

Biomechanical and morphological effect on the acellular animal origin tissue caused by the surface functionalization

Gabriela Imbir

Streszczenie:

Postęp w dziedzinie biomateriałów dedykowanych na protezy sercowonaczyniowe odgrywa kluczową rolę w związku z wysoką śmiertelnością spowodowaną chorobami serca zarejestrowaną w krajach rozwiniętych. Dotychczas stosowane mechaniczne protezy zastawek serca wymagają ciągłej terapii przeciwzakrzepowej. W przypadku aplikacji zastawek biologicznych o pochodzeniu ksenogenicznym (tj. świńskie, bydłęce) występuje ryzyko zwapnienia lub zmian strukturalnych.

Przedstawione ograniczenia związane z wykorzystywaniem konwencjonalnych protez doprowadziły do poszukiwania alternatywnych rozwiązań. Rozwój w inżynierii materiałowej i jej powiązanie z inżynierią tkankową może dać obiecujące narzędzia dla stworzenia nowego rodzaju protezy zastawki. Nowa terapia polegałaby

na wysianiu komórek autologicznych pacjenta na rusztowaniu tkankowym o pochodzeniu zwierzęcym. 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 wchodzą 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 Chondroityny (Chi/CS), które miały za zadanie stworzyć odpowiednie warunki do formowania się monowarstwy śródbłonka (wyściółki naczyń krwionośnych). Właściwości powłok były regulowane poprzez proces sieciowania chemicznego oraz dzięki wprowadzeniu nanocząstek na bazie węgla. 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, w celu określenia stopnia trombogenności materiałów przy wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej (CLSM), a także technik cytometrii przepływowej. Badanie właściwości fizyko-chemicznych obejmowało analizę kąta zwilżania, chropowatości a także topografii i morfologii powierzchni z przy użyciu technik CLSM, AFM oraz SEM/TEM. Przeprowadzono analizę adhezji komórek śródbłonna do powierzchni poprzez CLSM, materiały poddano badaniom cytotoksyczności (żywołności komórek) oraz immunogenności pod kątem czynników pro-zapalnych. 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. Praca przedstawiła innowatorskie podejście w temacie projektowania materiałów do odbudowy i przywrócenia funkcjonalności odkomórczonych zastawek serca, wpływając na przyszłe badania w zakresie układu sercowo-naczyniowego.

Abstract

The development of biomaterials dedicated to cardiovascular prostheses plays an important role due to the high mortality caused by heart diseases on the worldwide range. Current mechanical heart valve prostheses require continuous anticoagulant therapy, whereas the application of biological valves (i.e., porcine, bovine) could cause calcification or structural alterations. Thus, scientists began to search for alternative solutions. 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 polymerbased 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 crosslinking 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 were performed to determine the degree of thrombogenicity of the materials using a confocal microscope (CLSM) and flow cytometry. The study of the physico-chemical properties included the analysis of the wettability, roughness, and surface topography, and 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 materials were examined for cytotoxicity and immunogenicity by expression of pro-inflammatory factors. The obtained results showed that the surface modification with Chi/CS multilayers improved the haemocompatible properties, for both unmodified and crosslinked films. It has been shown that cross-linking process can control the physicochemical 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. The work presents an innovative approach to the design of materials for reconstruction of decellularised heart valves and restore its functionality. The presented study has an effect on future research in the field of the cardiovascular system.

[Recenzja - Prof. G. Milewski](#)

[Recenzja - Prof. W. Walke](#)