

# Výplňové materiály na bázi silk fibroinu pro ortopedické aplikace

Dagmar Poláková <dagmar.polakova@tul.cz>, Michal Malík

Za účelem aplikace v ortopedické oblasti byly vytvořeny degradabilní sférické částice na bázi silk fibroinu, proteinu izolovaného z kokonů bource morušového. Tyto nosiče byly v rámci biomimetického přístupu doplněny také o nanočástice hydroxyapatitu reprezentující anorganickou složku kostní tkáně a antibiotikum se širokým spektrem účinku jako profylaxe postoperativní infekce. V podmínkách *in vitro* byla testována kompatibilita připravených materiálů, účinek na bakteriální kmeny a v neposlední řadě byl sledován vliv příměsí na morfologii vzniklých částic.

**Klíčová slova:** silk fibroin, hydroxyapatit, tkáňové inženýrství, kost, scaffold

## Úvod

Osteomyelitida je zánětlivé onemocnění, které postihuje všechny věkové skupiny a může vést až k postupné destrukci kosti. Pro současnou ortopedickou praxi představuje i přes stále se zlepšující zobrazovací metody velmi závažný problém. Zhruba 80% případů je způsobeno posttraumatickým nebo postoperativním zánětem. Okolo třetiny případů se vyvine do chronické fáze v důsledku vytvoření bakteriálního biofilmu na povrchu implantovaných materiálů. Optimální volbou pro náhradu kostní tkáně by proto mohl být biokompatibilní, degradabilní materiál s antibakteriální aktivitou a vhodnou morfologií.

## Metodika

Silk fibroin je protein získávaný z kokonů bource morušového (*Bombyx mori*), který je již tradičně využíván v textilním průmyslu a v posledních desetiletích nachází uplatnění také jako materiál pro tvorbu chirurgického šití. Díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě, výborným mechanickým vlastnostem a nízké imunogenicitě je v současné době intenzivně studován v oblasti cílené dopravy léčiv a tkáňového inženýrství. V tomto odvětví hraje kromě chemického složení zásadní roli i morfologie používaných materiálů. Trojrozměrné scaffoldy jsou ve tkáňovém inženýrství využívány především za účelem podpory buněčné migrace, adheze a tvorby nové extracelulární hmoty, zároveň by měla jejich struktura umožňovat transport živin a metabolitů tak, aby došlo k co nejrychlejšímu zacelení defektu. U výplňových materiálů kostní tkáně je kladen velký důraz na jejich porozitu, kdy by velikost

pórů měla být minimálně 100 $\mu$ m. U materiálů, které této porozity nedosahují je často přistupováno k vytváření menších útvarů, které mezi sebou při vyplnění defektu vytváří další využitelný prostor pro prorůstání buňkami a průchod metabolitů. V současné ortopedické praxi jsou často využívány anorganické sférické částice, jejichž největší nevýhodou je velmi pomalá degradace způsobující pacientům bolestivost.

Hydroxyapatit tvoří hlavní anorganickou část kostí, jeho hmotnostní obsah se v kostech pohybuje v rozsahu 50-70%. Velmi často je díky své biokompatibilitě a bioaktivitě používán pro náhrady kostní nebo zubní tkáně. Pro svou křehkost a nízkou pružnost není používán samostatně, ale především jako příměs kombinovaná s různými typy polymerů.

Cílem naší práce bylo vytvoření trojrozměrného výplňového materiálu o vhodné morfologii, který by umožňoval spojení unikátních vlastností silk fibroinu, hydroxyapatitu jako přirozené součásti kostí a antibakteriálního efektu použité příměsi.

Metodou vkapávání vodného roztoku silk fibroinu s příměsí hydroxyapatitu a modelového antibiotika do tekutého dusíku byly vytvořeny sférické částice o průměru 2-3 mm, které byly následně stabilizovány. Biokompatibilita vzniklého materiálu byla testována metabolickým MTT testem na buněčné linii lidských osteoblastů (MG63). Morfologie byla analyzována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Antibakteriální efekt vzniklých materiálů byl testován v přímém kontaktu s modelovými kmeny gram pozitivních i gram negativních bakterií.

## Výsledky a diskuze

Na základě biomimetického přístupu byly úspěšně vytvořeny nosiče kombinující organickou a anorganickou složku ve formě směsných sférických částic. Organickou část materiálu tvoří silk fibroin, anorganickou část pak reprezentují částice hydroxyapatitu. Byla vytvořena škála částic s hmotnostním obsahem hydroxyapatitu vůči silk fibroinu od 0 do 50%. V rámci profylaxe postoperativní bakteriální kontaminace byly kombinované částice doplněny také o gentamicin sulfát, antibiotikum se širokým spektrem účinku.

Příměs antibiotika výrazně ovlivnila bakteriální růst v okolí aplikace u všech připravených materiálu a zároveň nijak nenarušovala jejich kompaktnost ani morfologii.

Hranici cytotoxicity určenou 70% viability neovlivněných buněk nepřekročil ani jeden z připravených materiálů. Obsah příměsi viabilitu linie lidských kostních buněk, které byly v kontaktu s materiálem naopak zvyšoval.

## Závěr

V podmínkách *in vitro* vykazují kombinované sférické částice na bázi silk fibroinu s příměsí hydroxyapatitu a modelového antibiotika významný potenciál stát se vhodným materiálem pro náhradu kostní tkáně. V budoucnosti bude nezbytné doplnit výsledky také studií v *in vivo* podmínkách

## Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce doc. Ing. Lence Martinové, CSc. za odborné vedení v průběhu celé práce.

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2020, dále Technologickou agenturou ČR grantem TH03020281 a MŠMT v rámci programu Operační program a Výzkum a vzdělávání projektem Hybridní materiály pro hierarchické struktury CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000843.

## Reference

[1] Beck-Broichsitter BE, Smeets R, Heiland M. Current concepts in pathogenesis of acute and chronic osteomyelitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28:240–5.

- [2] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:131-139.
- [3] U.-J. Kim, J. Park, H. Joo Kim, M. Wada, a D. L. Kaplan, „Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin“, *Biomaterials*, roč. 26, č. 15, s. 2775–2785, kvě. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.044.
- [4] [19] A. E. Thurber, F. G. Omenetto, a D. L. Kaplan, „In vivo bioresponses to silk proteins“, *Biomaterials*, roč. 71, s. 145–157, pro. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.039.
- [5] Y. Wang *et al.*, „In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds“, *Biomaterials*, roč. 29, č. 24–25, s. 3415–3428, srp. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.002.