

Maciej TRZASKOWSKI, Beata BUTRUK, Tomasz CIACH

e-mail: m.trzaskowski@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Modyfikacje powierzchni polimerów z zastosowaniem fosfolipidów

Wstęp

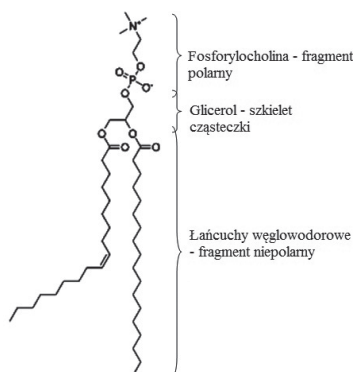
Materiały polimerowe stosowane w konstrukcji sztucznych implantów układu sercowo-naczyniowego oprócz posiadania odpowiednich właściwości mechanicznych muszą spełniać bardzo ściśle wymagania dotyczące biokompatybilności. Szczególnie istotnym parametrem jest odporność na krzepnięcie krwi na powierzchni materiału, gdyż skrzepy powstające w trakcie pracy implantu obniżają jego funkcjonalność i mogą być bardzo niebezpieczne dla zdrowia pacjenta [Brzeska, 2009].

Poliuretany jako grupa polimerów charakteryzujących się świetnymi właściwościami mechanicznymi i akceptowalną biozgodnością są najczęściej badanymi pod względem zastosowania w konstrukcji implantów układu sercowo-naczyniowego polimerami [Resiak i Rokicki, 2000]. Niestety w trakcie długotrwałej pracy w kontakcie z krwią pacjenta mogą powodować powstawanie niebezpiecznych skrzepów [Gorbet, 2004]. Aby poprawić biozgodność poliuretanów niezbędna jest ich odpowiednia modyfikacja.

Modyfikacje poliuretanów opisywane w literaturze często polegają na zmianach właściwości warstw powierzchniowych materiałów, gdyż taki sposób modyfikacji pozwala na zachowanie właściwości mechanicznych materiału bazowego. Modyfikacji takich dokonuje się np. poprzez pokrycie powierzchni poliuretanu innym polimerem w celu zapobiegnięcia zjawiskom adsorpcji białek i agregacji płytek krwi – procesom kluczowym dla powstawania skrzepów krwi na powierzchni materiału [Butruk i in., 2011; Butruk i in., 2012]. Inną drogą modyfikacji powierzchni jest umieszczenie na niej związków biologicznych aktywnie zapobiegających powstawaniu skrzepów takich jak heparyna. Takie materiały posiadają świetne właściwości przeciwwskrzepowe, nie nadają się jednak do długotrwałego stosowania, gdyż biologicznie aktywne warstwy powierzchniowe ulegają stosunkowo szybkiej degradacji [Aksoy i Hasirci, 2008]. W ostatnich latach coraz częstszym obiektem zainteresowania badaczy zajmujących się modyfikacją polimerów do zastosowań biomedycznych stały się fosfolipidy.

Fosfolipidy są głównym składnikiem błon komórkowych wszystkich organizmów żywych, w tym błon komórek śródbłonna stanowiących naturalną powłokę wyściełającą ludzkie naczynia krwionośne, mającą za zadanie między innymi przeciwdziałać samoczynnemu powstawaniu skrzepów [Hyun 2004].

Fosfatydylocholina (Rys. 1) to fosfolipidy, które charakteryzują się obecnością w składzie ich cząsteczek polarnej fosforylochliny oraz dwóch niepolarnych łańcuchów węglowodorowych.



Rys. 1. Budowa przykładowego związku z rodziny fosfatydylocholin

budową błonę komórkową. Te właściwości fosfatydylocholin, a także ich wysoka biozgodność wynikająca z powszechnego występowania w ludzkim organizmie pozwalają założyć, że pokryte nimi materiały będą cechowały się zwiększoną biozgodnością, w tym odpornością na krzepnięcie krwi na ich powierzchni [Marra i in., 1997].

Niniejsza praca dotyczy opracowania prostej metody wykonania powłoki fosfolipidowej na powierzchni poliuretanu wykorzystywanego do budowy sztucznych implantów sercowo-naczyniowych. Taka powłoka ma za zadanie ograniczać występowanie niekorzystnego zjawiska powstawania skrzepów na powierzchni materiałów przeznaczonych do pracy w kontakcie z krwią pacjenta.

Opis badań doświadczalnych

Materiały

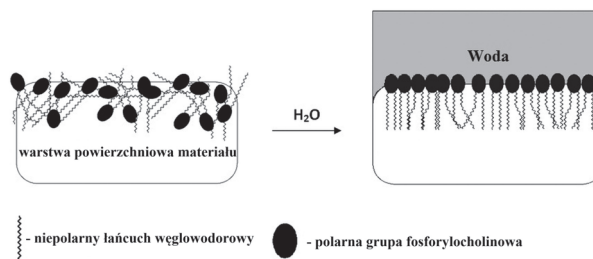
- W badaniach wykorzystano następujące materiały:
- ChronoThane™ firmy CardioTech - poliuretan do zastosowań biomedycznych (poliuretan bazowy);
 - Estane 5715 P – Lubrizol, poliuretan do wykonania pokryć;
 - Fosfatydylocholina z ziaren soi – POCH;
 - Cykloheksanon – Chempur;
 - Dodecylosiarczan sodu – Sigma Aldrich.

Metodyka wykonania pokryć

Pokrycia poliuretanów zostały wykonane przy użyciu techniki *dip-coating*. Próbkę poliuretanu w postaci niewielkich krążków były zanurzane w roztworze cykloheksanonu zawierającym 1% poliuretanu i odpowiedni dodatek (0,5÷2%) fosfatydylochliny. Próbkę były następnie wyjmowane z roztworu i poddawane wstępnemu suszeniu do odparowania rozpuszczalnika z powierzchni materiału. W ten sposób otrzymywano materiał poliuretanowy pokryty na powierzchni warstwą zawierającą poliuretan oraz fosfatydylocholinę.

Próbki były następnie płukane w 0,1% roztworze dodecylosiarczanu sodu w celu wypłukania niezwiązanych cząsteczek z powierzchni próbek. Następnie próbki płukano w roztworze soli fizjologicznej.

Oba etapy płukania miały za zadanie nie tylko oczyszczenie próbek z pozostałości niezwiązanych cząstek i resztek rozpuszczalnika, ale także umożliwienie znajdującym się na powierzchni cząsteczek fosfatydylochliny ustawienie się grupami polarnymi na zewnątrz i osiągnięcie w ten sposób struktury błony komórkowej (Rys. 2).



Rys. 2. Proces orientowania cząsteczek fosfatydylochliny w środowisku wodnym

Próbki były następnie suszone i poddawane badaniom składu chemicznego powierzchni, kąta zwilżania powierzchni i hemokompatybilności.

Metodyka badań wykonanych materiałów

Widma FTIR-ATR wykonano przy użyciu spektrometru Nicolet 6700 z przystawką ATR z kryształem diamentu firmy Thermo Scientific. Do komputerowej obróbki otrzymanych widm użyto oprogramowania OMNIC, wersja 8.0.342, tej samej firmy.

Taka budowa sprawia, że związki te posiadają właściwości amfifilowe, dzięki czemu mają one zdolność do samoistnego formowania micel lub pęcherzyków w środowisku wodnym. Struktury takie przypominają

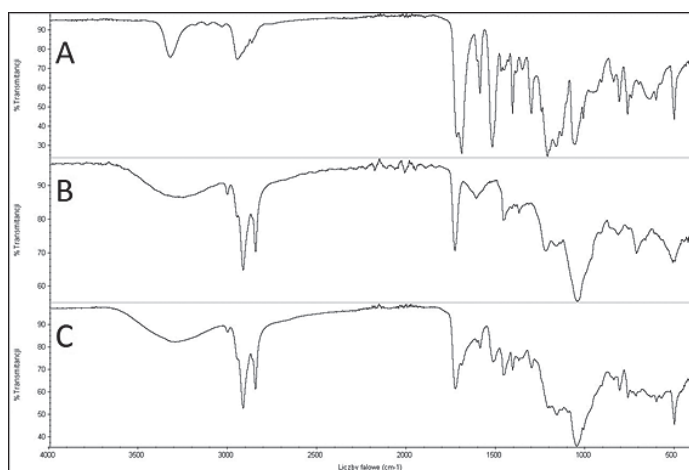
Badanie kąta zwilżania powierzchni zostało przeprowadzone przy użyciu goniometru *Contact Angle System OCA* firmy *Dataphysics*, będącego na wyposażeniu *Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN*.

Analiza hemokompatybilności materiałów została wykonana metodą *Impact-R* z wykorzystaniem analizatora stożkowo-talerzowego *CPA Impact-R* firmy *DiaMed AG*, przez pracowników *Katedry Farmakologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego* w Krakowie.

Wyniki badań i ich ocena

Skład chemiczny powierzchni

W celu wykrycia obecności fosfatydylocholine na powierzchni materiału po procesie modyfikacji wykonano widma powierzchni próbek w podczerwieni przy użyciu techniki *FTIR-ATR* (Rys. 3).

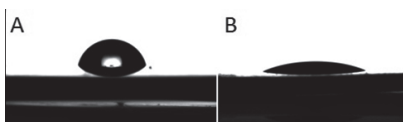


Rys. 3. Porównanie widm FTIR-ATR próbek: A – materiał przed modyfikacją, B – czysta fosfatydylocholina, C – materiał po modyfikacji

Wynik tej analizy potwierdził obecność fosfatydylocholine. Wskazuje na to pojawienie się na widmach próbek po modyfikacji nowych sygnałów (dwa ostre sygnały przy liczbach falowych 2750 oraz 2950 i szeroki sygnał w paśmie 3500÷3000) pochodzących odpowiednio od grup CH_2 wolnych łańcuchów węglowodorowych oraz grupy aminowej fosfatydylocholine.

Kąt zwilżania powierzchni

Analiza zwilżalności miała na celu sprawdzenie obecności polarnych grup funkcyjnych na powierzchni materiału. Wyniki wyraźnie wskazują na zwiększenie hydrofilowości materiału po procesie modyfikacji, a co za tym idzie na obecność polarnych fragmentów cząsteczek fosfatydylocholine na powierzchni (Rys. 4).



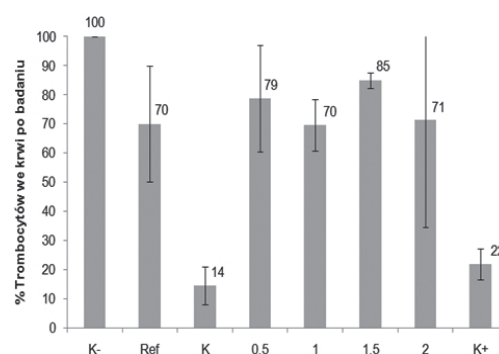
Rys. 4. Zdjęcia kroplel wody na powierzchni: A – poliuretanu przed modyfikacją, B – materiału poddanego modyfikacji

Hemokompatybilność

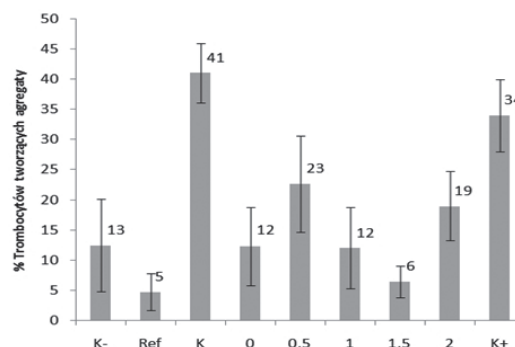
Próbki wykonanych materiałów zostały poddane badaniom określającym wpływ materiału na tworzenie skrzepów krwi. Badano wpływ materiału na aktywację trombocytów polegającą na ich agregacji oraz ilość trombocytów adherujących do powierzchni materiału.

W obu badaniach porównano różne warianty pokryć, zawierające różne stężenia fosfatydylocholine (0÷2%). Wykonane materiały porównano z referencyjnym materiałem przeciwwzakrzepowym (Ref), materiałem niemodyfikowanym (K) oraz kontrolną próbą pozytywną z dodatkiem środka wywołującego krzepnięcie (K+).

Wyniki tych testów (Rys. 5 i 6) pozwalają z dużą pewnością stwierdzić, że wykonane materiały mają o wiele lepsze właściwości antytrombogenne niż materiał niemodyfikowany, a także są porównywalne do wzorcowego materiału przeciwwzakrzepowego.



Rys. 5. Zawartość trombocytów we krwi po badaniu w stosunku do ilości początkowej (K-). Im niższy wynik tym więcej trombocytów uległo adhezji na materiale



Rys. 6. Udział trombocytów zagregowanych w całej populacji trombocytów w próbie. Im więcej zagregowanych trombocytów tym gorsza hemokompatybilność

Wnioski

W wyniku badań związanych z niniejszą pracą udało się za pomocą stosunkowo prostej metody wytworzyć powłoki zawierające fosfatydylocholinę na powierzchni poliuretanu.

Skuteczność modyfikacji potwierdzono przy użyciu techniki *FTIR-ATR*.

Z analizy zwilżalności wynika, że cząsteczki fosfatydylocholine znajdujące się na powierzchni materiałów prawdopodobnie są zorientowane w taki sam sposób jak w błonach komórkowych. Wykonane powłoki można uznać za udaną próbę stworzenia struktury imitującej błonę komórkową.

Badanie hemokompatybilności otrzymanych materiałów wykazało dobre właściwości przeciwwzakrzepowe, dzięki czemu wykonane materiały mogą w przyszłości posłużyć do konstrukcji sztucznych implantów układu sercowo-naczyniowego.

LITERATURA

- Aksoy A., Hasirci V., 2008. Surface modification of polyurethanes with covalent immobilization of heparin. *Macromolecular Symposia*, **269**, nr 1, 145-153. DOI: 10.1002/masy.200850918
- Brzeska J., 2009. Nowe poliuretany do celów medycznych. *Forum Akademickie*, nr 4, 38-40
- Butruk B., Trzaskowski M., Ciach T., 2012. Fabrication of biocompatible hydrogel coatings for implantable medical devices using Fenton-type reaction. *Materials Science and Engineering C*, **32**, nr 6, 1601-1609. DOI: 10.1016/j.msec.2012.04.050
- Butruk B., Zietek P., Ciach T., 2011. Simple method of fabrication of hydrophobic coatings for polyurethanes. *Central European Journal of Chemistry* **9**, nr 8, 1039-1045. DOI: 10.2478/s11532-011-0094-7
- Gorbet M., 2004. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, **25**, 5681-5703. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.023
- Hyun K., 2004. Preparation of a chemically anchored phospholipid monolayer on an acrylated polymer substrate. *Biomaterials*, **26**, 3435-3444. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.066
- Marra K.G., Winger T.M., Hanson S.R., Chaikof E.L., 1997. Cytomimetic biomaterials. 1. In-situ polymerization of phospholipids on an alkylated surface. *Macromolecules*, **30**, 6483-6488. DOI: 10.1021/ma970481f
- Resiak I., Rokicki G. 2000. Modified polyurethanes for biomedical applications. *Polimery*, **45**, nr 9, 592-602