

# Dr inż. Gabriela Imbir

**Promotor:** dr hab. inż. Roman Major, profesor instytutu (IMIM PAN)

**Tytuł rozprawy:** Biomechanika i morfologia odzwierzęcej tkanki acellularnej poddanej funkcjonalizacji powierzchniowej

**Tytuł rozprawy w języku angielskim:** Biomechanical and morphological effect on the acellular animal origin tissue caused by surface functionalization

**Słowa kluczowe:** biomateriały, powłoki polimerowe, interakcja komórka-materiał, proteza zastawki serca, interakcja krew-materiał

**Keywords:** biomaterials, polymer-based coatings, cell-material interaction, heart valve bioprotheses, blood-material interaction

**Charakterystyka pracy w języku polskim:** W rozprawie doktorskiej podjęto temat utworzenia nowego typu zastawki serca niwelując wady obecnie dostępnych protez tj. zwapnienie bądź niska hemozgodność. Proponowane rozwiązanie pozwoliłoby na odwzorowanie tkanki odzwierzęcej na wzór zastawki ludzkiej przy wykorzystaniu rusztowania stanowiącego biodegradowalną macierz zewnątrzkomórkową (ECM). Uzyskanie ECM jest możliwe dzięki procesowi acellularyzacji tj. usunięcie komórek z tkanki. Jednakże, pomimo wielu technik acellularyzacji, każda z nich ma destrukcyjny wpływ na tkankę, przez co niemożliwe jest otrzymanie czystej macierzy zewnątrzkomórkowej. Odbudowa włókien kolagenowych i elastycznych, które wchodzi w skład struktury macierzy, jest niezbędna, dlatego też należy przeprowadzić funkcjonalizację powierzchniową.

Głównym celem pracy była funkcjonalna powłoka hamująca proces wykrzepiania dedykowana do acellularnej tkanki odzwierzęcej do zastosowania w układzie sercowo-naczyniowym człowieka. Do modyfikacji ECM zaproponowano dwa podejścia umożliwiające hamowanie procesu krzepialności krwi: pośrednio i bezpośrednio. Metoda pośrednia opierała się na zaprojektowaniu wielowarstwowych powłok polielektrolitowych tj. Chitosan z Siarczanem Chondroitiny (Chi/CS), które miały za zadanie stworzyć odpowiednie warunki do formowania się monowarstwy śródbłonka (wyściółki naczyń krwionośnych). Natomiast metoda bezpośrednia polegała na opracowaniu powłok na bazie hydrożeli oraz powłok w postaci nośnika leku. W pracy szczególną uwagę zwrócono na hamowanie procesu wykrzepiania poprzez działanie na receptor glikoproteinowy typu IIb/IIIa. Nośniki leku utworzono na podstawie nanokapsuł kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) i kompleksów micelarnych (PECM), które rozpuszczając się do czynników prostych umożliwiałyby uwalnianie leku do krwiobiegu. W niniejszej pracy przeprowadzono analizy interakcji krew-materiał w silnych warunkach ścinających. Badanie właściwości fizyko-chemicznych obejmowało analizę kąta zwilżania, chropowatości a także topografii i morfologii powierzchni z przyżyciu technik CLSM, AFM oraz SEM/TEM. Przy

wykorzystaniu CLSM obrazowano tworzenie się monowarstwy śródbłonka na powierzchni materiałów.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że modyfikacja powierzchniowa wielowarstwami polielektrolitowymi na bazie Chi/CS podnosi właściwości hemozgodne, jak również w przypadku modyfikowanych powłok poprzez proces sieciowania. Wykazano, że dzięki sieciowaniu możliwa jest kontrola nad właściwościami fizyko-chemicznymi materiałów. W przypadku materiałów do bezpośredniej interakcji z krwią, stwierdzono, że materiały na bazie hydrożeli charakteryzują się niską hemozgodnością. Kapsuły PLGA jak i kompleksy micelarne efektywnie zadokowały lek. Ponadto, zauważono, że nanokapsuły PLGA charakteryzują się lepszymi właściwościami hemozgodnymi i fizyko-chemicznymi w porównaniu do kompleksów micelarnych.

**The abstract of the thesis (in English):** Materials engineering techniques and their connection to tissue engineering may offer a promising tools for the development of a novel valve prosthesis. The proposed solution should involve the reconstruction of the animal origin tissue using a biodegradable extracellular matrix (ECM) and repopulate it with patient's cells. Obtaining ECM is possible by the decellularisation process, i.e., the cell removal. Despite the various decellularisation techniques, each of them has a destructive effect on the tissue, thus it is impossible to obtain a pure extracellular matrix. The reconstruction of collagen and elastic fibres, which build the matrix structure, is crucial, therefore surface functionalisation is needed. The main purpose of the dissertation is the development of functional polymer-based coating, dedicated to decellurised animal origin tissue, which would inhibit the coagulation process. Two approaches of ECM modification have been proposed to inhibit the blood coagulation process, the indirect and direct way. The indirect method was based on the Polyelectrolyte Multilayer Films (PEMs), i.e., Chitosan with Chondroitin Sulphate (Chi/CS), which would stimulate the cell growth to form an endothelial monolayer. The physico-chemical properties of the coatings were regulated by the chemical cross-linking process and by the incorporation of carbon-based nanoparticles. The direct method involved the development of hydrogel-based coatings and films with drug delivery system. In the study, the inhibition of the coagulation process was focused on the glycoprotein IIb/IIIa receptor. The drug carriers were presented in the form of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanocapsules and micellar complexes (PECM), which would enable the release of the drug into the bloodstream.

In this study, analyses of blood-material interactions under dynamic conditions. The study of the physico-chemical properties included the analysis of the wettability, roughness, and surface topography/morphology using the CLSM, SEM/TEM and AFM techniques. An analysis of the adhesion of endothelial cells to the surface was performed by CLSM.

The obtained results showed that the surface modification with Chi/CS multilayers improved the haemocompatible properties, for both unmodified and cross-linked films. It has been shown that cross-linking process can control the physico-chemical properties of the PEMs.

For materials developed for direct blood interaction, the hydrogel-based materials are characterised by low haemocompatibility. PLGA nanocapsules and micellar complexes effectively encapsulated the anticoagulant drug. The micelles indicated a quick drug release rate. It was found that PLGA and micelles complexes have good haemocompatibility.

## Publikacje z zakresu pracy:

1. Major, R., Imbir, G., Mzyk, A., Wilczek, P., Sanak, M., & Lackner, J. M. (2018, October). Stabilization of Synthetic Materials with Silver Particles. In Conference on Innovations in Biomedical Engineering (pp. 321-328). Springer, Cham.
2. Mzyk, A., Imbir, G., Trembecka-Wojciga, K., Lackner, J. M., Plutecka, H., Jasek-Gajda, E., Kawałko, J., & Major, R. (2020). Rolling or two-stage aggregation of platelets on the surface of thin ceramic coatings under in vitro simulated blood flow conditions. *ACS Biomaterials Science & Engineering*.
3. Imbir, G., Mzyk, A., Trembecka-Wójciga, K., Jasek-Gajda, E., Plutecka, H., Schirhagl, R., & Major, R. (2020). Polyelectrolyte Multilayer Films Modification with Ag and rGO Influences Platelets Activation and Aggregate Formation under In Vitro Blood Flow. *Nanomaterials*, 10(5), 859.
4. Kopernik, M., Major, R., Lis, G., Wilczek, P., Lis, M., Imbir, G., Chrouda, A., Mzyk, A., Ostrowski R., & Sanak, M. (2020). The interaction of laser radiation with tissue in the aspect of generating the process of decellularization in the preparation of animal origin autologous tissue. *Acta of bioengineering and biomechanics*, 22(1), 67-77.
5. Imbir, G., Major, R., Mzyk, A., Wilczek, P., Sanak, M., Strzelec, M., Ostrowski, R., & Rycyk, A. (2020, May). Shockwave-Generating Interdisciplinary Methods Used to Elaborate Acellular Tissue Origin Extracellular Matrix. In International Scientific Conference Advances in Applied Biomechanics (pp. 299-309). Springer, Cham.
6. Major, R., Kopernik, M., Kuźmińska, A., Imbir, G., Plutecka, H., Pomorska, M., Ciach, T., & Lackner, J. M. (2021). In vitro haemocompatibility assessment of acrylic acid deposited on solid, polyurethane substrate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 199, 111562.
7. Reczyńska, K., Major, R., Kopernik, M., Pamuła, E., Imbir, G., Plutecka, H., Bruckert, F., & Surmiak, M. (2021). Surface modification of polyurethane with eptifibatide-loaded degradable nanoparticles reducing risk of blood coagulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 201, 111624.