

Paulina ZIĘTEK, Beata BUTRUK, Tomasz CIACH

e-mail: p.zietek@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Otrzymywanie nowoczesnych biomateriałów do kardiochirurgii metodą inżynierii tkankowej

Wstęp

Poszukiwania biomateriałów budujących sztuczne implanty naczyniowe, takie jak sztuczne serce, stanowią jeden z ważnych kierunków badań prowadzonych w obszarze inżynierii biomedycznej.

Obecnie stosowane w praktyce klinicznej wszczepialne protezy serca zbudowane są głównie z polimerów syntetycznych, takich jak poliuretan (PU) [Polskie Sztuczne Serce, 2007-2011].

PU jest materiałem o wielu cechach dobrego materiału implantacyjnego [Wu, 2012]. Mimo to, po kilkunastu-kilkudziesięciu tygodniach od wszczęcia obserwuje się pękanie i degradację poliuretanu [Ward i in., 2005]. Może to doprowadzić do powstawania skrzepów krwi na powierzchni implantu, które z dużym prawdopodobieństwem dostaną się wraz z krążeniem do naczyń włosowatych. Jest to bardzo niebezpieczne z uwagi na ryzyko spowodowania zatoru, a w rezultacie nawet śmierci pacjenta [Bittl, 1996].

W celu wyeliminowania niepożądanych zjawisk mających miejsce na powierzchni implantu z PU w wyniku kontaktu z krwią i tym samym wydłużenia sprawności implantu, powierzchnię polimeru należy poddać modyfikacji. Najbardziej obiecujące wydaje się rozwiązanie polegające na upodobnieniu sztucznego implantu do naturalnego organu. Idea jest szczelne pokrycie powierzchni protezy polimerowej warstwą żywych ludzkich komórek śródbłonka, które występują wewnątrz naturalnych naczyń krwionośnych i serca [Wnuczko, 2007]. W ten sposób powierzchnia polimeru zostałaby odizolowana od krwi, co prawdopodobnie zapobiegłoby korozji. Poza tym, komórki śródbłonka reagowałyby na powstające zależki skrzepów hydrolizując je [Wnuczko, 2007].

W niniejszej pracy podjęto próbę opracowania nowatorskiego materiału na bazie poliuretanu, zawierającego powierzchniową warstwę komórek śródbłonka. Komórki śródbłonka są w stanie rozpoznać i związać cząsteczki kolagenu obecne na powierzchni PU dzięki grupie receptorów błonowych zwanych integrynami [De Mell i Seifalian, 2008]. Skutkuje to trwałym zakotwiczeniem się komórek na powierzchni polimeru, zmianą ich morfologii oraz wzrostem i proliferacją (rozmnażaniem) [De Mell i Seifalian, 2008]. Pierwszą część pracy stanowi przyłączenie cząsteczek kolagenu do powierzchni PU. W zakres części drugiej wchodzi hodowla komórek śródbłonka na otrzymanych materiałach.

Opis badań doświadczalnych

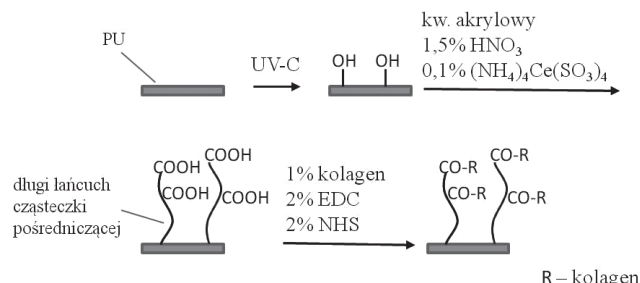
Materiał

Jako materiał bazowy wykorzystano PU typu *Estane 5715 P* w formie cienkich filmów o grubości 0,3mm.

Przyłączenie cząsteczek kolagenu do powierzchni PU

Przyłączenie cząsteczek kolagenu zrealizowano w trzech etapach (Rys. 1). W pierwszym kroku zaktywowano powierzchnię inertnego chemicznie PU poprzez naświetlanie jego powierzchni za pomocą promieniowania w zakresie UV-C przez 5 h. W ten sposób uzyskano na powierzchni reaktywne grupy hydroksylowe.

Następnie wykorzystano je do wprowadzenia długich cząsteczek pośredniczących poli(kwasu akrylowego) na drodze polimeryzacji *in situ* kwasu akrylowego inicjowanej redukcją jonów ceru (IV). Reakcję prowadzono w określonej temperaturze, przez określony czas w warunkach ciągłego mieszania w roztworze wodnym zawierającym 1,5% (v/v) HNO₃, 0,1% (w/v) (NH₄)₄Ce(SO₃)₄ oraz określone stężenie kwasu



Rys. 1. 3-etapowy schemat modyfikacji powierzchni PU zakończony przyłączeniem cząsteczek białka – kolagenu

akrylowego. Po zakończeniu reakcji próbki zostały wypłukane wodą destylowaną i wysuszone w suszarce w temp. 40°C.

W ostatnim etapie do cząsteczek pośredniczących przyłączono cząsteczki kolagenu. Reakcję prowadzono przez 2 h w warunkach ciągłego mieszania w roztworze wodnym zawierającym 2% (w/v) karbodiimidu (EDC), 2% imidu kwasu N-hydroksybenszotynowego (NHS) i ok. 1% (v/v) roztworu kolagenu. Następnie próbki zostały dokładnie wypłukane w roztworze soli fizjologicznej.

Szczególnie istotny jest drugi etap modyfikacji. Umieszczenie cząsteczek białka (kolagenu) na końcach długich cząsteczek pośredniczących trwale związanych z PU jest niezbędne, aby komórki śródbłonka mogły z nimi prawidłowo oddziaływać [Hersel i in., 2003]. Z uwagi na szczególne znaczenie etapu przyłączania poli(kwasu akrylowego), przeprowadzono analizę wpływu parametrów zastosowanych na tym etapie na jego efektywność. Zastosowano temperatury: 25, 35 i 45°C, czasy: 0,5 i 1,5 h oraz 5, 10, 15 i 20% (v/v) kwasu akrylowego. Następnie oznaczono ilość powierzchniowych grup karboksylowych (COOH) w mM na 1 cm² filmu PU w metodą kolorymetryczną [Gupta, 2001]. Do przyłączenia kolagenu wybrane zostały próbki z poli(kwasem akrylowym) otrzymane przy użyciu najlepszych parametrów.

Hodowla komórek śródbłonka na otrzymanych materiałach

Przeprowadzono hodowlę komórek śródbłonka w celu sprawdzenia ich reakcji na otrzymane materiały. Próbki PU z przyłączonymi cząsteczkami kolagenu oraz próbki PU niezmodyfikowanego wysterylizowano przed hodowlą naświetlając promieniowaniem UV przez 30min. Hodowla ludzkich komórek śródbłonka z pepowiny HUVEC (*Human Umbilical Cord Endothelial Cells*) była prowadzona przez 48 h w 37°C w standardowej pożywce. Komórki wybarwiono fluorescencyjnie w celu wyznaczenia ich żywotności podczas hodowli. Po 24 i 48 h hodowli przeprowadzono obserwację mikroskopową.

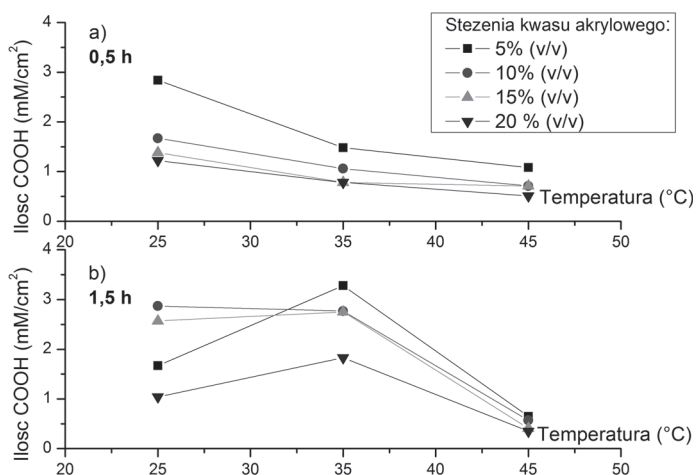
Wyniki badań i dyskusja

Na rys. 2 przedstawiono wykresy zależności ilości powierzchniowych grup COOH na 1cm² próbki PU od czasu prowadzenia procesu przyłączania długich cząsteczek pośredniczących dla danej temperatury i danego stężenia kwasu akrylowego.

Zaobserwowano, że w najwyższej zastosowanej temperaturze (45°C) uzyskiwane były małe ilości grup COOH, co świadczy o niskiej wydajności procesu w tych warunkach. Poza tym, w temperaturze 45°C ilość COOH nie zmienia się znacząco wraz z wydłużeniem czasu trwania procesu. Również zwiększanie stężenia kwasu akrylowego nie zaowocowało uzyskaniem większych ilości grup COOH.

Takie prawidłowości zostały także odnotowane przez innych autorów [Chansook i Kiatkamjornwong, 2003]. Przyczyną jest najprawdopodobniej konkurencyjny proces – homopolimeryzacja kwasu akrylowego, która zachodzi ze zwiększoną intensywnością w powyższych warunkach.

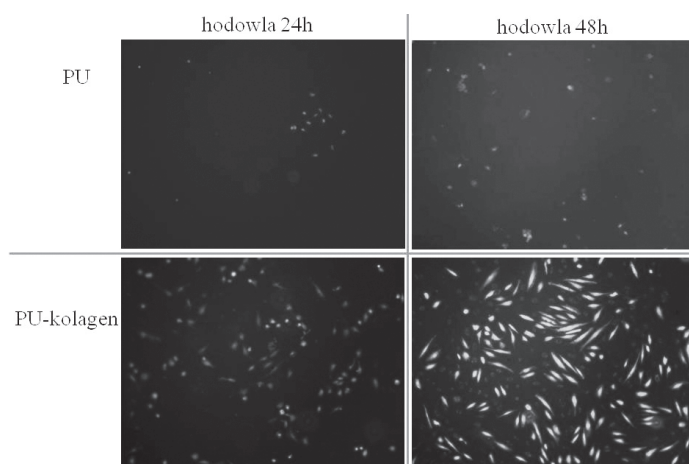
Wyznaczone ilości grup COOH były podobne dla 5, 10 i 15% kwasu akrylowego w temperaturze 25 i 35°C, jednakże jedynie próbki otrzymane przy użyciu 5% kwasu akrylowego prezentowały zadowalającą gładkość. Największą ilość COOH (3,28 mM COOH/cm²) odnotowano dla 5% kwasu akrylowego, 35°C i 1,5 h (Rys. 2 b). Te parametry zostały uznane za najbardziej odpowiednie.



Rys. 2. Zależność ilości grup karboksylowych w mM/cm² próbki PU od zastosowanej temperatury procesu 25, 35 i 45°C dla stężeń kwasu akrylowego równych 5, 10, 15 i 20% (v/v) w przypadku prowadzenia procesu przez 0,5h (Rys. 2a) i przez 1,5 h (Rys. 2b)

W literaturze można odnaleźć dane wskazujące na 50°C jako optymalną temperaturę przyłączania poli(kwasu akrylowego) [Lee, 2000] niemniej jednak w przeciwieństwie do niniejszej pracy, we wspomnianym eksperymencie gładkość otrzymanych próbek nie była istotna. Uzyskany optymalny czas 1,5 h mieści się w wyznaczonych przez innych autorów granicach: od 1 [Chansook i Kiatkamjornwong, 2003; Lee, 2000] do 2–3 h [Mohanty i Parija, 1998].

Rys. 3 przedstawia zdjęcia komórek śródbłonka na powierzchni PU z przyłączonymi cząsteczkami kolagenu (powiększenie 100×). Powierzchnia czystego (niezmodyfikowanego) filmu PU nie indukuje wzrostu i proliferacji komórek śródbłonka. Zarówno po 24 jak i po 48 h widoczne są głównie komórki martwe.



Rys. 3. Zdjęcia komórek HUVEC na powierzchni niezmodyfikowanego PU i PU z przyłączonymi cząsteczkami kolagenu po 24 i 48 godzinach hodowli (mikroskop optyczny odwrócony, powiększenie 100×)

Natomiast na powierzchni PU z kolagenem komórki nie tylko przeżywają, ale także rozplaszczają i wydłużają. Ponadto, zarówno po 24 h jak i po 48 h hodowli można zaobserwować charakterystyczne pary komórek powstałe po podziale. Zarówno zmiana kształtu komórek, jak i ich podziały świadczą o prawidłowej reakcji na cząsteczki kolagenu na powierzchni PU [Gao, 2003]. Poza tym, jest to dowód na to, że cząsteczki kolagenu zachowały wymaganą aktywność biologiczną i są trwale przyłączone do powierzchni PU.

Jednakże, nie udało się uzyskać szczelnej warstwy komórek, mimo że udawało się to innym autorom stosującym inne zamiast kolagenu białka [Blit, 2011]. Przyczyną może być stopniowa degradacja kolagenu przez enzymy wydzielane przez komórki.

Wnioski

Zaproponowany w pracy proces prowadzący do otrzymania PU z trwale przyłączonymi cząsteczkami kolagenu został przeprowadzony z sukcesem.

Wykonane materiały wywołały oczekiwaną, pozytywną reakcję komórek śródbłonka.

Opisana metoda otrzymywania materiałów promujących adhezję komórek śródbłonka jest bardzo obiecująca ze względu na jej prostotę i niski koszt.

Przyszłe badania będą koncentrować się wokół możliwości zastąpienia kolagenu krótszym peptydem bardziej odpornym na degradację przez enzymy komórkowe.

LITERATURA

- Bittl, J.A., 1996. Coronary stent occlusion: Thrombus horribilis. *Journal of the American College of Cardiology*, **28**, nr 2, 368-370. DOI: 10.1016/S0735-1097(96)00183-0
- Blit P.H., 2011. Platelet inhibition and endothelial cell adhesion on elastin-like polypeptide surface modified materials. *Biomaterials*, **32**, nr 25, 5790-5800. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.067
- Chansook N., Kiatkamjornwong S., 2003. Ce(IV)-initiated graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) fiber. *Journal of Applied Polymer Science*, **89**, nr 7, 1952-1958. DOI: 10.1002/app.12380
- De Mel, A., Seifalian A. M., 2008. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: A review. *Biomacromolecules*, **9**, nr 11, 2969-2979. DOI: 10.1021/bm800681k
- Gao C., 2003. Surface immobilization of bioactive molecules on polyurethane for promotion of cytocompatibility to human endothelial cells. *Macromolecular Bioscience*, **3**, nr 3-4, 157-162. DOI: 10.1002/mabi.200390020
- Gupta B., 2001. Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films. *Journal of Applied Polymer Science*, **81**, nr 12, 2993-3001. DOI: 10.1002/app.1749
- Hersel U., Dahmen, C., Kessler H., 2003. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, **24**, nr 24, 4385-4415. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0
- Lee M.H., 2000. Grafting onto cotton fiber with acrylamidomethylated β -cyclodextrin and its application. *Journal of Applied polymer science*, **78**, nr 11, 1986-1991. DOI: 10.1002/1097-4628(20001209)78:11<1986::AID-APP190>3.0.CO;2-7
- Polskie Sztuczne Serce, 2007-2011. Program wieloletni na lata 2007-2011. (03.2013) <http://www.pwps.pl>
- Mohanty A.C., Parija S., 1998. Ce(IV)-N-acetylglycine initiated graft copolymerization of acrylonitrile onto chemically modified pineapple leaf fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, **60**, nr 7, 931-937. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19960516)60:7<931::AID-APP2>3.0.CO;2-N
- Ward R., Anderson J., McVenes R., Stokes K., 2005. In vivo biostability of polysiloxane polyether polyurethanes: Resistance to biologic oxidation and stress cracking. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **77A**, nr 3, 580-589. DOI: 10.1002/jbm.a.30555
- Wnuczko K., 2007. Endothelium - Characteristics and functions. Śródbłonek - Charakterystyka i funkcje. *Polski Merkurusz Lekarski*, **23**, nr 33, 60-65.
- Wu Z., 2012. Hemocompatible polyurethane surfaces. *Polymers for Advanced Technologies*, **23**, nr 11, 1500-1502. DOI: 10.1002/pat.207