

Příprava podpurných tkáňových struktur z funkcionalizovaných biopolymerů

Miroslava Rysová

doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.



Ústav nových technologií a aplikované informatiky, Fakulta mechatroniky, Informatiky a mezioborových studií, TUL, Liberec, Česká republika

Abstract

This work deals with manufacturing of nanofibrous layers containing collagen from environmentally friendly solvents which might be applicable in regenerative medicine. Manufacturing of these materials was realized by two different ways — (i) via electrospinning of collagen in blend with structural polymer or (ii) via functionalization of homopolymer PCL nanofibres by a covalent binding of collagen onto their surface.

Both these methods led to creation of nanofibrous sheets with demonstrable content of collagen which was confirmed by the FTIR analysis. The SEM observation was also used to analyse the morphology and effect of the collagen content on crystallinity was examined via DCS analysis. At the end of this work, the potential of the created materials to be applied as scaffolds in tissue engineering of bone was verified.

Kolagen je materiál velice zajímavý pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Elektrostatické zvláknění 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-kaprolakton (PCL), jež se vyznačuje dobrými mechanickými vlastnostmi, je hydrofobní a umožňuje tvorbu například porézních nanovláken.[3]

Použité metody



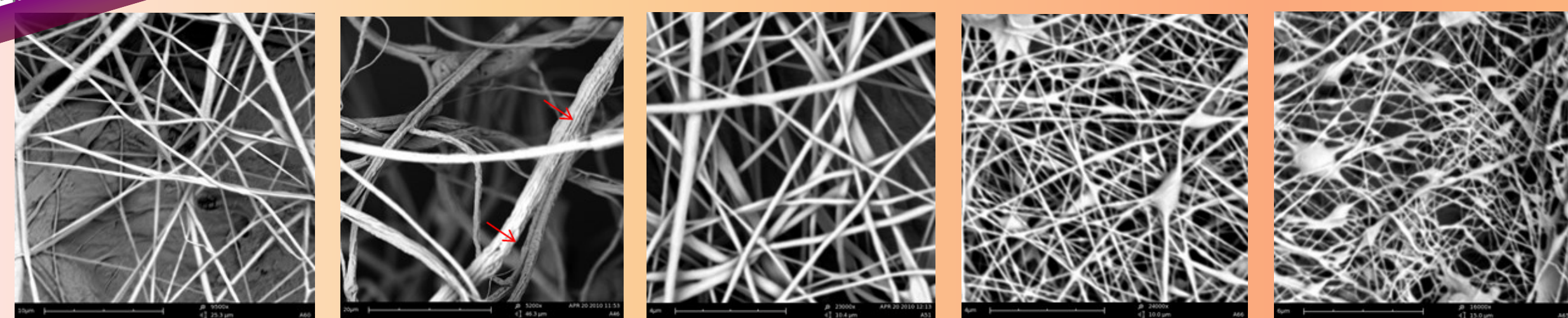
Nanovláknenné vrstvy s obsahem kolagenu byly v této práci připraveny dvěma různými metodami — elektrostatickým zvlákněním z volné hladiny na tzv. „tyčkové aparatuře“ a také imobilizací makromolekul kolagenu na povrch nanovláknenného substrátu po aktivaci jeho povrchu plazmou.

První z metod byla použita vzhledem k nesporným výhodám použití nanovláknenných materiálů obsahujících směs přírodního a syntetického polymeru, a také vzhledem k možnostem jejich průmyslové výroby—viz [1].

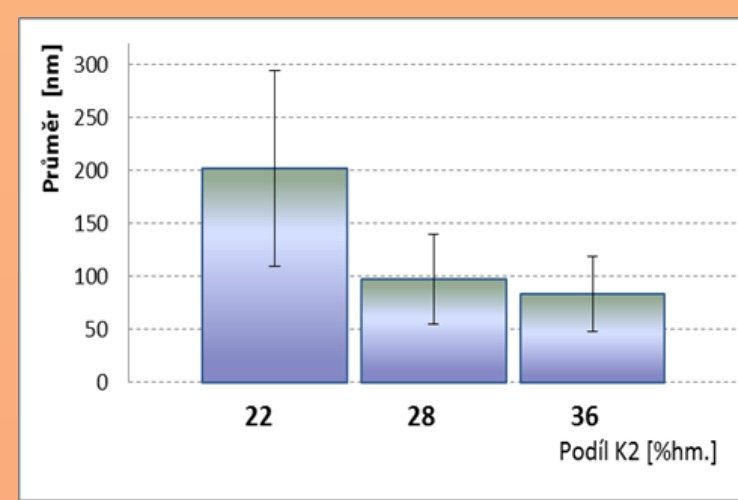
U druhé metody byla pro aktivaci povrchu využita RF plazmatická vakuová aparatura. V průběhu práce byl vyšetřován vliv podmínek aktivace i samotné imobilizace na její účinnost. Sledovanými parametry byly vliv reakčního plynu, vliv doby smáčení a také koncentrace imobilizačního roztoku.



SEM analýza



Obr. 1 SEM snímky nanovláken s různým podílem PCL/kolagen.



Graf 1 Vliv podílu kolagenu na průměr PCL/K nanovláken.

SEM analýza byla použita jednak k ověření nanovláknenné struktury připravených materiálů, ale také k vyšetření závislosti morfologie a průměrů nanovláken na podílu kolagenu. SEM analýza byla také použita k ověření vlivu jednotlivých parametrů aktivace a následné imobilizace na nanovláknenný povrch a jeho případnou degradaci.



Obr. 2 SEM snímky PCL substrátu pro imobilizaci kolagenu.



Graf 2 FTIR křivky PCL/K nanovláken s různým podílem složek.

FTIR analýza

FTIR analýza byla použita k ověření přítomnosti kolagenu v nanovláknenných vrstvách připravených zvlákněním směsi i imobilizací jeho molekul na povrch substrátu. Porovnáním intenzit vibračních typických pro molekuly kolagenu byly stanoveny optimální podmínky zpracování obou materiálů.

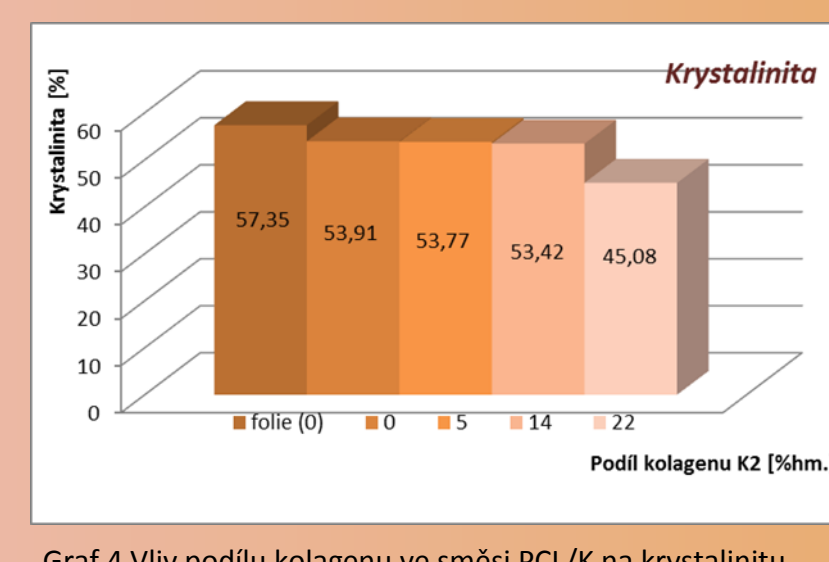
K identifikaci kolagenu sloužily typické píky amidických vibrací:

1653 cm⁻¹: vibrace C=O a deformáční vibrace N-H z primárního amidu (I.amid)

1540 cm⁻¹: deformáční vibrace N-H a valenční vibrace C-H skupiny (II.amid)



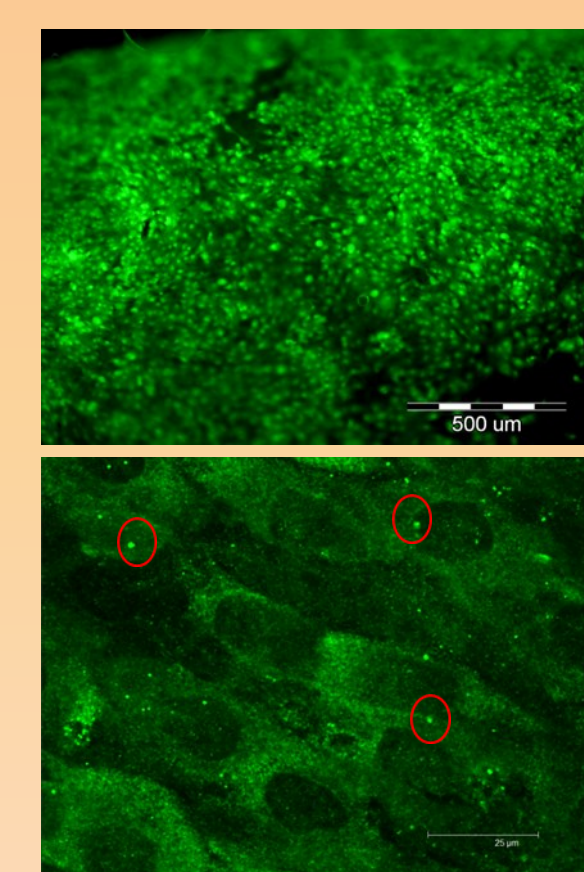
Graf 3 FTIR křivky PCL nanovláken s kolagenem mobilizovaným po plazmové aktivaci s použitím různých reakčních plynů.



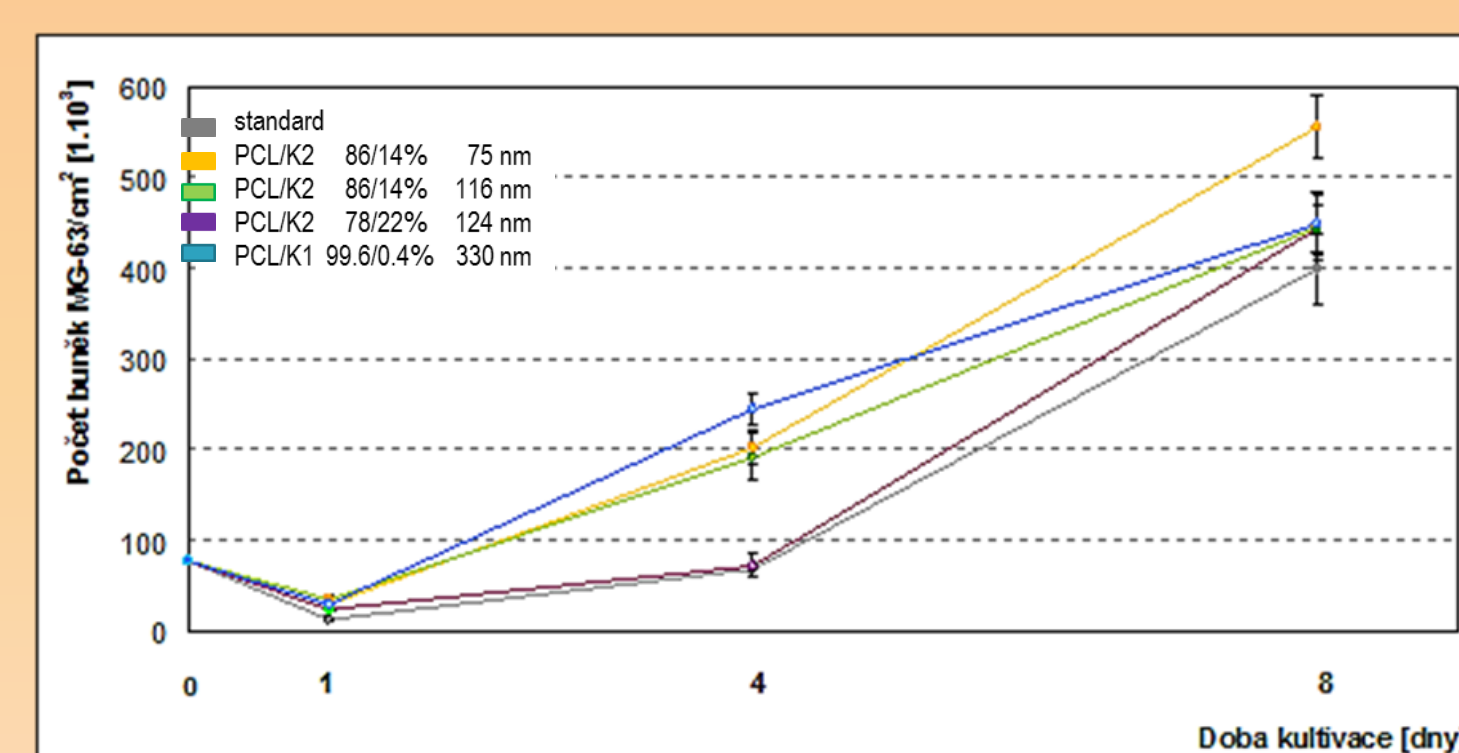
Graf 4 Vliv podílu kolagenu ve směsi PCL/K na krystalinitu.

DSC analýza prokázala, že směs PCL/K použitou pro elektrostatické zvláknění je možné označit za „mísitelnou či částečně mísitelnou“ a byla potvrzena klesající tendence krystalinity s rostoucím podílem kolagenu ve směsi. Zároveň byl potvrzen nukleační efekt kolagenu [2].

Testy buněčné proliferace



Obr. 3 (a) Fluorescenční mikroskopie a (b) konfokální mikroskopie buněk MG-63 na vzorku PCL/K 86/14, 75 nm.

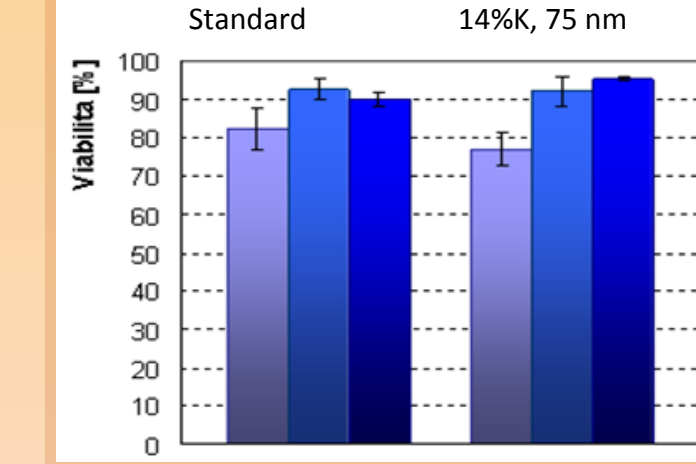


Graf 5 Proliferační křivky buněk MG-63 na PCL/K nanovláken s různým poměrem těchto složek.

Pro testy buněčné proliferace byly využity osteoblastům podobné buňky MG-63 pocházející z karcinomu kosti 13-letého chlapce.

U vybraných materiálů byla testována adheze, proliferace a také viabilita—tyto parametry byly testovány v intervalech 1 den, 4 a 8 dní od započetí kultivace. Fluorescenční mikroskopie byla použita ke sledování šíření buněčné kultury. Imunofluorescenční barvení a následné pozorování s pomocí konfokálního mikroskopu bylo použito ke sledování exprese markerů buněčného růstu kostních buněk jako jsou alkalická fosfatáza (ALP) a osteokalcin (OC).

U materiálů připravených elektrostatickým zvlákněním směsi PCL/K byla pozorována konfluence buněk již po 4 dnech kultivace a potvrzena exprese sledovaných markerů. Proliferace u všech nanovláknenných vzorků byla vyšší ve srovnání se standardem, stejně jako viabilita, která po 8 dnech kultivace přesahovala 90%.



Graf 6 Viabilita buněk 1., 4. a 8. dni

Závěr

V průběhu práce byly úspěšně připraveny série materiálů s prokazatelným obsahem kolagenu – a to oběma studovanými metodami. Metodou elektrostatického zvláknění se podařilo získat nanovláknenné vrstvy s podílem kolagenu až 36% (hm.) a průměry nanovláken pod 100 nm. Přítomnost kolagenu byla potvrzena infračervenou spektroskopií FTIR a doplňující kalorimetrické testování metodou DSC prokázalo vliv přítomnosti kolagenu na krystalinitu nanovláken. Materiály připravené směsí PCL/K se ukázaly být vhodnými kandidáty pro aplikaci v regenerativní medicíně. V případě materiálů s imobilizovaným kolagenem nebyly výsledky buněčné uspokojivé. Tento výsledek mohl být způsoben vznikem volných radikálů při aktivaci povrchu plazmou. U těchto vzorků je nutné nalézt konkrétní příčiny nízké viability buněk a vyřešit je např. úpravou doplněním pracovního postupu nebo procesních podmínek při úpravě plazmou.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2013.

Autorka diplomové práce by ráda poděkovala pracovnícům TUL Ing. Denise Zálesákové, Ing. Janě Müllerové, Ph.D. za pomoc se SEM a FTIR analýzou a také Mgr. Eleně Filové, Ph.D. z AV ČR za její pomoc a vedení při testech buněčné kultivace.

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.

Kontakt

Ing. Miroslava Rysová

Centrum pro nanomateriály, nové technologie a inovace, TUL, Studentská 1402/2, Liberec 1

E-mail: miroslava.rysova@tul.cz

Tel: +420 485 353 169