 2% beredning (Vinca Institute of Nuclear Sciences, Belgrad, Serbiens) delades i 40 st, 27 mm^3 bitar. Bitarna steriliserades med etanol i 30 min och tvättades sedan med komplett medium i 15 min. Detta upprepades fem gånger. Till en 96-hålsplatta överfördes 3D hydrogeler inför cellodling. 40 000 kondrocyter i 30 µl komplett medium tillsattes till varje hydrogel. Komplett medium pipetterades sedan till varje brunn så att hydrogelerna täcktes helt. Eftersom kitosanet är poröst så faller en del av cellerna ner genom hydrogelen till botten av brunnarna. För att undvika att dessa celler konsumerar näring från mediumet, och stör viabilitetsmätningen i hydrogelerna, flyttades hydrogelerna till nya tomma brunnar dagen efter insådd. Hydrogeler utan celler används för att bestämma bakgrundsnivån i cellviabilitetsbestämningen. Plattorna inkuberades vid 37ºC i 5% CO_2. Näringsmedium byttes två gånger per vecka.

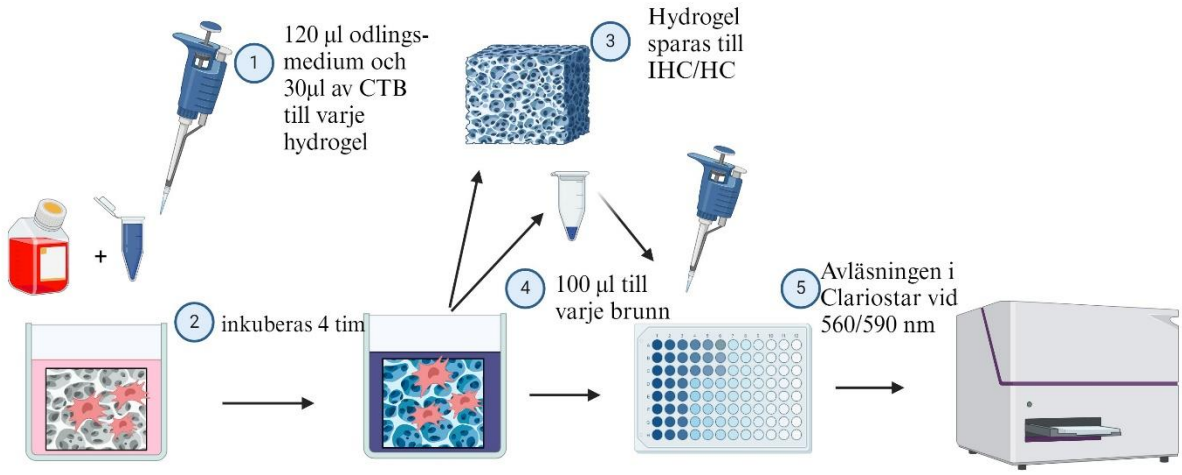


Figur 3. Figuren illustrerar de olika stegen från provtagning av brosk till cellodling i en 96-platta. (skapad av Hamida Alaloush i BioRender.com)

Cell-viabilitet

En schematisk illustration för utförande av Cellviabilitet mätningen finns i figur 4.

Cellviabilitet bestämdes vid åtta olika tidpunkter (1, 4, 7, 11, 16, 21, 27, 34 dagar) och vid varje tidpunkt gjordes CTB till tre hydrogler (triplikat). Hydrogelerna överfördes till nya brunnar och 120 µl odlingsmedium samt 30µl av CTB reagensen (Promega Biotech AB, Nacka, Sverige) tillsattes till varje brunn. Proverna inkuberades vid 37°C i 5% CO_2 under fyra timmar. Medium med CTB överfördes till ett rör och de frystes ned tills alla tidpunkter var klara. Hydrogelerna förvarades i 10% formalinlösning i kylskåpet som extra material för immuno-/histokemi. Som bakgrundsprover användes hydrogeler utan broskceller, men med CTB. Som referens för viabilitetsbestämning användes CTB- bestämningen av 4000 celler som odlades på plast en dag. CTB mättes i en plattläsare instrument CLARIOstar® (BMG labtech, Offenburg, Tyskland) vid våglängderna Extension 560/ Emission 590 nm. För att kunna räkna cellantalet användes kvoten mellan bakgrunden (medium utan celler) och referensen (4000 celler som odlades på plast) som senare används i kvotberäkning. Bakgrunden för hydrogelerna var komplett medium för en hydrogel utan celler. Alla beräkningar för medelvärdet och standardavvikelse skedde i Excel program Microsoft 365, 2021.



Figur 4. Figuren illustrerar cell-viabilitetsmättning med CellTiter Blue Assay (CTB). Hydrogeler sparas till immuno/histokemiska färgningsmetoder. (skapad av Hamida Alaloush i biorender.com).

Kontroller för immuno-/histokemi

I studien användes dels positiva kontroller i form av hyalint brosk-dels negativ kontroll färgningar i form av cellfritt hydrogel (NK). Till de här brunnarna tillsatts bara näringsmedium. En hudbiopsi från plastikkirurgi användes som en positiv kontroll för kollagen I, och negativ för kollagen II.

Fixering av vävnaden och dehydrering före immun-/histokemi

En schematisk illustration av de olika stegen från fixering till färgning visas nedan i figur 5.

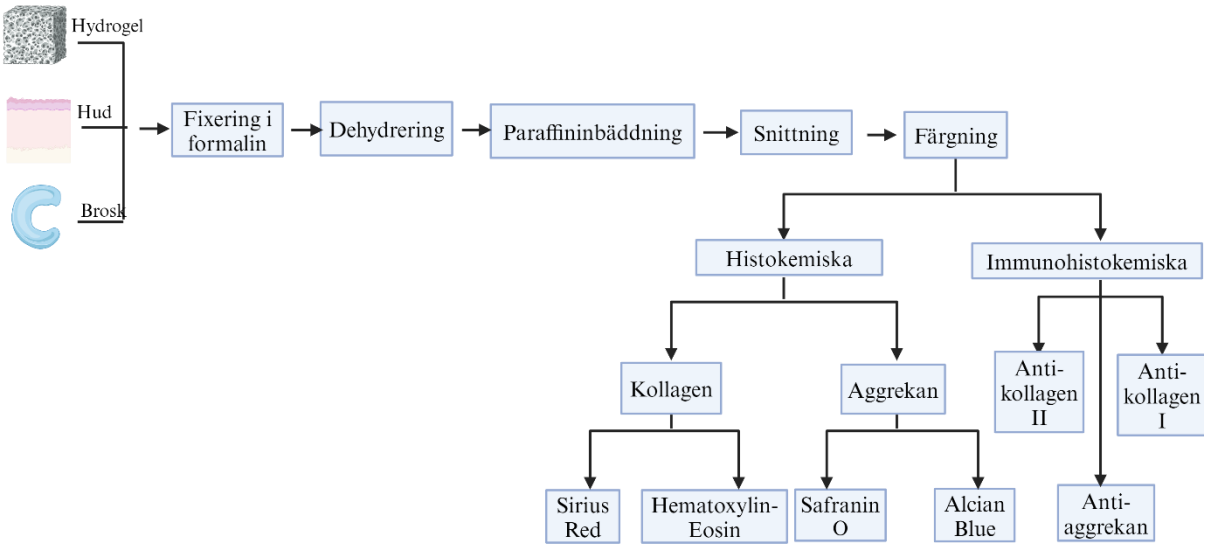
Vid varje tidpunkt fixerades en hydrogel med 4% formalinlösning och sparades i kylskåpet tills alla tidpunkter var klara. Efter fem veckor av odling dehydrerades vävnaden i 70% etanol i 15 min följt av i två omgångar i 95% etanol i 15 min. Därefter 99,5 % etanol i tre omgångar i 15 min. Sedan i xylen i tre omgångar i 20 min. Dehydrering utfördes vid rumstemperatur. Vävnaden filtrerades i paraffin i tre omgångar i 10 minuter vid 60 ^{o}C.

Paraffininbäddning

En gjutform fylldes till hälften med varm paraffin (ca 60°C) och till den överfördes hydrogeler och kontrollvävnad efter dehydreringssteget. Koppen placerades på is för att stelna och därefter fylldes resten av gjutkoppen med paraffin. Hudbiten bäddades så att alla hudlager syns i mikroskop. Paraffinklossen kunde sedan avlägsnas från gjutkoppen genom att knacka baksidan av koppen mot en bänkskiva.

Snittning

Paraffininbäddat material snittades med automatmicrotomen Leica RM2255(Leica biosystems, Mölndal, Sverige) i fyra µm tjocka snitt. Snitt slätade i ett kallt vattenbad och placerades på Super frost ® plus mikroskopglas (Fisher Scientific, Göteborg, Sweden) och sedan sträcktes vävnaden i ett varmt vattenbad vid 40°C. Glasen torkades i värmeskåp i en timme vid 62°C.



Figur 5. figuren illustrerar olika steg som gjordes efter hydrogel fixering i formalin.

Histokemiska färgmetoder

Vävnaden rehydrerades i xylen i fem minuter i två omgångar. Därefter doppades glasen i sjunkande koncentrationen av etanol (99,5%, 99,5 %, 95% & 70%) och förvarades sedan i destillerat vatten. Efter histokemiska färgningar dehydrerades vävnaden med stigande koncentration av etanol (70%, 95%, 99,5%, 99,5%) och i det sista steget användes xylen innan montering. Glasen monterades med Eukitt®Quick-hardening mounting medium. Mikroskopiska bilder togs med användningen av ett mikroskop utrustat med en digitalkamera (Olympus, Tokyo, Japan) in programvara Cell scens (Olympus, Tokyo, Japan)

Sirius Red

Preparaten färgades först med (0,5% hematoxylin, 2% järnklorid) Weigert's hematoxylin i 15 minuter och sedan tvättades de under rinnande vatten i 10 minuter. Därefter färgades dem med 0,1 % Picro-Sirius Red lösningen i en timme. Sista steget var att tvätta dem med två omgångar med 0,5 % surgjort vatten.

Alcian blue

Preparaten färgades med 1% Alcian blue pH 2,5 lösning i 30 minuter och tvättades de under rinnande vatten i två minuter. Sedan tvättades de i destillerat vatten och färgades med 0,1% Fast Red lösning i fem minuter, och sist tvättades de under rinnande vatten i en minut.

Safranin O

För att färga med Safranin O färgades preparaten först med Weigert's Hematoxylin i 10 minuter. Sedan tvättades preparaten under rinnande vatten i 10 minuter. Därefter färgades preparaten med 0.05% Fast Green Solution i fem minuter. Preparaten tvättades med 1% ättiksyralösningen i 10 sekunder och sedan färgades de med 0,1% Safranin O i 10 minuter.

Hematoxylin & Eosin

Preparaten färgades först med Mayer's hematoxylin (Histolab, Sverige) i fem minuter och sedan tvättades dem under rinnande vatten i en minut. Därefter färgades preparaten med en 0,25% eosinlösning som har 0,5 % ättiksyra i en minut och tvättades en minut under rinnande vatten.

Immunohistokemiska färgmetoder

Rehydrerings-steg utfördes på samma sätt som före histokemiska färgningar. Reagenser som användes för immunohistokemiska färgningar inköpta från Abcam, USA. Glasen täcktes med Hydrogen Peroxide Block och inkuberades i 10 min. Därefter tvättades glasen med Tris-buffert saline med 0,1% Tween20 (TBS-t) två gånger. Därefter behandlades vävnaden (brosk, hud och hydrogeler) med 20 µg/ml proteinas K (1:40 i TBS) i 20 minuter för att göra antigenen aggrekan tillgänglig för primär antikropp. Preparaten för nativt brosk och hud inkuberades med 0,1% hyaluronidase utspätt med 0,2% trypsin (1:100) in 37 ^{o}C i en timme för att avmaska kollagen typ I och kollagen typ II. Hydrogelglasen inkuberades som hud och brosk för att avmaska kollagen II. För att avmaska kollagen I inkuberades glasen med 0,1% hyaluronidase utspätt med 0,2% trypsin i 15 minuter i rumstemperatur. Glasen tvättades tre gånger med TBS-t Glasen inkuberades 10 minuter vid rumstemperatur med Protein Block för att blockera icke-specifika bakgrundsstruktur. Glasen tvättades en gång med TBS-T. 100 µl av varje utspädd primärantikropp (Tabell 1) tillsatts till varje glas, som inkuberades i 30 minuter i rumstemperatur. Glasen tvättades fyra gånger med TBS-t och inkuberades med Biotinylated Goat Anti-Polyvalent i 10 min vid rumstemperatur. Glasen tvättades fyra gånger och inkuberades med Streptavidin peroxidase i 10 min. sedan tvättades glasen fyra gånger med buffert och tillsattes 1:50 krom-arbetslösning (DAB) till preparaten och inkuberades i 1–10 minuter i rumstemperatur. Mellan varje behandlingssteg tvättades preparaten fyra gånger i buffert. Vävnaden motfärgades med Mayers HTX i 10 sekunder och sköljdes under kranvatten i fem minuter. Glasen dehydrerades på samma sätt som histokemiska färgningar dehydrering. Glasen monterades med Eukitt®Quick-hardening mounting medium.

Tabell 1. Antikroppar för immunohistokemi

Antikropp	Typ/klon	Leverantör	Spädning
Kollagen I	Polyclonal	ThermoFisher	1:100
Kollagen II	Monoklonal 2B1.5	ThermoFisher	1 ug/ml 1:200
Aggrekan	Monoclonal BC-3	ThermoFisher	1:100

Bedömning och tolkning av resultat

Histokemiska färgningar

AB- positiva substanser färgas blå, cellkärnor rosa och cytoplasman svagt rosa. Sirius red positiva substanser (kollagen) färgas röd, och bakgrunden färgas gult. Cellkärnorna färgas grå eller brun eftersom glasen lägger en lång tid i pikro-sirius red. Safranin O positiva substanser (proteoglykaner) färgas röd, cellkärnor färgas svart och bakgrunden och bindväv färgas grönt. H&E färgas cellkärnor blått/lila och cytoplasman och extracellulära matrix färgas i olika nyanser av rosa.

Immunohistokemiska färgningar

Immun-positiva komponenter färgas brunt med horse-radish peoxidase reagens. Kollagen I skall kunna detekteras i huden i dermis och kollagen II och aggrekan skall kunna detekteras i brosk. Bedömningen av hydrogeler sker genom att jämföra färgningen av hydrogelen utan celler (NK) med hydrogeler med celler i tidpunkterna och observera om det finns skillnaden i färgningen. Bildningen av nytt brosk kan synas som en homogen slät vävnad under mikroskop.

Statistik: Det här arbetet är ett kvalitativt arbete med få antal prover därför det inte är tillämpligt att ha statistiska metoder för immunhistokemin. Däremot kommer CTB-analyserna, som utförs i triplikat redovisas med medelvärde och spridningsmått (standardavvikelse) för cellantal

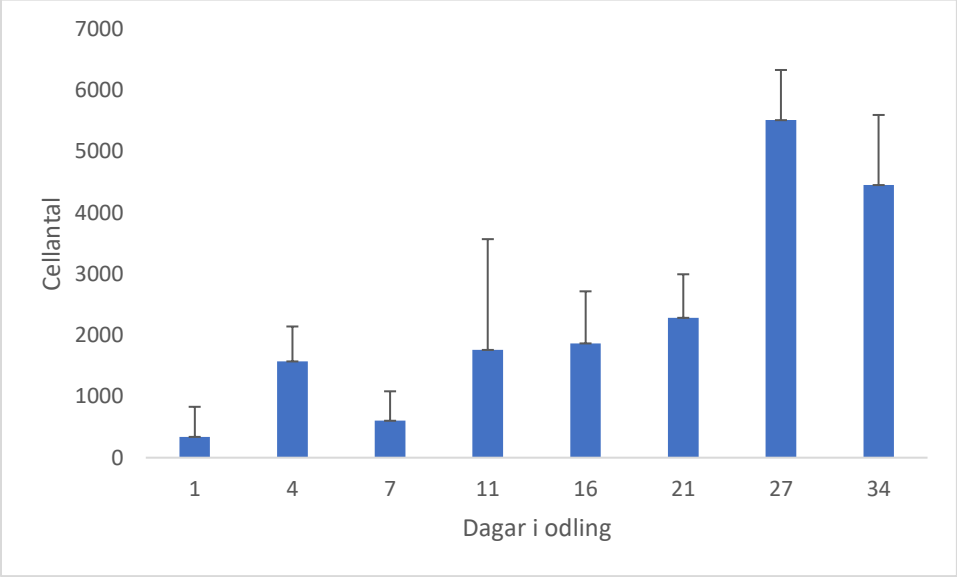
Resultat

Struktur hos hydrogeler

Vid mikroskopi av hydrogelerna efter paraffininbäddning och snittning framgick att polymerstrukturen var mycket gles efter fem veckors odling (Fig 7c, d). Liknande struktur sågs även vid tidigare tidpunkter. Hydrogeler med celler hade dock något tätare och mer kompakt struktur än strukturen hos hydrogelen utan celler efter 5 veckors odling. (Fig 7c, d). Det är observerat också att hydrogelerna porer är väldigt stora. (Fig 7, c)

Cell viabilitet

Mätningen av cellviabilitet för kondrocyter i kitosanet vid åtta olika tidpunkter visade ökning av cellantal med längre odling i kitosanet. Resultatet visade största antal av livsdugliga celler vid dag 27 och den minsta var vid dag ett. (Figur 6)

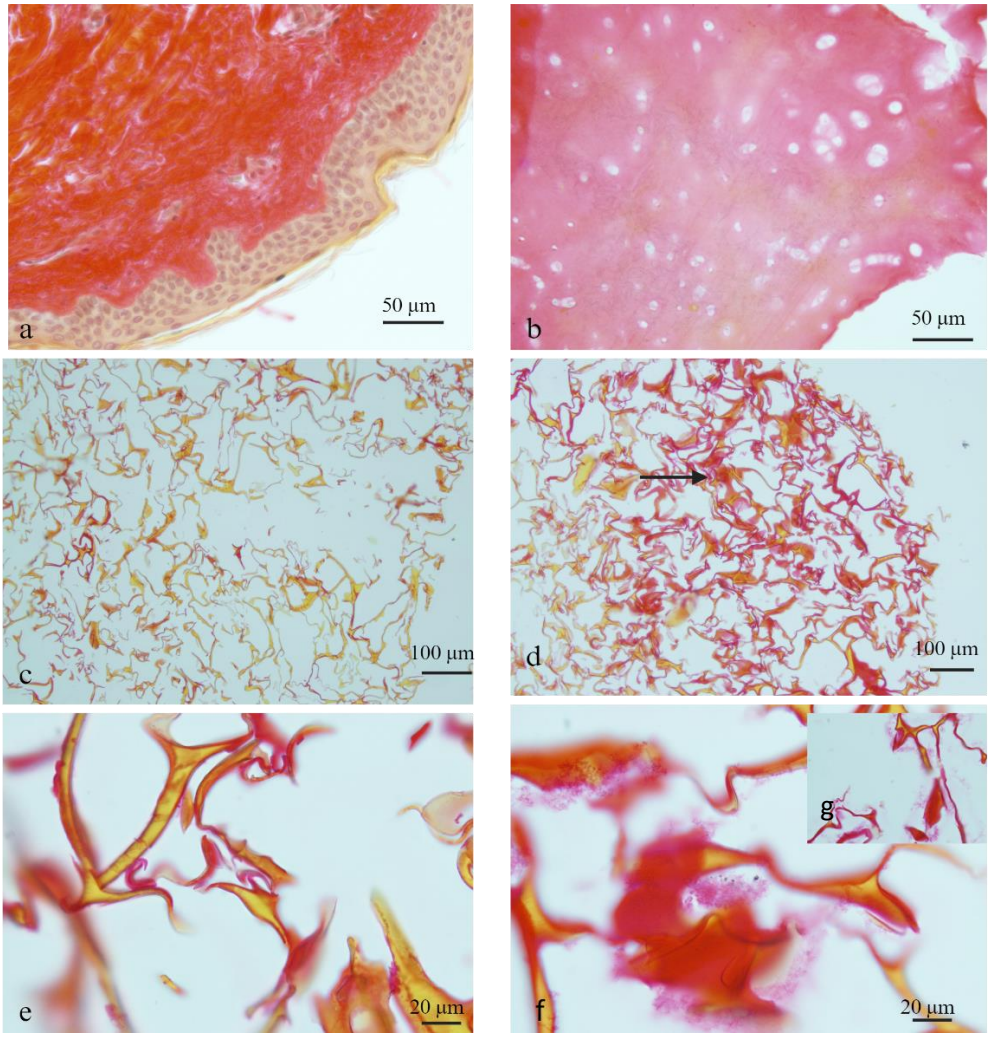


Figur 6. Celltiter blue-mätning vid åtta tidpunkter. Cellantalet vid en tidpunkt är beräknade som medelvärdet för triplikat. På X-axeln visas antal dagar i odling och på Y-axel visas antal celler som har överlevt/ vuxit till. Y-fel Staplar indikerar standardavvikelse (SD).

Histokemiska färgningar

Sirius red

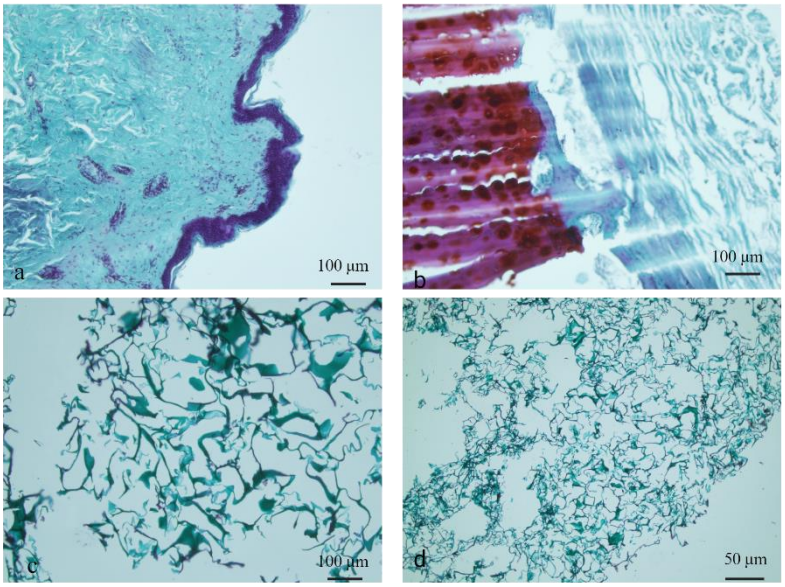
Sirius red färgade kollagena fibrer i hud och ledbrosk rött medan cellkärnorna färgades brunt. Bakgrunden färgades gult (figur 7 a,b). Den negativa hydrogelkontroll färgades gult/rött (Figur 7 c,e). Färgningen i hydrogelerna som odlades med kondrocyter visade uppkomst av röda kollagena fibrer och dess densitet ökar med ökat antal dagar i odlingen. Ökning av den röda färgen observerades efter en 16 dagarsperiod (bilga 1). Efter 34 dagarsodling kunde påvisas homogena röda substanser mellan kitosanet porer (figur 7d, f, g). Några cellkärnor kunde detekteras i hydrogelerna (bilaga 2).



Figur 7. Sirius red färgning. a. Hud, b. Ledbrosk, C. Negativa kontroll hydrogel (NK), d. Hydrogel efter en 34 dagarsperiod, e. 100X på NK och f &g. 100x på hydrogel efter en 34 dagarsperiod på två olika ställen.

Safranin O

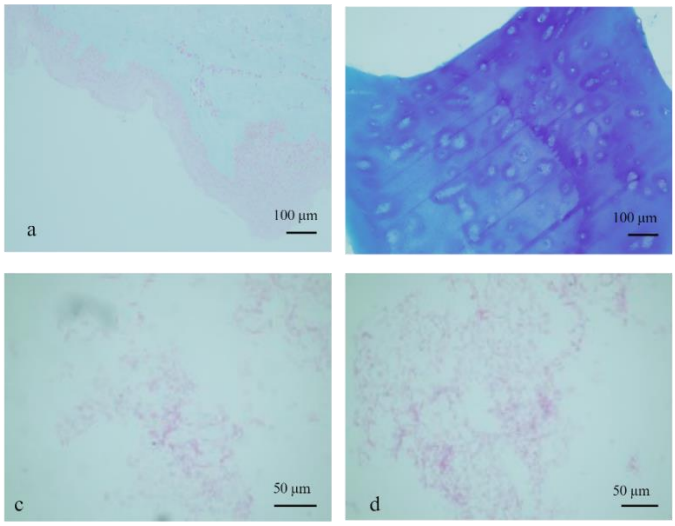
Safranin o färgade extracellulär matrix rött i hyalint brosk och övriga bindväv grönt. Epidermis färgades lila och dermis grönt. Cellkärnorna var mörklila. Alla hydrogeler hade grön färg med ingen påvisning av röd färg efter odlingar (figur 8).



Figur 8. Safranin O färgning. a. hud, b. brosk, c. negativ hydrogel kontroll, d. hydrogel efter en 34 dagarsperiod.

Alcian blue

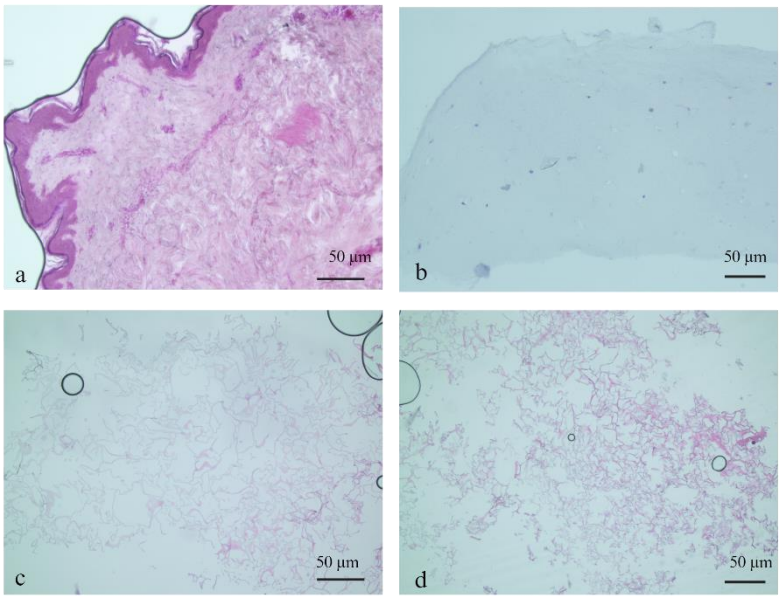
Ledbrosket färgades mörkt blå i extracellulär matrixen, celler syns i sina lakuner. Hudbiten färgades väldigt svagt blå i dermis och epidermis färgades rosa eftersom cellkärnor färgades rosa i epidermis. Hydrogelerna, inklusive negativ kontrollen, färgades rosa och blått. (figur 9)



Figur 9. Alcian blue färgning. a. Hud, b. Brosk, c. Negativ hydrogel kontroll, d. Hydrogel efter 34 dagarsperiod.

Hematoxylin & Eosin

H&E färgade hudbiten i dermis med olika nyanser av rosa i kollagena fibrer. Cellkärnor fick mörklila färg. Ledbrosk färgades svagt grå-rosa färg med lila cellkärnor. Den negativa hydrogel kontrollen färgades svagt rosa färg medan hydrogelen för en 27 odlingsperiod fått mörkare rosa färg. (Figur 10)

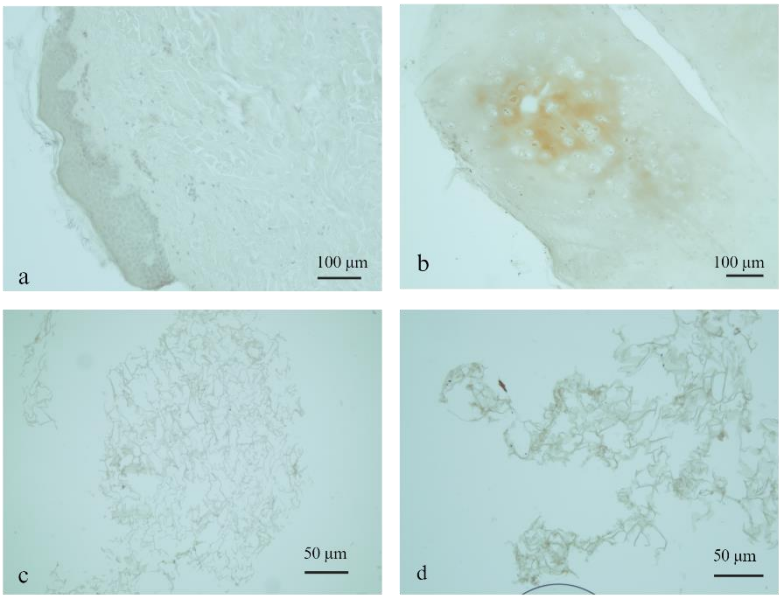


Figur 10. Hematoxylin & eosinfärgning. a. hud, b. brosk, c. negativ hydrogelkontroll, d. hydrogel efter 27 odlingsdagar.

Immunohistofärgningar

Kollagen II

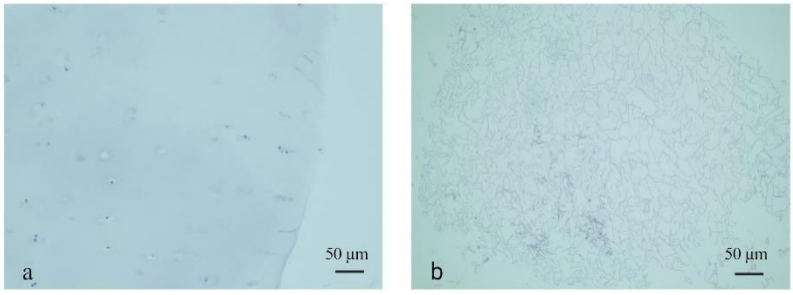
Den extracellulära matrixen i ledbrosket färgades brunt med anti-kollagen II (figur 11, a). Cellkärnorna var svagt blåa. huden epidermis och dermis färgades inte med brunfärg (figur 11, b). Hydrogeler hade inte någon brun färg med anti-kollagen II.



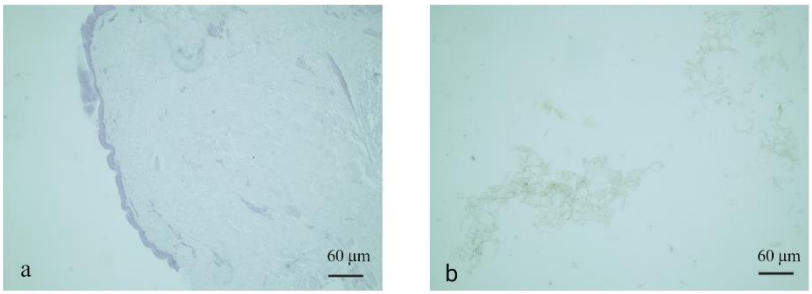
Figur 11. Anti-kollagen II färgning, a. hud, b. brosk, c. negativa hydrogel kontroll, d. hydrogel efter en 34 dagarsperiod.

Kollagen I & aggrekan

Färgning med anti-aggrekan (figur 12) och anti-kollagen I (figur 13) visade inte någon brun färg i huden och brosket. Cellkärnorna färgades blåa. Hydrogelerna färgades svaga gråa.



Figur 12. Färgning med anti-aggrekan, a. brosk och b. negativ hydrogel kontroll.



Figur 13. Färgningen med anti-kollagen I, a. hud och b. negativ hydrogel kontroll.

Mekaniska egenskaper

Under dehydreringen observerades att hydrogelerna med cellodlingen var mer stabila och starkare i konsistensen medan negativa kontrollen var sköra och gick i några bitar enkelt. Stabiliteten var högre med längre tids odling.

Översiktligt resultat av immuno/histokemiska färgningar för hydrogeler med antal dagar i odlingen finns i tabell 2.

Tabellen 2. Tabellen visar samtliga resultat för alla färgningar som gjordes. -: färgades negativt, +: färgades positivt, E: Ej färgad. (+): svag eller misstänkt positivitet.

	Sirius Red	Alcian Blue	Safranin -o	H&E	Kollagen II	Kollagen I	Aggrekan
Brosk Trakea	E	E	+	E	-	-	E
Ledbrosk	+	+	+	-	+	-	-
Hud	+	-	-	+	-	-	-
Hydrogel 1/4	-	-	-	-	-	-	-
Hydrogel 5/16	+	-	-	-	E	E	E
Hydrogel 27/34	+	-	-	+ (+)	-	-	-
Neg hydrogel	(+)	-	-	(+)	-	-	-

Diskussion

Syftet med denna studie var att analysera förekomst av extracellulära broskkomponenter (kollagen och aggrekan) över en fem veckoperiod, samt mäta metabolisk aktivitet hos cellerna i hydrogelerna. Resultatet visade att odling av kondrocyter i 34 dagar i kitosan-baserade hydrogeler uppvisar någon form av brosktillväxt. Cell-viabilitets mätning visade att kondrocyterna kan leva och växa till i porösa hydrogeler, då CTB visade ökningen i antal celler över en 27 dagarsperiod. Efter 34 dagar sågs ingen signifikant förändring i förhållande till 27 dagar. H&E and Sirius Red påvisade tillväxt av en begränsad kollagen bildning i hydrogelerna i form av homogena strukturer runt kitosanpolymererna. Resultat av denna studie är överens med tidigare studier (19,20) när det gäller kitsons funktion i kondocyters proliferation och tillväxt. Tidigare studier visade brosktillväxt in vitro (18) och broskreparation in vivo (17,18) vilket visar att kitosanet fungerar som en stimulerande mikromiljö för kondrocyterna att bilda broskkomponenter. I en studie in vitro kunde specifikt extracellulära matrix påvisas vid en veckas odling i kitosan hydrogeler med kaninkondrocyter. Hydrogelerna implanterades tillbaka till kaninernas knän. Resultatet visade god reparation i knäet (17). En studie på kondrocyter från nässeptumbrosk (hyalint brosk) visade också att kitosan kan effektivt stimulera tillväxt av kondrocyter(21).

AB och Safranin O färgningar visade inte aggrekan bildning i hydrogelerna. dock färgade de positivt det nativa brosket. Kitosan är ett naturligt material som består av många polysackarider som liknar sammansättningen av proteoglykaner, därför kitosan stimulerar proteoglykaner produktion (17). Misslyckandet med att bilda aggrekan i 3D kitosan baserade hydrogeler i den här studien kan ha olika orsaker såsom tillgång till tillväxtfaktorer, kitosanets struktur och tid i odling. Medium innehåller tillväxtfaktorer, cytokiner och specifika molekyler som är viktiga för cellsignalering (22). En jämförande studie indikerade att scaffold egenskaper samt odlings förhållanden har stor effekt på aggrekan utryck (23).

Metoddiskussion

Snittning och färgningen av hydrogelerna

Snittningen av hydrogelerna och ledbrosk som legat i formalin i mer än 30 dagar var inte lätt. Hydrogelerna porositet gjorde att snitten bröts eller vek sig, vilket observerades makroskopiskt och under mikroskopet. Ledbrosk bitarna var för hårda och en bit ramlade av från paraffinklossen och lämnade en tom plats.

Många av hydrogelerna lossnades ifrån glasen vid färgningen, vilket tyder på adhesionsmetoden inte var optimalt för att kunna fästa de porösa hydrogelerna. Hydrogelernas porer gör hydrogelerna som en svamp som suger vätskan och vatten (24), vilket orsakar att hydrogelerna snitt suger vatten och lossnade från glasen.

Hydrogeler och cellodling

Andel celler som vidhäftade sig i hydrogelerna var mycket lägre än den teoritiskt maximala som var 40 000 (som räknades fram med CTB från referensbrunnarna). Detta kan bero på att den metaboliska aktiviteten var lägre i hydrogelerna, att reagenset inte penetrerade hela strukturen, och/eller hydrogelerna hade för stor porstorlek, så att majoriteten av cellerna föll igenom till botten av brunnarna. Det senare kunde observeras vid inspektion av brunnarna med mikroskop dagen efter insådd. Trots den här stora förlusten av cellantal kunde ändå ett antal celler vidhäfta sig i hydrogelernas porer och bilda begränsat med kollagena fibrer. Porstorlek kan mätas med Skanning Elektron Mikroskop (SEM) som visar porers morfologi och storlek. Porstorleken måste vara inte för liten för att tillåta cellpenetration och metabolisk aktivitet (24).

Kitosan kan vara ett effektivt biomaterial inom MACI-teknik. Blandningen av kitosan med andra material kan vara effektivare för cellvidhäftning och stimulering av produktion av ECM-komponenter. Användningen av en adhesive material i kitosanet gör att celler vidhäftar sig starkt i hyrogelen (19). I en nyligen genomförd studie visade att kitosan blandningen med gelatin och Vinyl Alcohol för ett göra en 3D hydrogel kan vara ett effektivt biomaterial in brosktillväxt. Studien tog slutsatsen att lång tidsodling stödjer cellerna att bibehålla den cellulära kluster-/ ECM-bildning (25)

Antigen avmaskning

Immunohistokemiska tekniker kunde inte påvisa kollagen II i hydrogelerna trots att ledbroskkontrollen färgades positivt. Detta kan bero på att antigen avmaskning med

hyaluronlidase och trypsin inte har lyckats i hydrogelerna. I en tidigare studie hade de använts 2%hyaluronidase i 30 min i rumstemperatur för att avmaska kollagen II och färgningen lyckades (17). I denna studie inkuberades hydrogelerna i 37 ^{o}C för en timme, vilket kanske förstördes dem eftersom kollagena fibrer i hydrogelerna är ny bildade och sköra. Kollagena fibrer blir också stabilare i närvaro av aggrekan (2).

Avmaskning av kollagen i hudkontrollen på samma sätt för brosk var inte effektivt eftersom hudkontrollen inte visade positivitet för kollagen I färgning. Avmaskningen kan vara en orsak till negativt resultat. Även om samma antigen ska avmaskas kan det behövas en annan typ av avmaskningsmetod för huden. Det kan vara effektivare att avmaska huden med värmebehandling i dinatriumsaltslösning (EDTA) pH 8.0 eller Citrat buffert vid pH 6.0. (26)

Aggrekan avmaskades med Proteinas K i rumstemperatur men detta har inte fungerat. Aggrekan måste finnas i extra cellulära matrixen mellan celler för att brosk skall påvisas (2). ledbrosket har lagt i formalin i mer än 30 dagar och detta gör strukturen mer komplex och fler metylenbryggor bildades. Därför kanske behövdes högre temperatur för antigen avmaskning eller en annan typ av avmaskningen teknik såsom värme (16).

För vidare studier

Utmaningar med att kunna påvisa specifika proteiner intryck i hydrogeler är inte mindre än utmaningar med att försöka hitta ett passande medium för cellernas tillväxt. Hydrogelerna måste fixeras, snittas och färgas med hög kvalitet för att kunna se kondrocyterna och broskkomponenters distribution in i hydrogelerna. Därför rekommenderas för vidare studier att prova olika sätt för antigen avmaskningen i hydrogelerna. Det är viktigt att optimering avmaskningsmetoder för hydrogelerna och kontrollerna för att kunna se det riktiga resultatet (15).

Passande storlek på hydrogelernas porer är en utmaning och spelar en stor roll i resultatet. Porositet ökar hastigheten för cellvidhäftningen och ökar cellkompatibilitet hos hydrogeler (24). Porerna måste vara anpassande för att cellerna ska kunna vidhäfta sig i hydrogeler men samtidigt ska de inte glida genom hydrogelerna. Ett förslag kan vara att tillverka hydrogeler som har varierande i porstorlek, då större porer ligger uppe i hydrogelen och porernas storlek smalas av nere i hydrogelen, då fångar hydrogelerna större antalceller. Ett annat sätt kan vara att öka vidhäftning till matrisen genom coatning med till exempel mussel-addhesivt protein som visade sig ett bra material som stödjer cellvidhäftning i scaffold fixering (27).

Användningen av en effektiv metod för vävnadshäftningen på glasen hjälper till att få hela hydrogelsnitten efter färgningen. Ett problem vid färgningen är att många snittar eller en del av snitten för hydrogelerna förvann och lossnade ifrån glasen. Därför är det rekommenderat att använda starkare adhesionsmetod vid snittningen till glasen. Det kan vara använda värme (60 ^{o}C) under en längre tid, efter snittning på glas, eller silanisering av glasen före snittning. (24,15).

Slutsats

Slutsatsen som kan dras från denna studie är att kitosan-baserade hydrogeler kan fungera för cell-och broskstillväxt eftersom kollagena fibrer detekterades med Sirius red och H&E samt att CTB-mätningen visade ökning i antalceller över 27 dagar odlingstid. Mindre porstorlek i hydrogeler och /eller tillsats av något adhesiv till exempel mussel-adhesivt protein kan vara effektivt för att bibehålla celler i hydrogelerna och öka brosktillväxten. Avseende immunhistokemin är det essentiellt att optimera antigen avmaskning i hydrogelerna och för att antigener ska vara tillgängliga för antikroppar.

Referenser

1. Young B, Woodford P, O´Dowd G. Wheater´s Functional Histology -A Text and Colour Atlas. 6:e uppl. USA: Elsevier; 2006.

2. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Articular Cartilage: structure, composition, and function. Sports Health. 2009; 1:461–468

3. Li H, Hu C, Yu H och Chen C. Chitosan composite scaffolds for articular cartilage defect repair: a review. RSC advances, 2018; 8: 3736–3749.

4. Hardin J, Bertoni G. Becker's World of the Cell. 9:e uppl. England; Pearson Education;2017.

5. Youngstrom DW, Cakstina I, Jakobsons E. Cartilage-derived extracellular matrix extract promotes chondrocytic phenotype in three-dimensional tissue culture. 2016; 44:1040–1047.

6. Song SJ, Park CH. Microfractue for cartilage repair in the knee: current concepts and limitations of systematic reviews. Ann Transl Med. 2019; 7:108.

7. Haung BJ, HU JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. Biomaterials. 2016; 98: 1–22.

8. Zheng D, Chen T, Han L, LV S, Yin J, Yang K, et al. Synergetic integrations of bone marrow stem cells and transforming growth factor-B1 loaded chitosan nanoparticles blended silk fibroin injectable hydrogel to enhance repair and regeneration potential in articular cartilage tissue. Int Wound J. 2022; 19:1023-1038.

9. Akter S, Addepalli R, Netzel ME, Tinggi U, Fletcher MT, Sultanbawa Y, et al. Antioxidant-Rich Extracts of Terminalia ferdinandiana Interfere with Estimation of Cell Viability. Antioxidants. 2019; 8: 191.

10. Zhang M, Zhang F, Li C, An H, Wan T, Zhang P. Application of Chitosan and Its Derivative Polymers in Clinical Medicine and Agriculture. Polymers (Basel). 2022; 14: 958.

11. Karbowniczek JE, Kaniuk Ł, Berniak K, Gruszczyński A, Stachewicz U. Enhanced Cells Anchoring to Electrospun Hybrid Scaffolds with PHBV and HA Particles for Bone Tissue Regeneration. Front Bioeng Biotechnol. 2021; 9: 632029

12. Alibegović A, Blagus R, Martinez IZ. Safranin O without fast green is the best staining method for testing the degradation of macromolecules in a cartilage extracellular matrix for the determination of the postmortem interval. Forensic Sci Med Pathol. 2020 ;16: 252-258.

13. Nielsen LF, Moe D, Kirkeby S, Garbarsch C. Sirius red and acid fuchsin staining mechanisms. Biotech Histochem. 1998; 73: 71-7.

14. Rieppo L, Janssen L, Rahunen K, Lehenkari P, Finnilä MAJ, Saarakkala S. Histochemical quantification of collagen content in articular cartilage. PLoS One. 2019; 14: e0224839.

15. Rosenberg L. Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am. 1971; 53: 69-82.

16. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods-Theory and practice. 5th Edition;Scion Publishing Ltd 2015.

17. Cook DJ, Warren PJ. Cellular Pathology An introduction to Techniques and applications. 3:e uppl. Banbury: Scion; 2015.

18. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8:e uppl. UK: Elsevier; 2019.

19. Rogina A, Pušić M, Štefan L, Ivković A, Urlić I, Ivanković M, et al. Characterization of Chitosan-Based Scaffolds Seeded with Sheep Nasal Chondrocytes for Cartilage Tissue Engineering. Ann Biomed Eng. 2021; 49: 1572-1586.

20. Zhao M, Chen Z, Liu K, Wan YQ, Li XD, Luo XW, et al. Repair of articular cartilage defects in rabbits through tissue-engineered cartilage constructed with chitosan hydrogel and chondrocytes. J Zhejiang Univ Sci B. 2015; 16: 914-23

21. Chiu YH, Chen IC, Lin TH, Young TH, Fang HW. Effects of Chitosan on Chondrocytes Derived from Human Nasal Septal Cartilage. In Vivo. 2023 ;37: 2001-2005.

22. Chen L, Liu J, Guan M, Zhou T, Duan X, Xiang Z. Growth Factor and Its Polymer Scaffold-Based Delivery System for Cartilage Tissue Engineering. Int J Nanomedicine. 2020; 15: 6097–6111.

23. Albrecht C, Tichy B, Nürnberger S, Hosiner S, Zak L, Aldrian S, et al. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. Osteoarthritis Cartilage. 2011; 19: 1219–27.

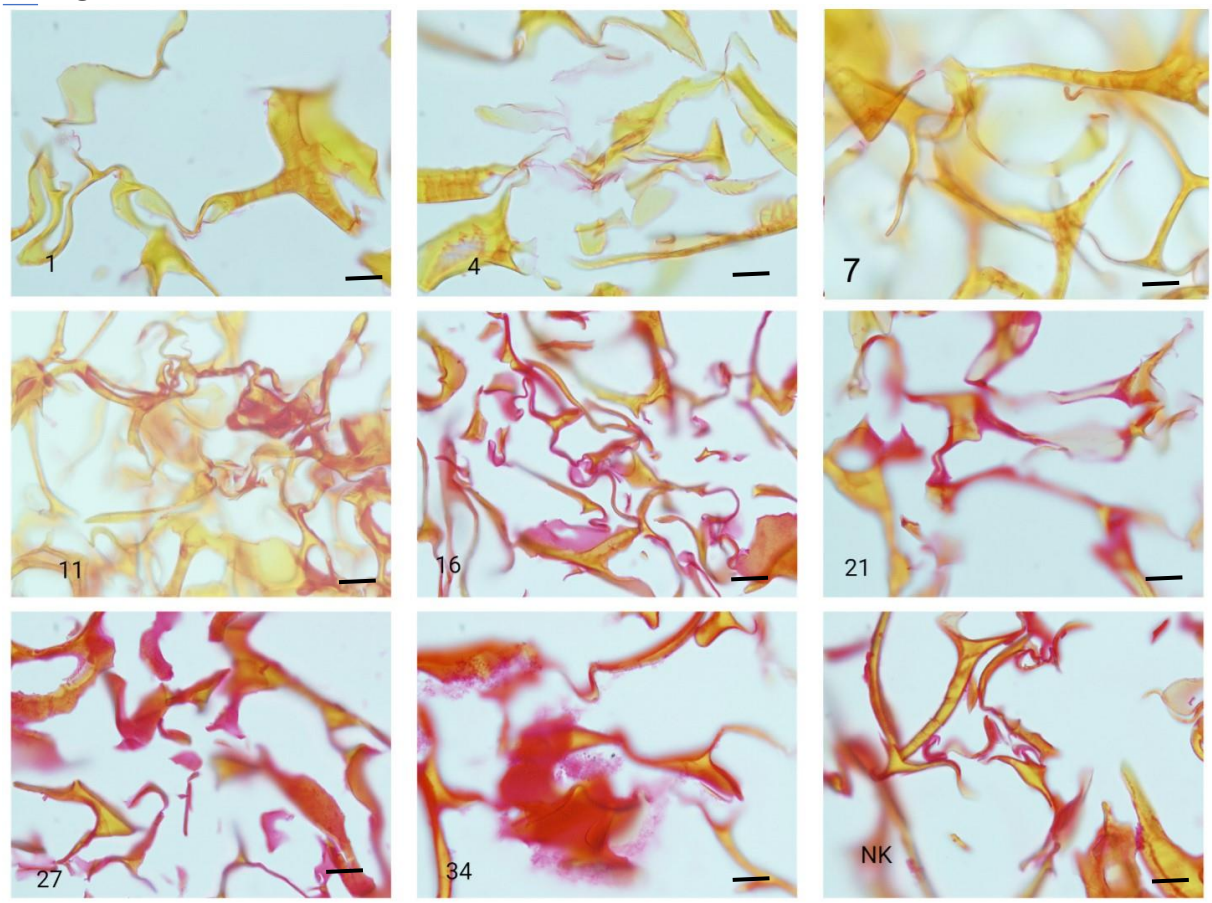
24. Chen Z, Zhao M, Liu K, Wan Y, Li X, Feng G. Novel chitosan hydrogel formed by ethylene glycol chitosan, 1,6-diisocyanatohexan and polyethylene glycol-400 for tissue engineering scaffold: in vitro and in vivo evaluation. J Mater Sci Mater Med. 2014; 25: 1903-1913.

25. Ortega-Sánchez C, Melgarejo-Ramírez Y, Rodríguez-Rodríguez R, Jiménez-Ávalos JA, Giraldo-Gomez DM, Gutiérrez-Gómez C, et al. Hydrogel Based on Chitosan/Gelatin/Poly (Vinyl Alcohol) for In Vitro Human Auricular Chondrocyte Culture. Polymers. 2024; 16: 479.

26. Passeron T, Coelho SG, Miyamura Y, Takahashi K, Hearing VJ. Immunohistochemistry and in situ hybridization in the study of human skin melanocytes. Exp Dermatol. 2007; 16: 162–70.

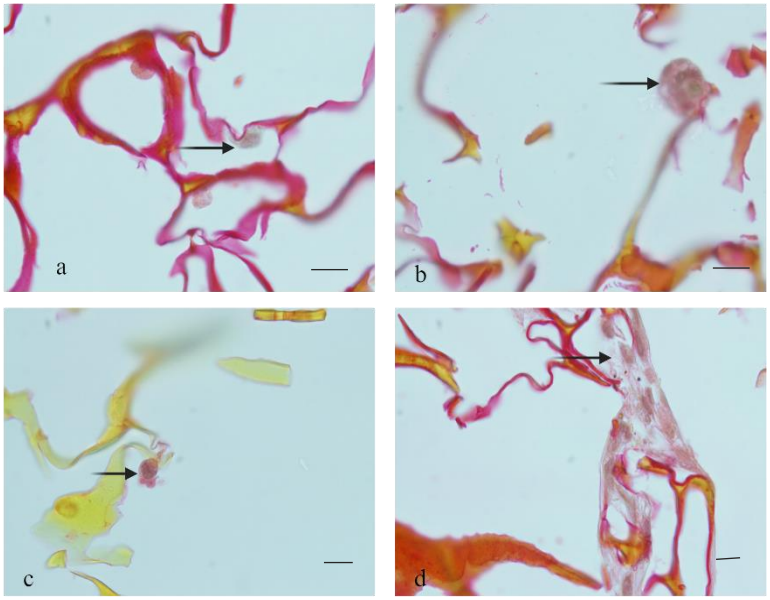
27. Ivarsson M, Prenkert M, Cheema A, Wretenberg P, Andjelkov N. Mussel Adhesive Protein as a Promising Alternative to Fibrin for Scaffold Fixation during Cartilage Repair Surgery. Cartilage. 2021; 13: 663S-671S.

Bilaga 1.



Figur 14, SR-färgning på hydrogelerna på 100 X. Siffrorna illustrerar antal odlingsdagar och NK: Negativ hydrogel kontroll. Skalan: 20 µm.

Bilaga 2.



Figur 14. Sirius Red färgning. a. b. d. hydrogel vid 27 odlingsdagar. c. Hydrogel vid 4 odlingsdagar. Pilar pekar på några celler som odlades i hydrogeler. Cellkärnor färgades svagt brunt. Skalan: 20 µm