

ZASTOSOWANIE HYDROŻELI Z LUDZKIEJ ALBUMINY JAKO POWŁOKI USZCZELNIAJĄCE PROTEZY NACZYNIOWE

ANNA SZULC^{1*}, KATARZYNA WALENKO²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ², TOMASZ CIACH¹

¹POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROCESOWEJ,
LABORATORIUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, WARSZAWA, POLSKA,
²WARSZAWSKI UNIwersYTET MEDYCZNY, ZAKŁAD BIOFIZYKI I
FIZJOLOGII CZŁOWIEKA, WARSZAWA, POLSKA
*MAILTO: A.SZULC@ICHIP.PW.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 51-53]

Wstęp

Protezy naczyniowe są szeroko stosowane w chirurgii w celu zastąpienia uszkodzonych lub pomostowania zablokowanych naczyń krwionośnych. Stosowanie sztucznych naczyń jest mniej inwazyjne niż autografting, ze względu na brak dodatkowych zabiegów chirurgicznych związanych z pobraniem autologicznej żyły. W praktyce klinicznej częściej stosowane są protezy dziane ze względu na wysoką porowatość, co wspomaga gojenie, ale z drugiej strony powoduje krwotoki [1]. Aby uniknąć tych komplikacji, przed operacją protezy są uszczelniane poprzez zanurzenie we krwi pacjenta, co sprzyja wzrostowi neointimy [2]. Ta procedura wymaga pobrania znacznej ilości krwi pacjenta, ponadto powstała na powierzchni protezy warstwa skrzepiny jest trombogenna. Dlatego coraz częściej stosowane są protezy z gotową impregnacją z białek zwierzęcych (kolagen, żelatyna), usieciowanych formaldehydem lub aldehydem glutarowym [3],[4], które charakteryzują się wysoką toksycznością. Dlatego też podejmowane są badania mające na celu opracowanie nietoksycznych powłok hydrożelowych o własnościach przeciwwzakrzepowych. W pracy opisano własności biomateriału hydrożelowego przygotowanego z ludzkiej albuminy (Alb) usieciowanej utlenionym dekstranem (DexOx) i jego aplikację jako powłoczenie uszczelniające protezy naczyniowe. Powszechnie wiadomo, że albumina ogranicza adhezję płytek krwi i obniża trombogeniczność zatem wydaje się być idealnym substratem jako powłoka protezy naczyniowej.

Materiały i metody

DexOx otrzymano poprzez częściowe utlenienie dekstranu ($M_w=70kDa$) przy użyciu nadjodanu oraz następnie oczyszczanie produktu reakcji poprzez dializę [5]. Stopień utlenienia oznaczono przy użyciu chlorowodoru hydroksyloaminy [6]. Hydrożele zostały przygotowane poprzez zmieszanie roztworów DexOx i Alb o stężeniu 5 i 10% w odpowiednich proporcjach (2:8; 5:5; 8:2). Badania zdolności do pochłaniania wody oraz szybkość degradacji przeprowadzono w środowisku buforu PBS. Morfologię otrzymanych hydrożeli oceniono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. Zweryfikowano również cytotoxyczność hydrożeli i ich produktów degradacji oceniając przeżywalność ludzkich fibroblastów za pomocą testu XTT.

Kawałki protezy dakronowej zostały pokryte przez zanurzenie różnymi powłokami hydrożelowymi. Zbadano przepuszczalność wody uszczelnionych protez naczyniowych.

APPLICATION OF HYDROGELS COMPOSED OF HUMAN SERUM ALBUMIN FOR DACRON VASCULAR GRAFT SEALING

ANNA SZULC^{1*}, KATARZYNA WALENKO²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ², TOMASZ CIACH¹

¹WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING,
BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY, WARSZAW, POLAND
²MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS
AND HUMAN PHYSIOLOGY, WARSZAW, POLAND
*MAILTO: A.SZULC@ICHIP.PW.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 51-53]

Introduction

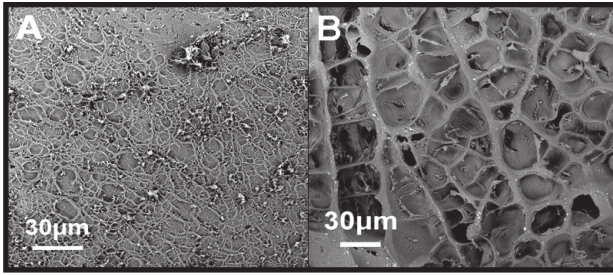
Vascular grafts are widely applied in surgery to bypass or replacement a segment of diseased artery. Application of such artificial vessel is also less invasive than autografting, due to the lack of additional autograft vane sampling surgical procedure. Knitting grafts are more frequently used clinically because of their high porosity, what supports healing, but on the other hand causes bleeding [1]. Thus, before the surgery, graft is sealed with the patient blood clot what encourages the growth of neointima [2]. Unfortunately, this procedure demands additional amount of patient's blood and creates thrombogenic surface. Therefore, vascular prosthesis are pre-sealed with coatings from animal proteins (collagen, gelatin), crosslinked with formaldehyde or glutaraldehyde [3], [4], which are known for their toxicity and cancerogenic properties. Thus, a new type of hydrogel which does not produce toxic effects or inflammatory response, and have antithrombogenic properties is needed. As an example, the hydrogel biomaterials for vascular graft's sealing, preparing from human albumin serum (Alb) cross-linked with oxidized dextran (DexOx) is described in this study. It is generally known that native albumin limits the platelet adhesion and decreases thrombogenicity, so seems to be a perfect substrate as a vascular graft coating.

Materials and methods

DexOx was prepared by partial periodate oxidation of dextran ($M_w=70kDa$) followed by the dialysis purification [5]. The oxidation degree of DexOx was determined by hydroxylamine hydrochloride method [6]. Hydrogels were prepared by mixing DexOx and Alb solutions (5% and 10%) in different ratios (2:8, 5:5, 8:2). Swelling and degradation studies were conducted in PBS. A porous structure was examined under scanning electron microscopy (SEM). Cell viability studies were performed using XTT assay to verify the cytocompatibility of both hydrogels and their degradation byproducts. The pieces of Dacron vascular graft were dip coated with various hydrogels. Obtained composite grafts were subjected to water permeability tests at elevated pressure (120 mmHg).

Results and discussion

The DexOx/Alb hydrogels were transparent and brownish in colour. FIG.1 depicted SEM image of dried hydrogels, revealing highly porous structure. There is an observable influence of the DexOx content to the networks construction



RYS.1. Zdjęcia SEM hydrożeli: A. 2:8; B. 8:2 DexOx/Alb
FIG.1. SEM image of A. 2:8; B. 8:2 DexOx/Alb hydrogel

Wyniki i dyskusja

Na RYS.1 przedstawiono zdjęcia SEM obrazujące strukturę. Zauważono, że wraz ze wzrostem zawartości DexOx struktura hydrożelu jest bardziej porowata.

Zdolność do pochłaniania wody zależy od gęstości wiązań w hydrożelu a tym samym od zawartości DexOx. Dla hydrożelu zawierającego 60% DexOx, stosunek liczby grup aldehydowych do liczby dostępnych grup aminowych jest równa 1, co skutkuje wysoką gęstością wiązań a tym samym niską zdolnością do pochłaniania wody. Nadmiar jednego rodzaju grup zdolnych do utworzenia wiązania powoduje niższą gęstość wiązań a tym samym wysoką zdolność do pochłaniania wody.

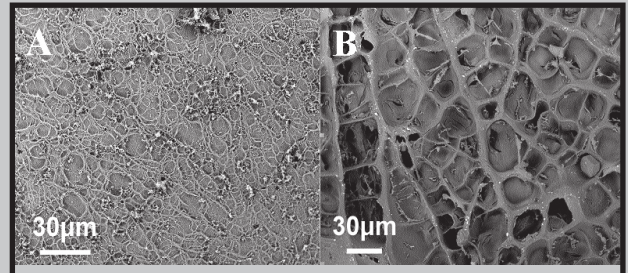
Degradację in vitro hydrożeli powstałych z 5 i 10% roztworów (2:8; 5:5; 8:2) oceniono mierząc ubytek masy. Na RYS.2 przedstawiono wyniki degradacji hydrożeli przygotowanych z 10% roztworów. Hydrożele degradowały na drodze nie enzymatycznej hydrolizy. Najszybsze ubytki masy zaobserwowano w czasie pierwszych 3 dni, potem degradacja była wolniejsza. Otrzymane wyniki wskazują na zależność szybkości degradacji od zarówno gęstości usieciowania czyli od stosunku DexOx i Alb, jak również od podatności na hydrolizę obu substratów. Profil degradacji 5-DexOx-I/Alb był bardzo podobny do przedstawionego na RYS.2, z tymże szybkość degradacji była dwa razy większa.

Biozgodność hydrożeli DexOx-I/Alb (2:8; 5:5; 8:2) została zbadana przy użyciu metody XTT. Przeżywalność komórek była oceniana 2, 7 i 14 dnia hodowli. Wartości przeżywalności w 2 dniu wynosiły od 47 do 79% kontroli (fibroblasty na 2 dni studzienki). Uzyskane rezultaty pokazują, że większość z badanych hydrożeli nie wykazuje toksycznego działania na komórki. Obserwacje mikroskopowe hodowli potwierdzają te wyniki – komórki na powierzchni biomateriałów miały morfologię typową dla prawidłowych fibroblastów.

Wysuszone, pokryte hydrożelami grafty były sztywniejsze niż niepokryte, jednak po zanurzeniu w roztworze soli fizjologicznej na kilka minut stawały się miękkie i rozciągliwe. Zbadano przepuszczalność pokrytych graftów aby określić efektywność hydrożeli jak pokryć uszczelniających. Zastosowanie drugiej warstwy pokrycia spowodowało redukcję przepuszczalności poniżej 1ml/cm²/min, podczas gdy przepuszczalność graftów niepokrywanych wynosiła ok. 1400 ml/cm²/min.

Wnioski

Przedstawione wyniki pokazują, że hydrożele DexOx-I/Alb charakteryzują się różnym stopniem pochłaniania wody oraz szybkością degradacji w zależności od stosunku oksydowanego dekstranu i albuminy. Zastosowanie tego typu hydrożeli jako pokryć uszczelniających grafty naczyniowe



RYS.2. Degradacja hydrożeli
FIG. 2. Hydrolytic degradation of 10-DexOx/Alb hydrogels (ratio 8:2, 2:8, 5:5)

and appearance.

Obtained results of swelling ratio studies showed that it depends on crosslinking density. For DexOx/Alb hydrogels, somewhere around 60% of DexOx content, the ratio of aldehyde groups in DexOx to available amine groups in Alb is equal to 1. This results in the high crosslinking densities so in the lowest swelling ratio. Excess of either aldehyde groups or amine groups in the preparation leads to the lower crosslinking densities so to the higher swelling ratios.

In vitro degradation of 5% and 10% DexOx/Alb hydrogels (ratio 2:8, 5:5, and 8:2) was examined by determining the weight loss of the hydrogels at 37°C. DexOx/Alb hydrogels degraded due to the simple, non enzymatic hydrolysis. As shown in FIG.2, the mass losses were faster in the first 3 days, and then degradation slowed down. Obtained results showed that hydrolytic degradation depended on both crosslinking density, thus on the relative amount of DexOx and Alb used in their preparation; as well as hydrolytic susceptibility of DexOx and Alb. Degradation profiles of 5-DexOx-I/Alb was very similar to those depicted in FIG.2, but the degradation process was about two fold faster.

The cytocompatibility of DexOx-I/Alb (2:8, 5:5, and 8:2) hydrogels and their degradation byproducts were evaluated by performing XTT assay. The cell viability (human fibroblasts) was examined on days 2, 7 and 14 respectively. Obtained results showed that the majority of developed hydrogels did not display toxic properties. The viability values on 2 day ranged from 47 to 79% of control cells (fibroblasts on culture plate). Observation of cells during the culturing revealed morphology typical for correctly developing fibroblasts.

Dried coating grafts were stiffer than uncoated. When immersed in saline for a few minutes they became soft and flexible as without the coating. The measurements of water permeability of composite grafts were fundamental to appraise the effectiveness of hydrogels as sealants. The water permeation value obtained for unsealed grafts was about 1400 (ml/cm²/min). Single DexOx/Alb hydrogels coating drastically decreases water permeability hydrogels. Application of the second coating layer (preparing from 10% solutions) reduced water permeability below 1ml/cm²/min.

Conclusions

Our study showed that DexOx/Alb hydrogel have different swelling behaviour and degradability depending on the ratio of the crosslinker to the protein. Application of these

pozwała uzyskać szczelne grafty, gotowe do użycia bez konieczności przeprowadzania pre-clottingu. Po implantacji, pokrycie hydrożelowe ulega stopniowej degradacji ułatwiając tym samym przerost tkanki przez ściany protezy. To zastosowanie może być również korzystne ze względu na fakt, że albumina jest naturalnym składnikiem krwi oraz zapobiega adhezji trombocytów.

Podziękowania

Niniejsze badania zostały sfinansowane z Projektu Polskiego Sztucznego Serca.

hydrogels as Dacron graft coating provides a ready to use leakage free vane prosthesis without the need of pre-clotting. After implantation, the hydrogel coating degrades gradually allowing tissue ingrowth. This application can be beneficial due to the fact, that albumin is a natural component of blood and is known to prevent protein and thrombocytes adhesion.

Acknowledgments

Presented research was financially supported by the Polish Artificial Heart Project.

Piśmiennictwo

- [1] Phaneuf MD, Dempsey DJ. et al. Coating of Dacron vascular grafts with an ionic polyurethane: a novel sealant with protein binding properties. *Biomaterials*, 22(5):463-469, March 2001.
- [2] Sheehan SJ, Rajaha SM, Kesterb RC. Effect of preclotting on the porosity and thrombogenicity of knitted Dacron® grafts. *Biomaterials*, 10(2):75-79, March 1989.
- [3] Robert G. et al. Collagen coatings as biological sealants for textile arterial prostheses. *Biomaterials*, 6(1):64-67, January 1985.

References

- [4] Yasim A, Gul M, Ciralik H. and Ergun Y. Gelatin-Sealed Dacron graft is not more susceptible to MRSA infection than PTFE graft. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 32(4):425-430, October 2006.
- [5] Fuentes, M, Segura RL. et al.: Determination of protein-protein interactions through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking. *Proteomics*, 4(9):2602-2607, September 2004.
- [6] Zhao H, Heindel ND. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroksyloamine hydrochloride method. *Phram Res*, 8(3):400-402, March 1991.

WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE WYBRANYCH MATERIAŁÓW CHITOZANOWYCH

ALINA SIONKOWSKA, JUSTYNA KOZŁOWSKA*, ANNA PŁANECKA,
JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA, PAULINA ŁOŚ

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU,
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL.GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA
*MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 53-55]

Wprowadzenie

Materiały na bazie chitozanu charakteryzują się wysoką biokompatybilnością oraz bardzo cennymi właściwościami biologicznymi – chitozan m.in. przyspiesza gojenie się ran, posiada właściwości antybakteryjne, jest biodegradowalny i nietoksyczny. Z chitozanu stosunkowo łatwo można otrzymać materiał w postaci żelu, membrany, nanowłókna, mikro- i nanocząsteczek, skafoldu, czy też gąbki. [1]. Z tego powodu znalazł on szerokie zastosowanie w medycynie (m.in. w produkcji implantów, opatrunków na rany i oparzenia oraz jako nośnik preparatów o kontrolowanym działaniu) [2, 3]. Właściwości fizyczne i chemiczne chitozanu zależą przede wszystkim od jego ciężaru cząsteczkowego oraz stopnia deacetylacji. Chitozan jest polimerem podatnym na degradację, m.in. utleniającą, hydrolityczną, termiczną, czy też degradację ultradźwiękami [4].

SURFACE PROPERTIES OF DIFFERENT CHITOSAN MATERIALS

ALINA SIONKOWSKA, JUSTYNA KOZŁOWSKA*, ANNA PŁANECKA,
JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA, PAULINA ŁOŚ

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,
7 GAGARINA STREET, 87-100 TORUN, POLAND TORUN
*MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 53-55]

Introduction

Chitosan is a natural biopolymer, usually prepared from chitin. Chitosan-based materials possess high biocompatibility and various biological functions such as wound healing, antibacterial activity, biodegradability and non-toxicity. Chitosan is easily processed into gels, membranes, nanofibers, beads, microparticles, nanoparticles, scaffolds and sponges forms [1]. For this reason, chitosan is regarded as one of the most useful natural biomaterials (eg. wound dressings, drug delivery systems, space filling implants) [2, 3]. Physical and chemical properties of chitosan depend strongly on the molecular weight and the degree of deacetylation. Chitosan is sensitive to various types of degradation such as oxidative, hydrolytic, thermo-, photo- and ultrasonic-degradation [4].