

Příprava podpůrných tkáňových struktur z funkcionalizovaných biopolymerů

Miroslava Rysová, Lenka Martinová

Abstrakt

Práce se zabývá možnostmi přípravy nanovláknenných materiálů s obsahem kolagenu s využitím „biologicky přátelských rozpouštědel“ pro aplikace v regenerativní medicíně. Pro zpracování těchto materiálů byly využity dvě odlišné metody – elektrostatické zvláknování směsi polymerů a také dodatečná funkcionalizace homopolymerních PCL nanovláken navázáním kolagenu na jejich povrch. Oběma metodami byly úspěšně připraveny nanovláknenné vrstvy obsahující prokazatelné množství kolagenu. U připravených materiálů byla studována morfologie nanovláknenné vrstvy a vliv složení na ni a také na jejich krystalinitu. V závěru práce byla testována jejich vhodnost pro aplikaci jako nosných struktur v tkáňovém inženýrství – v tomto konkrétním případě tkáňovém inženýrství kosti.

Úvod

Kolagen je materiál velice zajímavý pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Elektrostatické zvláknování tohoto materiálu z biologicky vhodných rozpouštědel však bývá značně problematická. Z tohoto důvodu se využívá kombinace vlastností kolagenu – zejména jeho bioaktivity, se snadněji zvláknitelnými materiály. Velice zajímavé možnosti potom může skýtat jeho kombinace se syntetickými biodegradabilními polymery, které mohou přinést zlepšení mechanických vlastností nanovláknenné vrstvy, prodloužení doby degradace in vitro a také možnosti vzniku nových struktur. Příkladem takového syntetického polymeru je poly-ε-kaprolaktom (PCL), jež se vyznačuje dobrými mechanickými vlastnostmi, je hydrofobní a umožňuje tvorbu například porézních nanovláken.[3]

Experiment a metody

Nanovláknenné vrstvy PCL/K a substráty pro imobilizaci kolagenu na povrch byly připraveny metodou elektrostatického zvláknování z volné hladiny na tzv. tyčkové aparatuře. Aplikace této metody zvláknování umožňuje předpoklad, že materiály budou reprodukovatelné na zařízení NanospiderTM. [1] Poly-ε-kaprolakton (PCL, M_n 45.103, Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn tetrahydrofuranu (THF, Lach-Ner, s. r. o.) s přídavkem dimethylsulfoxidu (DMSO, Penta) jako aditiva. Kolagen (K) typ I, pocházející z kuřecích běháků, byl získán od společnosti Elmarco a byl rozpuštěn ve zředěných roztocích kyseliny octové (AA, Chemapol/Lachema). U druhé z použitých technologií byla imobilizace kolagenu na homopolymerní PCL nanovláknenné vrstvy provedena po předchozí aktivaci povrchu plazmatickou úpravou. Ta byla realizována na vakuové vysokofrekvenční (RF) plazmatické aparatuře při různých procesních podmínkách.

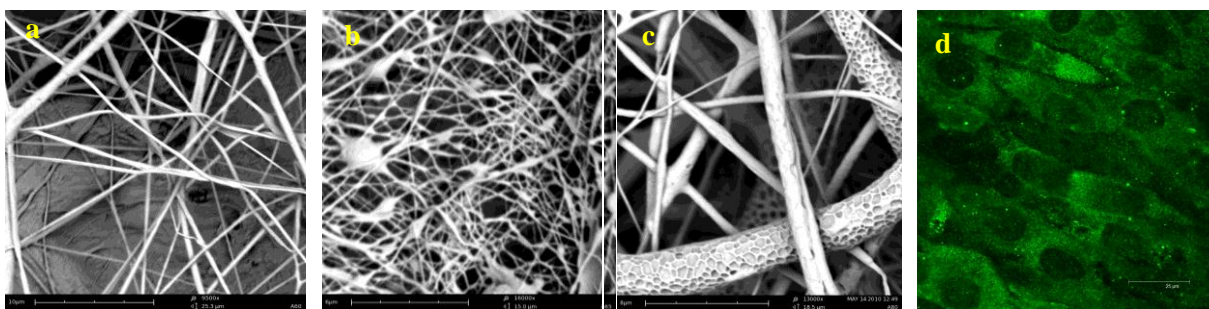
Morfologie nanovláknenných vrstev byla studována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM, ESEM-PhenomTM) a dále vyhodnocena pomocí softwaru NIS-ElementsTM. Přítomnost kolagenu v nanovláknenných vrstvách byla ověřena pomocí Fourierovy transformační infračervené spektroskopie (FTIR, Perkin Elmer). Pro identifikaci kolagenu sloužily píky typické pro vibrace I. a II. amidů na 1633cm^{-1} a 1540cm^{-1} . Vliv podílu kolagenu na krystalinitu nanovláknenných vrstev byl studován prostřednictvím diferenční skenovací kalorimetrie (DSC, Perkin Elmer – DSC 6).

Vhodnost materiálů pro aplikace v medicíně byla ověřena testy buněčného růstu in vitro. V průběhu 8 dnů byla sledována adheze buněk, proliferace, viabilita a exprese markerů buněčného růstu u osteoblastům podobných buněk MG-63.

Výsledky a diskuze

V případě elektrostatického zvlákňování směsi polymerů byly získány nanovláknenné materiály s podílem kolagenu až 36%(hm.) (viz obr. 1b). Vliv podílu kolagenu a procesních podmínek na jejich morfologii byl značný. Obecně lze říci, že se zvyšujícím se podílem kolagenu klesal průměr nanovláken – při podílech nad 25% byla získána nanovláknena s průměry pod 100 nm. S klesajícím podílem kolagenu a rostoucí vlhkostí vzduchu byl zaznamenán nárůst počtu a rozměrů nerovností na povrchu jednotlivých nanovláken. S rostoucím podílem kolagenu klesala krystalinita nanovláken a z výsledků DSC analýzy lze předpokládat, že kolagen má, stejně jako některé další biopolymery [2], při krystalizaci nukleační efekt.

I v případě imobilizace kolagenu na povrch nanovláken byly získány materiály s podílem kolagenu prokazatelným FTIR analýzou. Ta byla použita také ke stanovení optimálních procesních parametrů plazmatické úpravy substrátu. SEM analýza prokázala zachování vláknenné morfologie PCL porézních nanovláken použitých jako substrát (obr. 1c) i po úpravě plazmou a imobilizaci makromolekul kolagenu. Testy buněčného růstu potvrdily vhodnost materiálů připravených zvlákňování směsi PCL/K. Proliferace buněk u nich zaznamenaná byla vyšší a exprese markerů srovnatelná v porovnání se standardem. Viabilita přesáhla 90%. V případě materiálů připravených imobilizací byly výsledky značně horší. Tento výsledek může mít řadu příčin – například radikály vznikající při plazmatické úpravě.



Obr. 1 SEM snímky nanovláknenných vrstev PCL/K s podílem složek (a) 86/14 a (b) 64/36 %. (c) SEM snímky PCL porézních nanovláken po imobilizaci kolagenu. (d) konfokální mikroskopie buněk MG-63 kultivovaných na PCL/K nanovláknenné vrstvě.

Závěr

V průběhu práce byly úspěšně připraveny série materiálů s prokazatelným obsahem kolagenu – a to oběma studovanými metodami. Materiály připravené elektrostatickým zvlákňováním směsi PCL/K se ukázaly být vhodnými kandidáty pro aplikaci v regenerativní medicíně. V případě materiálů s imobilizovaným kolagenem je nutné nalézt konkrétní příčiny nízké viability buněk a vyřešit je např. úpravou doplněním pracovního postupu nebo procesních podmínek při úpravě plazmou.

Poděkování

Autorka diplomové práce by ráda poděkovala pracovnícím TUL Ing. Denise Zálešákové, Ing. Janě Müllerové, Ph.D. a Mgr. Eleně Filové, Ph.D. z AV ČR, jejichž pomoc pozitivně ovlivnila vznik této práce.

Reference

- [1] Jirsák, O. et al., 2005. *CZ Patent, 294274 (2004), WO 2005/024101*
- [2] Ciardelli, G. et al., 2005. *Biomacromolecules*, 6 (4), pp. 1961 – 1976
- [3] Lubasová and Martinová 2009. *In the First International Conference NANOCON® 2009*. Rožnov pod Radhoštěm, Czech republic, October 2009. Ostrava:Tanger spol. s r. o.