

**RUSZTOWANIA (SCAFFOLDS) STOSOWANE  
W MEDYCYNIE REGENARACYJNEJ**  
SCAFFOLDS FOR REGENERATIVE MEDICINE

**Agata Chaberska, Piotr Rosiak, Zbigniew J. Kamiński,  
Beata Kolesińska\***

*Instytut Chemii Organicznej, Politechniki Łódzkiej  
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź  
\*e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Standardowe biomateriały stosowane w regeneracji tkanek
  - 1.1. Naturalne materiały
  - 1.2. Materiały syntetyczne
  - 1.3. Materiały hybrydowe
2. Nowoczesne podejścia do tworzenia rusztowań (scaffolds) stosowanych w medycynie regeneracyjnej
3. Peptydy ulegające samo-agregacji/organizacji jako nośniki komórek
  - 3.1. Rodzaje procesów prowadzących do samo-organizacji peptydów
  - 3.2. Czynniki wpływające na proces samo-organizacji peptydów
  - 3.3. Wykorzystanie peptydów ulegających samo-organizacji w inżynierii tkankowej

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Agata Chaberska** jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. W 2016 roku rozpoczęła Studia Doktoranckie na tym samym wydziale. W pracy badawczej zajmuje się syntezą oraz wykorzystaniem materiałów peptydowych otrzymywanych w wyniku procesu samoorganizacji przeznaczonych do regeneracji tkanek.

**Inż. Piotr Rosiak** jest studentem Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. Pracę inżynierską wykonał pod opieką dr hab. Beaty Kolesińskiej i dotyczyła ona wykorzystania aromatycznych peptydów jako materiałów użytecznych w medycynie regeneracyjnej.

**Prof. dr hab. inż. Zbigniew J. Kamiński** jest profesorem zwyczajnym Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. Badania w dziedzinie nowych metod syntezy organicznej, poszukiwania nowych odczynników kondensujących, odczynników stereoróżnicujących i chemii peptydów.

**dr hab. inż. Beata Kolesińska**, prof. PŁ jest pracownikiem Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy peptydów o zróżnicowanej aktywności biologicznej i ich szerokim wykorzystaniu, poczynając od leków o budowie peptydowej, materiałów peptydowych tworzonych w procesie samoorganizacji peptydów, badań nad agregacją peptydów/białek i poszukiwaniu inhibitorów tego procesu, a skończywszy na oddziaływaniach peptydów z białkami (przeciwciałami). Autor 74 prac naukowych oraz 28 patentów i zgłoszeń patentowych.

### ABSTRACT

The presence of three dimensional support is indispensable condition for successful regeneration of the tissue. In the absence of natural scaffold, or absence of its artificial substitute, regeneration is not possible.

The advantage of natural building blocks to create new scaffolds results from the requirements of the materials structures used for tissue regeneration: biocompatibility, biodegradability, lack of cytotoxicity and desirable mechanical properties. Application of these building blocks for the preparation of three dimensional materials should ensure completely biocompatibility of the temporary extracellular matrix equivalent, thus offering construct resembling a natural milieu for the cells and finally regeneration of tissues. These include framework with elements stimulating adhesion of *in vitro* grown cells, growth factors, hormones and vitamins offered as a completed ingredients in the commercially available culture media. 3D frameworks applied for cell growing should facilitate formation of required tissue shape and size as well as appropriate functioning of the cells. The key factor for the successful regeneration of tissues is the function of the scaffold determining the environment for growing cells, directing proliferation and regulating differentiation processes. The basic feature of the cellular scaffold, determining its functioning is porosity. Pore diameter and their abundance consists a critical factor for penetration of cells into the interior of the implant and finally for successful regeneration of damaged tissue. The progress of tissue regeneration *in vitro* depends on the presence of cytokines and growth factors, which are controlling cell differentiation process. Nowadays neither of implant material offered on the market has a property comparable to the natural tissue. However, there are many reports presenting preliminary experiments conducted towards attaining novel supports for regenerative medicine derived from peptides and formed by their self-organization. The most advanced of them are known under trade name PuraMatrix, which recently were applied for the regeneration of soft tissues. However, due to tendency of this materials for hydrogels formation, characteristic for them are disadvantageous mechanical properties. The alternative approach based on application of native ECM proteins was also taken into consideration. The weak points of this materials are the susceptibility of proteins towards proteolytic enzymes and theirs immunogenic properties. The diversity of peptide modules give the opportunity to design and synthesize a variety of biomaterials that mimic the structural complexity of the natural ECM.

**Keywords:** regenerative medicine, self-assembled peptides, biomimetic scaffolds, extracellular matrix (ECM), functional components of ECM

**Słowa kluczowe:** medycyna regeneracyjna, samo-organizacja peptydów, biomimetyczne rusztowania, macierz pozakomórkowa (ECM), składniki funkcjonalne ECM

---

---

## WPROWADZENIE

Inżynieria tkankowa będącą jednym z działów medycyny regeneracyjnej jest definiowana jako „wykorzystanie narzędzi właściwych biologii, chemii i inżynierii materiałowej do naprawy, renowacji i regeneracji tkanek, poprzez wykorzystanie do tego biomateriałów, komórek i czynników wzrostu” [1–3]. Celem inżynierii tkankowej jest zaprojektowanie oraz wytworzenie biomimetyków środowiska komórek, które stanowią trójwymiarową matrycę do osadzania komórek i są zdolne wpływać na komórki w taki sposób, aby były one w stanie funkcjonować tak jak w naturalnym dla nich środowisku [4]. Tym samym materiały stosowane jako rusztowania dla komórek (*scaffolds*) muszą zapewniać odpowiednie mikrootoczenie komórkom i gwarantować wzrost tkanek [5, 6]. Dodatkowo biomateriały te muszą zapewniać adhezję komórkom, ich proliferację, różnicowanie i w końcu odtwarzanie tkanki. Biorąc pod uwagę wszystkie wymagania stawiane biomateriałom stosowanym w inżynierii tkankowej, kluczowy jest skład chemiczny rusztowania, jego właściwości fizyczne oraz aktywność biologiczna, bowiem dopiero połączenie tych wszystkich cech gwarantuje powodzenie procesu regeneracji tkanek [7, 8].

## 1. STANDARDOWE BIOMATERIAŁY STOSOWANE W REGENERACJI TKANEK

### 1.1. NATURALNE MATERIAŁY

Naturalnie występujące białka takie jak: kolagen, fibronektyna, żelatyna oraz polisacharydy takie jak chityna, chitozan są od dawna szeroko stosowane jako rusztowania w regeneracji różnorodnych tkanek [9]. Z uwagi na ich pochodzenie, posiadają one właściwości podobne do natywnych tkanek co warunkuje adhezję komórek [10]. Kolagen jest stosowany w inżynierii tkankowej, głównie w regeneracji tkanki nerwowej, chrząstki, naczyń krwionośnych, zastawek serca, więzadeł i ścięgien [11]. Zasadniczą wadą kolagenu jest jego zwierzęce pochodzenie (materiał ksenogeniczny) lub pochodzenie allogeniczne, co powoduje aktywację układu immunologicznego i odrzucanie materiału zastosowanego do regeneracji. Ponadto kolagen pochodzenia ksenogenicznego może nie być dostatecznie czysty, zwłaszcza pod względem mikrobiologicznym, co niesie ryzyko nieznanego wpływu zanieczyszczeń na proces regeneracji [12, 13].

### 1.2. MATERIAŁY SYNTETYCZNE

Biodegradowalne polimery takie jak kwas poli-mlekowy (PLLA) [14], kwas poli-glikolowy (PGA) [15], poli- $\epsilon$ -kaprotolakton (PCL) [16], ich kopolimery: poli-

(laktydo-*ko*-glycolid) (PLGA) [17], poli(laktydo-*ko*-kaprolakton (PLCL) [18] i ich mieszaniny są stosowane jako materiały do wytwarzania rusztowań użytecznych w regeneracji różnych typów tkanek [19–22]. Materiały te są biokompatybilne i charakteryzują się szerokim zakresem biodegradowalności zależnym od ciężaru cząsteczkowego polimeru, struktury krystalicznej oraz składu mieszanych polimerów. Co istotne, szybkość degradacji, właściwości mechaniczne i właściwości fizyczne mogą być modulowane i przystosowywane do zamierzonego celu [23]. Większość dopuszczonych do stosowania przez FDA poliestrowych biopolimerów stosowanych w medycynie regeneracyjnej charakteryzuje się jednak obniżoną adhezją do osadzanych na nich komórek, co wynika z ich hydrofobowego charakteru [24]. W celu wyeliminowania tej wady prowadzone są badania nad modyfikacją syntetycznych materiałów polimerowych poprzez wprowadzanie związków poprawiających ich aktywność biologiczną [25–32]. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że materiały poliestrowe ulegają degradacji a powstające produkty kwasowe mogą powodować znaczne lokalne obniżanie pH tkanek [33, 34].

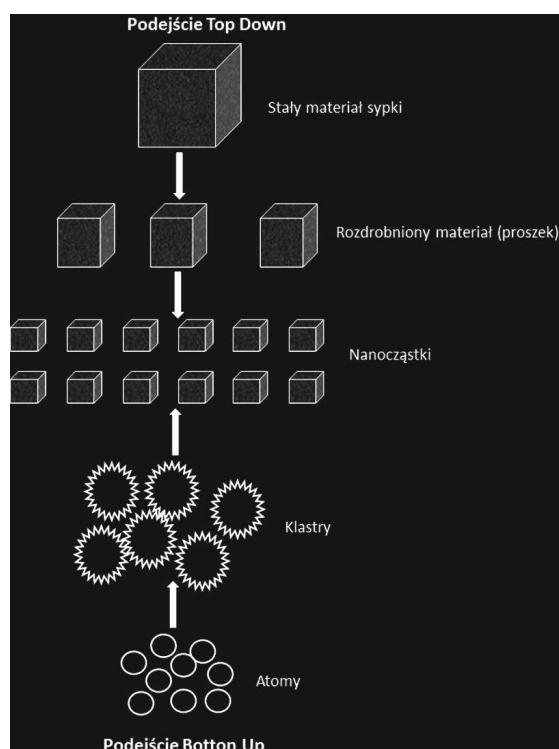
### 1.3. MATERIAŁY HYBRYDOWE

Rusztowania hybrydowe łączą w sobie zalety zarówno materiałów syntetycznych jak i naturalnych, co pozwala na osiągnięcie właściwości lepszych do pojedynczych składowych. W literaturze opisane zostały przykłady materiałów, które otrzymano w wyniku modyfikacji syntetycznych polimerów za pomocą biocząsteczek, co pozwoliło na otrzymanie układów biomimetycznych, naśladujących funkcję natywnej macierzy pozakomórkowej pod względem topografii oraz funkcji. Almany i współpracownicy opisali syntezę i zastosowanie hydrożeli otrzymanych z glikolu polietylenowego oraz fibrynogenu, co pozwoliło na wytworzenie materiału o ściśle zdefiniowanych właściwościach mechanicznych z zachowaną biofunkcjonalnością niezbędną do regeneracji tkanek [35–37].

## 2. NOWOCZESNE PODEJŚCIA DO TWORZENIA RUSZTOWAŃ (SCAFFOLDS) STOSOWANYCH W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ

Rusztowania wytwarzane z nanowłókien posiadają ogromny potencjał użytkowy z punktu widzenia inżynierii tkankowej, gdyż naśladują architekturę natywnej macierzy pozakomórkowej (ECM). Charakteryzują się one wysokim stosunkiem pola powierzchni do objętości oraz mikroporowatą strukturą, co ułatwia przyleganie, proliferację, infiltrację, migrację i różnicowanie komórek [38]. Włókna o nano-wymiarach wykazują znaczne podobieństwo do złożonej sieci włókienek kolagenu o średnicach zawartych w przedziale 50-500 nm, które występują w ECM. Dodatkowo właściwości struktur uzyskanych z nanowłókien takie jak elastyczność, czy też porowatość mogą być dostosowywane do wymagań regenerowanej tkanki

[39, 40]. To co istotne, to udowodniony fakt, że komórki dobrze przywierają i we właściwy sposób ulegają organizacji w przypadku rusztowań złożonych z włókien, których średnica jest mniejsza niż średnica komórek [41]. Nanowłókna mogą być otrzymywane na drodze elektroprzędzenia (ang. *electrospinning*), rozdzielania faz (ang. *phase separation*) oraz samo-organizacji (ang. *self-assembly*) [42, 43]. Te trzy techniki zostały również skalsyfikowane z punktu widzenia procesowego jako *top-down* i *bottom-up* (Rys. 1).

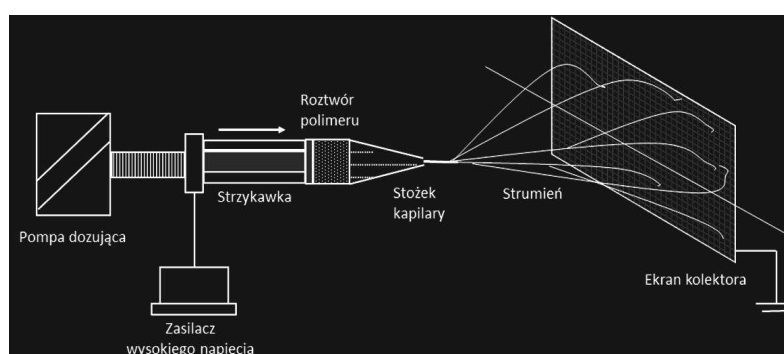


Rysunek 1. Podejście *top-down* oraz *bottom up* do wytwarzania nanocząstek  
Figure 1. Top-down and the bottom-up approach for manufacturing of nanoparticles

### PODEJŚCIE TOP-DOWN

Podejście „top-down” to tradycyjny sposób zmniejszania rozmiarów materiału (miniaturyzacja większych struktur). Procesy *top-down* obejmują w większości przypadków metody przetwarzające ciała stałe: mielenie – materiał jest rozdrobniony pomiędzy dwoma żarnami w warunkach beztlenowych (co zapobiega utlenianiu materiału rozdrabnianego), nanolitografię podobną do stosowanej do wytwarzania układów scalonych lub elementów optoelektronicznych), technikę wykorzystującą zogniskowaną wiązkę jonów (ang. *Focused Ion Beam*, FIB), trawienie chemiczne

oraz elektroprzędzenie [44, 45]. Wśród wymienionych metod, nanolitografia oraz chemiczne trawienie są metodami najmniej użytecznymi do wytwarzania nanowłókien. Elektroprzędzenie jest obecnie jedną z najważniejszych metod wytwarzania nanowłókien wykorzystywanych do otrzymywania rusztowań dla medycyny regeneracyjnej. Elektroprzędzenie polega na zastosowaniu wysokiego napięcia do przewyciężenia napięcia powierzchniowego kropli polimeru tworzonej na końcu kapilary. Zastosowanie kapilary pozwala na rozciąganie roztworu do postaci włókien, które zbierane są w statycznym lub dynamicznym kolektorze umiejscowionym w określonej odległości od kapilary.



Rysunek 2. Elektroprzędzenie nanowłókien  
Figure 2. Electrospinning as a method of nanofiber production

Uniwersalność tej techniki wynika z możliwości zmian parametrów procesu oraz składu i stężenia roztworów polimeru, co prowadzi do tworzenia nanowłókien o wymaganych wymiarach i orientacji. Elektroprzędzenie jest stosunkowo prostą i niezawodną techniką pozwalającą na uzyskiwanie włókien o odpowiedniej porowatości oraz pożądanych parametrach mechanicznych [46]. Metoda ta pozwala na uzyskiwanie rusztowań o założonych parametrach dwu- i trójwymiarowych (2-D i 3-D) [47]. Technika ta jest stosowana do wytwarzania rusztowań wykorzystanych w regeneracji różnorodnych tkanek. Otrzymano tą metodą jednokierunkowo zorientowane nanowłókna PLGA, które okazały się być efektywniejszym podłożem do osadzania i proliferacji komórek Schwanna w porównaniu do materiałów utworzonych z losowo rozmieszczonych włókien PLGA. Podobne obserwacje stwierdzono dla rusztowań wytworzonych z porowatych włókien z PLGA, które zastosowano w badaniach z użyciem fibroblastów NIH3T3 [48]. Wadą elektroprzędzenia jest otrzymywanie włókien o zróżnicowanym wymiarze (średnica włókna może osiągać nawet wartość mikrometrów) ponadto zmiana rozpuszczalnika wykorzystanego do przygotowania roztworu polimeru może powodować zróżnicowanie porowatości materiału.

Inną techniką szeroko stosowaną w podejściu top-down” jest proces rozdzielania faz (ang. *phase separation*) polegający na tworzeniu nanowłóknistych form z polimeru poddanego indukcji termicznej. Proces obejmuje rozpuszczanie polimeru,

rozdzielanie faz ciecz-ciecz, żelowanie polimeru, ekstrakcję odpowiednim rozpuszczalnikiem, a następnie zamrożenie i liofilizację. Rozdzielenie faz jest stosunkowo prostą techniką pozwalającą na otrzymywanie makroporowatych struktur, które zapewniają zagnieżdżanie się komórek. Główną zaletą tej metody jest możliwość modulowania zarówno kształtu i rozmiarów porów poprzez wykorzystanie porogonów. Porowate, nanowłókniste materiały uzyskane z PLLA wykorzystano do zagnieżdżania i proliferacji neuronalnych komórek macierzystych (NSC). Stwierdzono, że zastosowane materiały sprzyjały różnicowaniu NSC, co wskazuje na możliwość ich wykorzystania do regeneracji tkanki nerwowej [49]. W porównaniu do elektroprzędzenia, rozdzielenie faz charakteryzuje się niską wydajnością i nie może być zastosowane do wytwarzania długich włókien ciągłych, ponadto metoda ta może być zastosowana jedynie do wybranych polimerów. Natomiast metody wykorzystujące litografię oraz ogniskowane wiązki elektronów (jonów) mogą prowadzić do strukturalnych deformacji materiałów wytwarzanych z biomateriałów (polisacharydy, białka).

#### PODEJŚCIE BOTTOM-UP

Choć podejście odgórne (*top-down*) jest powszechnie stosowane do otrzymywania rusztowań, charakteryzuje się ono ograniczeniami wynikającymi z niedostatecznej kontroli nad procesem zachodzącym w nanoskali. Ponadto, do wytworzenia złożonych 3-D struktur, żadna z wymienionych metod nie zapewnia możliwości uzyskania materiału o wymiarach nanometrycznych. W podejściu oddolnym (*bottom-up*), pojedyncze bloki budulcowe (atomy, cząsteczki) oddziałują pomiędzy sobą w uporządkowany sposób tworząc nowe supramolekularne struktury. Proces samo-organizacji (samo-agregacji) jest spontanicznym, oddolnym podejściem pospolicie występującym w naturze. Aminokwasy, peptydy, nukleotydy, lipidy, cukry na drodze samo-organizacji tworzą funkcjonalne, złożone struktury [50].

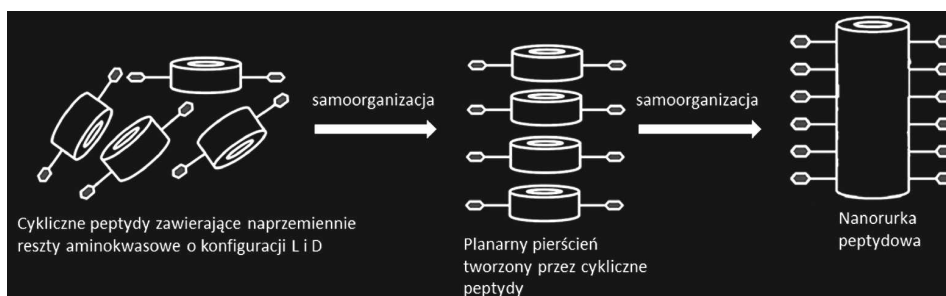
### 3. PEPTYDY ULEGĄJACE SAMO-AGREGACJI/ORGANIZACJI JAKO NOŚNIKI KOMÓREK

Wykorzystanie procesów samo-organizacji jest obecnie jednym z najintensywniej rozwijanych kierunków badań nakierowanych na wytwarzanie rusztowań użytecznych w inżynierii tkankowej. Dzieje się tak, gdyż produkty samo-organizacji naśladują naturalny ECM zarówno pod względem strukturalnym (tworzone są z naturalnych bloków budulcowych) jak i funkcjonalnym (produktami są złożone struktury identyczne z naturalnymi) [51–58]. Proces samo-organizacji jest spontanicznym procesem porządkowania nieorganizowanych cząsteczek w złożone i uporządkowane struktury poprzez wykorzystanie specyficznych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami. Proces ten zachodzi bez jakichkolwiek metod stymulacji



czy kierunkowania [59]. Panuje przekonanie, że samo-organizacja posiada ogromny potencjał do racjonalnego projektowania nanostruktur. Tworzenia założeń (ang. *tailored*) struktur wymaga poznania właściwości bloków budulcowych ulegających samo-organizacji, mechanizmu samo-organizacji czy w końcu kinetyki i dynamiki tego procesu. Oddziaływaniami, które grają kluczową rolę w procesie samo-organizacji są słabe niekowalencyjne oddziaływania takie jak: wiązania jonowe, elektrostatyczne, hydrofobowe oraz van der Waalsa.

Chociaż energia każdego z pojedynczych oddziaływań jest zbyt niska aby tworzyć trwale złożone struktury, to jednak ich współdziałanie w procesie samo-organizacji powoduje, że finalnie tworzone supra-cząsteczki są stabilne. Aminokwasowe bloki budulcowe (peptydy) w procesie samoorganizacji tworzą finalnie uporządkowane struktury drugo- i trzeciorzędowe. Struktury takie jak alfa helisy czy też  $\beta$ -kartki tworzone są z udziałem sieci wiązań wodorowych pomiędzy resztami aminokwasowymi w łańcuchu peptydowym [60]. Jednym z pierwszych przykładów tworzenia nanostruktur na drodze samo-organizacji peptydów były nanorurki peptydowe tworzone przez cykliczne peptydy złożone z naprzemiennie ułożonych D- i L-aminokwasów. Oddziaływanie płaskich pierścieni cyklopeptydów *via* oddziaływanie pierścieni (ang. *stacking*) prowadziło do tworzenia nanorurek [61] (Rys. 3).

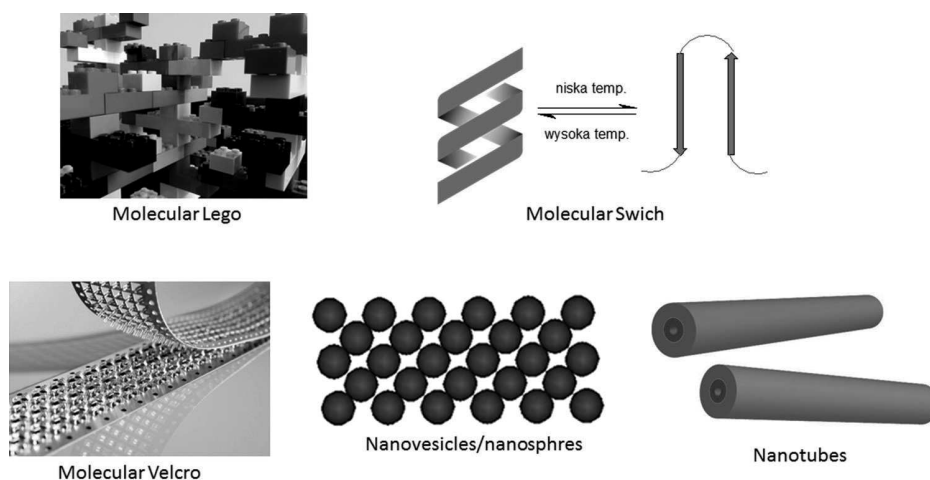


Rysunek 3. Tworzenia nanorurek peptydowych z cyklicznych oktapeptydów cyklo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)<sub>2</sub>-] *via* antyrównoległe układanie pierścieni w stos (ang. *antiparallel stacking*)

Figure 3. Formation of nanotubes by cyclic octapeptide cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)<sub>2</sub>-] *via* antiparallel stacking of rings

### 3.1. RODZAJE PROCESÓW PROWADZĄCYCH DO SAMO-ORGANIZACJI PEPTYDÓW

Procesy samo-organizacji peptydów podzielone zostały na kilka kategorii w zależności od struktury peptydów. Grupy te obejmują takie kategorie jak: molekularne Lego (ang. *molecular Lego*), molekularne cargo (ang. *molecular cargo*), molekularne zaczepy (haki) (ang. *molecular hooks*), molekularne rzepy/powierzchnie (ang. *Velcro/molecular carpets*) (Rys. 4).



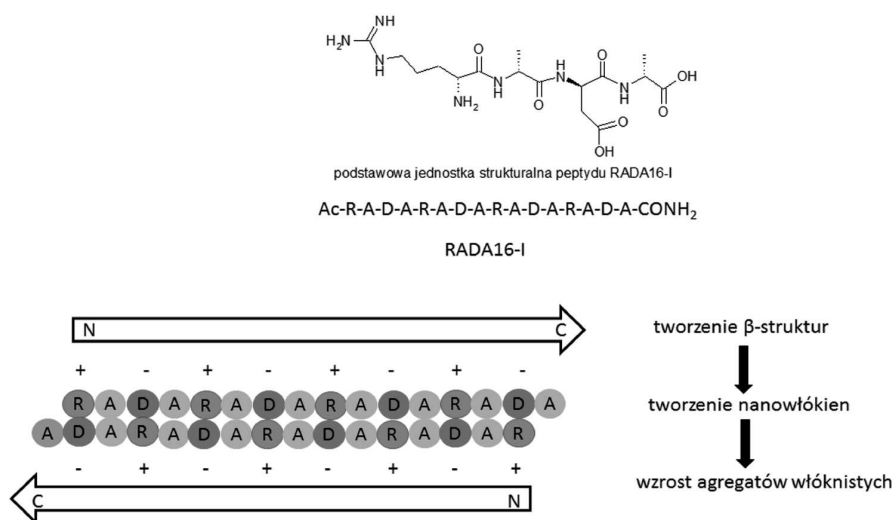
Rysunek 4. Procesy samo-organizacji peptydów prowadzące do zróżnicowanych form finalnych struktur  
 Figure 4. The processes of self-organization of peptides leading to various forms of final structures

Peptydy należące do grupy molekularnego lego tworzą wysoce uporządkowane nanowłókna przekształcające się w hydrożelowe rusztowania użyteczne w regeneracji tkanek. Peptydy z grupy molekularnego cargo tworzą nanorurki peptydowe zdolne do przenoszenia leków, białek, czy genów [62], natomiast molekularne zaczepy, czy też molekularne rzepy (Velcro model) wykorzystywane są jako uporządkowane i odpowiednio zorganizowane powierzchnie użyteczne z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej [63]. Istnieje jeszcze odrębna grupa tzw. molekularnych włączników, które mogą zmieniać konformację w odpowiedzi na sygnał elektryczny i działać jako siłowniki molekularne [64]. Z pośród wymienionych kategorii, dwie pierwsze klasy są najczęściej wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej. Przedstawiona klasyfikacja jest umowna, co powoduje, że identyczne sekwencje peptydowe mogą być przypisane do różnych klas i mieć różne zastosowanie. Peptydy mogą być pochodzenia naturalnego jak również być otrzymywane na drodze syntezy. Również peptydy otrzymywane na drodze technik rekombinacyjnych z wykorzystaniem bakterii i drożdży ostatnimi czasy są coraz częściej stosowane w badaniach, z uwagi na relatywnie niski koszt ich wytwarzania jak i możliwość prowadzenia syntez w dużej skali. Pierwszym syntetycznym peptydem, który znalazł zastosowanie w licznych próbach w obszarze inżynierii tkankowej był peptyd EAK16 – II, tworzący w wyniku samo-organizacji rusztowania o strukturze nanowłókien. Jest to 16 aminokwasowy peptyd, który jest fragmentem białka Zuotin. Białko Zuotin jest 433-aminokwasowym białkiem drożdży zawierającym 34-aminokwasową domenę złożoną z reszt alaniny, lizyny oraz kwasu glutaminowego o sekwencji: AGARA-EAEAKAKAEAEAKAKAESEAKANASAKAD [65]. Z punktu widzenia kategoryzacji peptydów ulegających samo-organizacji jest to peptyd z grupy molekularnego Lego typ I, który w wyniku samoorganizacji tworzy struktury  $\beta$ -krotek tworzące

finalnie hydrożele peptydowe. Peptydy z grupy molekularnego Lego określane są również jako jonowe peptydy ulegające samo-organizacji z uwagi na obecność w ich strukturach zarówno kationowych jak i anionowych aminokwasów.

### JONOWE PEPTYDY ULEGAJĄCE SAMO-ORGANIZACJI

Jedną z najlepiej poznanych grup peptydowych biomateriałów stosowanych w medycynie regeneracyjnej są ulegające samo-organizacji amfifilowe peptydy [66] złożone z powtarzających się jednostek dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych (lizyna, arginina) i ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy), które odseparowane są resztami hydrofobowych pozbawionych ładunków aminokwasów (alanina, leucyna). Najlepiej scharakteryzowanymi peptydami tej klasy są peptydy: RADA16-I o strukturze Ac-RADARADA-RADARADANH<sub>2</sub> oraz RADA16-II (AcRARADADARARADADA-NH<sub>2</sub>). Peptydy te tworzą stabilne struktury β-kartek w roztworach wodnych. Charakteryzują się obecnością powierzchni hydrofobowej oraz hydrofilowej i tworzą w wyniku organizacji uporządkowane struktury supramolekularne. Utworzone struktury supramolekularne są stabilne w szerokim zakresie temperatury, pH oraz działania czynników denaturujących.



Rysunek 5. Struktura podstawowej jednostki strukturalnej peptydu RADA16-I i jego samo-organizacja  
Figure 5. Structure of basic fragment of RADA16-I and its self-organization

Jonowe peptydy ulegające samo-organizacji można podzielić na kilka podtypów w zależności od sposobu ułożenia dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych oraz ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych tworzących hydrofilową powierzchnię peptydu.

Tabela 1. Podział jonowych peptydów ulegających samo-organizacji na podtypy  
 Table 1. Subtypes of ionic peptides undergoing self-organization (self-assembling)

Podtyp I	- + - + - + - +
Podtyp II	- - + + - - + +
Podtyp III	- - - + + +
Podtyp IV	- - - - + + + +

Peptydy RADA16-I oraz RADA16-II (RARADADARARADADA) są pierwszymi ulegającymi samo-organizacji peptydami, które są handlowo dostępne pod nazwą PuraMatrix™. PuraMatrix™ wykorzystany został do regeneracji tkanki nerwowej [67], tkanki kostnej [68], oraz ścięgien [69]. Pomimo faktu, że dokładny mechanizm adhezji oraz proliferacji komórek osadzonych na tym materiale nie jest znany to jednak wykazano, że zagnieżdżone komórki wiążą się z motywem RAD na innej drodze niż klasyczna adhezja z wykorzystaniem integryn zawierających motyw RGD.

#### PEPTYDY AROMATYCZNE TWORZĄCE W WYNIKU SAMO-ORGANIZACJI STRUKTURY $\beta$ -KARTEK

Zarówno peptydy (naturalne i syntetyczne) jak i białka zawierające fragmenty tworzące struktury  $\beta$ -kartek charakteryzują się podatnością do samoorganizacji i tworzenia włóknistych nanostruktur [70]. Powstawanie włóknistych nanostruktur łączy się z wytwarzaniem depozytów amyloidowych powstających w wyniku niewłaściwego fałdowania białek. Złogi amyloidowe są charakterystyczne dla chorób określanych jako amyloidozy lub choroby konformacyjne. Przykładami takich chorób są choroba Alzheimera, Parkinsona, cukrzyca i inne. *In vivo* obecność depozytów  $\beta$ -amyloidu utworzonych z włókien peptydowych o strukturze  $\beta$ -kartki stwierdzono w przypadku wielu organów, poczynając od mózgu [71], przez trzustkę, nerki i inne. Dipeptyd złożony z dwóch reszt fenyloalaniny (FF) został zidentyfikowany w strukturach  $\beta$ -amyloidu. Wykazano, że stanowi on motyw rozpoznawczy tworzący, na skutek oddziaływań z pierścieniami aromatycznymi, agregaty peptydowe [72] charakteryzujące się zwiększoną zawartością  $\beta$  struktur.  $\beta$ -Struktury ulegają nakładaniu bocznemu lub osiowemu tworząc finalnie struktury włókniste. W nakładaniu osiowe zaangażowane są oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ , zaś w nakładaniu bocznym biorą udział głównie oddziaływania elektrostatyczne oraz wodorowe.

Natura utworzonych na drodze samo-organizacji struktur zależy głównie od składu aminokwasowego peptydu. Krótkie peptydy stanowią więc bloki budulcowe w procesie samoorganizacji typu *bottom-up* i są wykorzystywane do tworzenia nowych materiałów w kontrolowanych warunkach fizycznych i chemicznych (pH, temperatura, substraty i inne). Umożliwiło to uzyskanie różnorodnych struktur: nanorurek, nanowłókien, nanopęcherzyków i innych, przy czym morfologia materiału zależała od struktury peptydu oraz warunków samo-organizacji [73].

### 3.2. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA PROCES SAMO-ORGANIZACJI PEPTYDÓW

Wiele peptydów w roztworach wodnych o pH zawartym w szerokim przedziale ulega spontanicznej agregacji tworząc uporządkowane struktury makroskopowe. Zazwyczaj tworzone są hydrożele, w których zawartość wody wynosi więcej niż 99%. Dzieje się tak z uwagi na charakter jonów obojnaczych struktur ulegających agregacji. Fakt ten sprawia, że układy takie są zdolne mimikować [74] natywną tkankę nerwową [75], skórę, tkankę mięśnia sercowego [76] czy naczynia krwionośne [77]. W oparciu o badania SEM oraz AFM wykazano, że struktury powstające na drodze samo-organizacji tworzą sieć nanowłókien o średnicy 10–20 nm oraz średnicy porów 10–200 nm. Proces tworzenia uporządkowanych struktur przez amfifilowe peptydy zależy od warunków zewnętrznych: pH, temperatura, stężenie soli i innych.

Przykładowo peptydy RADA16 i EAK16 przy niskim stężeniu soli nie są podatne na tworzenie hydrożeli, jednak już w warunkach fizjologicznych ulegają samo-organizacji tworząc hydrożelowe agregaty [78]. Przykładem obrazującym wpływ pH na proces samo-organizacji jest peptyd P11-4 (QQRFEWEFEQQ) dla którego punkt izoelektryczny wynosi 4,2. Obecność reszt kwasu glutaminowego i argininy w cząstce sprawia, że jest on wrażliwy na zmiany pH. Przy niskim pH występuje jako stabilny zdyspergowany układ zawierający struktury włókniste, w których grupy guanidynowe obdarzone są ładunkiem dodatnim, jednak przy wyższym pH, grupy funkcyjne kwasu glutaminowego przyjmują ładunek ujemny co może być przyczyną oddziaływań odpychających prowadzących do dysocjacji fibryli do monomerów [79]. Również stężenie peptydu może wpływać na proces samo-organizacji. Przy niskim stężeniu (<10 mg/ mL) peptyd P11-4 tworzy hydrożele przy pH poniżej wartości punktu izoelektrycznego. Wy tłumaczeniem tego jest antyrównoległe ułożenie łańcuchów tworzących strukturę  $\beta$ -kartek co prowadzi do tworzenia włókien. Powyżej krytycznego stężenia (>10 mg/mL), peptyd ten tworzy hydrożele przy pH 7,4. Postuluje się, że za wynik samo-organizacji odpowiedzialne jest tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami peptydów. Wykazano, że zmiany w strukturze reszt hydrofobowych aminokwasów w łańcuchu peptydowym, czy też ilości tych reszt wpływają na szybkość tworzenia struktur włóknistych oraz mechaniczną wytrzymałość włókien. Zmiany w obrębie reszt hydrofilowych nie wpływają na szybkość procesu samo-organizacji, jednak mają wpływ na morfologię tworzonych struktur. Zależność ta dotyczy zmian strukturalnych w aminokwasach przy zachowaniu ich sumarycznego ładunku oraz jego lokalizacji w peptydzie. Warto tu podkreślić, że odwrotne rozmieszczenie ujemnie oraz dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych poprzez ich zamianę odpowiednio na dodatnio lub ujemnie naładowane reszty skutkuje brakiem podatności na samo-organizację.

### 3.3. WYKORZYSTANIE PEPTYDÓW ULEGAJĄCYCH SAMO-ORGANIZACJI W INŻYNIERII TKANKOWEJ

Peptydy RADA16-I i RADA16-II wykorzystane zostały w regeneracji tkanki nerwowej [80]. W badaniach z użyciem komórek PC 12 (*rat pheochromocytoma 1*) stwierdzono, że rusztowanie zbudowane z peptydu RADA16-I sprzyja proliferacji i różnicowaniu neuronalnych komórek macierzystych (ang. *neural stem cells*, NSCs) wspomagając rozrost neurytów. RADA16-I wykorzystany został również w badaniach nad regeneracją mózgu i wspomagał regenerację nerwu wzrokowego (badania na chomikach). Peptyd ten wykorzystano również w rekonstrukcji uszkodzeń mózgu (badania na szczurach) [81]. Oprócz prac badawczych wykorzystujących peptyd RADA16-I w regeneracji tkanki nerwowej, wykazano, że rusztowanie z tego peptydu poprawia proliferację hepatocytów szczurzych oraz co istotne, hepatocyty namnożone na tym rusztowaniu peptydowym podejmowały właściwe funkcje komórek wątroby po ich przeszczepie do uszkodzonego organu [82].

Peptydy RAD (Tab. 2) wykorzystane zostały jako rusztowania dla komórek trzustki. Stwierdzono, że komórki nie tylko proliferowały, ale zachowywały również swoje funkcje. Autorzy twierdzą, że wyniki te wskazują na możliwość zastosowania peptydów ulegających samo-organizacji jako obiecujących układów, które mogą znaleźć zastosowanie w przeszczepach trzustki [83].

Hydrożele tworzone w wyniku samo-organizacji peptydu KLD-12 (Tab. 2) zostały wykorzystane jako rusztowania do utworzenia materiału mimikującego macierz pozakomórkową chrząstki. Wykorzystanie tego rusztowania pozwoliło na stworzenie 3-D kolonii komórek umożliwiających regenerację tkanki chrzęstnej. Peptyd KLD-12 wykorzystano w regeneracji krążków międzykręgowych (badania na królikach) używając do tego celu mezyncheralnych komórek macierzystych (MSCs).

W innych badaniach, dodekapeptyd (KLDL)<sub>3</sub> zastosowano w badaniach *in vivo* regeneracji chrząstki stosując chondrocyty i komórki macierzyste szpiku kostnego (ang. *bone marrow stem cells*, BMSCs) [84].

Peptyd d-EAK16 złożony z aminokwasów o konfiguracji D pozwolił na regenerację uszkodzenia wątroby [85].

Rusztowania złożone z nanowłókien peptydu IKVAV wykorzystano w badaniach z użyciem komórek PC12. Obserwowano znaczący wzrost adherencji komórek. Ten sam peptyd wykorzystano w badaniach nad angiogenezą (regeneracja naczyń krwionośnych).

Tabela 2. Wybrane przykłady wykorzystania rusztowań (*scaffolds*) tworzonych przez samo-organizujące się peptydy

Table 2. Selected examples of scaffolds formed by the self-assembling peptides

Peptyd	Sekwencja	Pochodzenie peptydu	Zastosowanie	Wynik badań
RADA16-1 BMHP1	Ac-RADARADARADARADA- GGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	Peptyd 1 specyficzny dla szpiku kostnego (BMHP1)	Transplantacja jako układów o działaniu neu- roprotetycznym Hybryda zło- żona z nano- włóknien uzyska- nych techniką elektroprzędze- nia oraz nano- materiałów peptydowych otrzymanych w wyniku procesu samo- organizacji	Rekonstrukcja oraz odbudo- wanie uszko- dzeń w rdzeniu kręgowym
RADA 16-1- BMHP1	Ac-(RADA) <sub>4</sub> GGPFSSTKT-NH <sub>2</sub>	BMHP	3-D ruszto- wanie dla zagnieżdżenia i proliferacji neuronowych komórek macierzystych (NSC)	Obecność funk- cjonalnego frag- mentu poprawia znaczco proli- ferację oraz różnicowanie komórek NSC
RADA16-1- BMHP2	Ac-(RADA) <sub>4</sub> GGSKPPGTSS-NH <sub>2</sub>	BMHP		
RADA16-1- RGD	Ac-(RADA) <sub>4</sub> - GPRGDSGYRGDSG-NH <sub>2</sub>	Kolagen VI		
RADA16-1	(RADA) <sub>4</sub>	-		
MMP-2	(C16-GTAGLIGQS)	Metaloprote- inaza 2 macierzy pozakomór- kowej	Hybrydowy materiał zło- żony z nano- włóknien PCL uzyskanych na drodze elektro- przędzenia oraz nanostruktur peptydowych otrzymanych w wyniku samoorganizacji	Znacząca po- prawa adhezji, infiltracji i pro- liferacji ludzkich mezenchymal- nych komórek macierzystych
RGDS+MMP-2	(C16-GTAGLIGQSRGDS)	Naturalny ligand pro- cesu adhezji RGDS		
Fmoc FF/RGD	FF/RGD	Sekwencja RGD	3-D ruszto- wanie dla ludz- kich fibrobla- stów skóry	Proliferacja komórek na rusztowaniu FF/ RGD Właściwa mor- fologia komórek

Peptyd	Sekwencja	Pochodzenie peptydu	Zastosowanie	Wynik badań
SAPNF	RADA	-	Potencjalne substraty pozwalające na transplantację wysepek trzustki	Wzrost vitalności i efekt stymulowania wysepek trzustki przez materiał rusztowania
d-EAK6	EAK16	Peptyd ulegający samoorganizacji złożony z aminokwasów o konfiguracji D	Badania hemostazy w króliczym modelu gojenia urazów wątroby	Szybka homeostaza
YIG	AcN-YIGSR-GG-(RADA)-CONH <sub>2</sub>	Laminina 1	Rusztowanie uzyskane z koniugatu funkcjonalnego peptydu oraz peptydu podanego na samoorganizację, badanie funkcji komórek śródbłonna ludzkiej aorty	Poprawa adhezji komórek
RYV	AcN-RYVVLPR-GG-(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>	Laminina 1		
TAG	AcN-TAGSCLRKFSTM-GG-(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>	Kolagen IV		
IKVAV-PA	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O-A <sub>3</sub> G <sub>4</sub> D <sub>2</sub> IKVAV	Domena występująca w łańcuchu α1 lamininy	Badania różnicowania komórek macierzystych szpiku kostnego (BMSC) do neurocytów	Znacząca poprawa adhezji komórek BMSC oraz ich różnicowania do neurocytów
FGL-PA	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> -NH-AAAGGGEVYVVAENQQGKSKA-COOH	Modulator czynnika wzrostu fibroblastów	<i>In vitro</i> biokompatybilność z neuronalnymi komórkami macierzystymi	Poprawa różnicowania neuronów
P24	(S[PO <sub>4</sub> ]) KIPKASSVPTELSAISTLY-LDDD	Fragment białka morfogenetycznego kości 2 (BMP2)	Badanie nad regeneracją tkanki kostnej z użyciem rusztowania utworzonego z kolagenu funkcjonalizowanego fragmentami białka BMP2	Osteoinduktywność oraz osteogeniczność na poziomie białka BMP2



Peptyd	Sekwencja	Pochodzenie peptydu	Zastosowanie	Wynik badań
KLDL3	AcN-KLDLKLDKLDDL-CNH <sub>2</sub>	-	Rusztowanie uzyskane z peptydów ulegających samo-organizacji oraz fragmentów czynników wzrostu dla chondrocytów i komórek podścieliska szpiku kostnego	Obserwowane uwalnianie czynnika wzrostu, umożliwiające regenerację tkanki chrzęstnej w warunkach <i>in vivo</i>

Jednak rusztowania oparte o peptydy tworzące w wyniku samo-organizacji trójwymiarowe struktury nie są materiałem idealnym. Głównym ich ograniczeniem jest brak specyficznych oddziaływań z komórkami. Funkcje takie posiada naturalna macierz zewnątrzkomórkowa. Idealnym z punktu widzenia inżynierii tkankowej byłoby uzyskanie materiałów łączących powierzchnię nanowłókien z aktywnością składników ECM.

W odpowiedzi na to wyzwanie, podjęte zostały badania nad drugą generacją rusztowań peptydowych, utworzonych z peptydów podatnych na samo-organizację ale zawierających dodatkowo fragmenty białek macierzy pozakomórkowej, które taką aktywność gwarantują [86]. Najprostszym rozwiązaniem jest bezpośrednio dobudowywanie funkcjonalnych fragmentów do peptydów ulegających samo-organizacji. Fragment funkcjonalny dobudowywany jest do C-końca peptydu. W celu zwiększenia eksponowania fragmentu funkcjonalnego i tym samym lepszego jego oddziaływania z receptorem komórki stosowane są łączniki pomiędzy obydwoma fragmentami peptydowymi. Najczęściej jako łącznik stosuje się dipeptyd złożony z reszt glicyny. Podejście to zostało zastosowane w syntezie koniugatu zawierającego peptyd RADA-I 16 z dwoma jednostkami RGD dając w ten sposób strukturę PRG (PRGDSGYRGDS). Uzyskane z tych koniugatów rusztowania zastosowane w badaniach z użyciem osteoblastów charakteryzowały się podwyższoną proliferacją, zdolnością do różnicowania i migracji. Peptyd RADA16 w połączeniu z motywem PRG (PRGDSGYRGDS) oraz fragmentem lamininy PDS (PDSGR) warunkującej adhezję komórek znacząco stymulował fibroblasty więzadeł okołozębowych do produkcji białek macierzy: kolagenu typu I i typu III, bez użycia dodatkowych czynników wzrostu, co wskazuje na przydatność takiego koniugatu w leczeniu ran oraz regeneracji tkanki przyzębia [87].

W innych badaniach peptyd RADA16-I połączony z dwoma fragmentami funkcyjnymi PRG oraz fragmentem KLT (aktywującym receptor VEGF) użyto w badaniach nad proliferacją ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*, HUVEC). Stwierdzono wyższą przeżywalność, migrację, proliferację oraz tubulogenezę komórek w porównaniu do zastosowa-

nia rusztowania złożonego jedynie z RADA16-I [88]. Koniugaty peptydu RADA16-I z fragmentami białek błony podstawnej: lamininy-1 (YIGSR, RYVVLPR) oraz kolagenu IV (TAGSCLRKFSTM) wykorzystano w badaniach z komórkami śródbłonna ludzkiej aorty. Podjęte zostały również próby łączenia izolowanych z ECM ligandów o sekwencjach: RGDS, DGEA z amfifilami peptydowymi (ang. *Peptide Amphiphiles*, PA). Uzyskane materiały charakteryzowały się synergistycznym wzrostem różnicowania osteoblastów [89].

Od idealnego materiału użytecznego w inżynierii tkankowej oczekuje się dodatkowo odpowiedniej porowatości. Porowatość materiału sprzyja inkorporacji komórek, ich migracji i proliferacji. Materiały peptydowe tworzone w procesie samo-organizacji niestety charakteryzują się niską porowatością (w tym również brakiem kontroli rozmiarów porów), brakiem zdolności do tworzenia struktur trójwymiarowych (z wyjątkiem hydrożeli) oraz niewystarczającą trwałością mechaniczną. Należy również pamiętać, że peptydy ulegają degradacji pod działaniem enzymów proteolitycznych, tym samym konieczne jest synteza obiektów odpornych na działanie enzymów bądź prowadzenie systematycznych badań nad optymalnym profilem degradacji rusztowań peptydowych pod działaniem proteaz.

W przeciwieństwie do nanowłókien uzyskiwanych na drodze elektroprzędzenia z polimerów, nanowłókna peptydowe otrzymywane w procesie samo-organizacji nie są ciągłe, co może skutkować ich fagocytozą do wnętrza komórek [90]. Z drugiej jednak strony należy pamiętać, że nanowłókna otrzymane z syntetycznych polimerów w procesie elektroprzędzenia, pomimo, że mają bardzo dobre parametry mechaniczne, fizyczne i zapewniają porowatość struktur, również posiadają liczne wady. Nie mają one możliwości wytworzenia sygnału molekularnego do rozpoczęcia adhezji komórek na ich powierzchni, co skutkuje koniecznością ich modyfikowania w sposób zapewniający zachowanie właściwości mechanicznych i topografii [91], co nie jest operacją prostą do wykonania. Co prawda próbowano wykorzystać elektroprzędzenie do tworzenia włókien z kolagenu lub żelatyny, jednak białka te ulegały denaturacji i traciły również integralność strukturalną [92]. Przedstawione fakty wskazują więc na konieczność poszukiwania trzeciej generacji rusztowań komórkowych, które nie tylko zapewnią odpowiednią powierzchnię, porowatość, właściwości mechaniczne, oddziaływanie z receptorami komórkowymi, ale zagwarantują również komunikowanie się komórek poprzez cytokiny lub czynniki wzrostu. Wykazano, że najbardziej obiecujące wyniki uzyskiwane są w przypadku zastosowania jako rusztowań, hybrydowych układów wieloskładnikowych złożonych z odpowiednio uformowanych polimerów oraz struktur uzyskiwanych na drodze samo-organizacji peptydów. Podejście to zostało zastosowane w regeneracji rdzenia kręgowego. Jako rusztowanie zastosowano: nanokompozyt utworzony w procesie elektroprzędzenia PLGA/PCL włókien, hydrożelu uzyskanego w trakcie samo-organizacji włókien koniugatu peptydu RADA16-1 z fragmentem funkcjonalnym BMHP1. W tym przypadku stwierdzono, że gdy zastosowano łącznik glicynowy pomiędzy peptydem RADA16-I oraz fragmentem funkcjonalnym finalne hydrozele

charakteryzowały się wyższą stabilnością rusztowania. Dla dłuższych łączników glicynowych obserwowano wzrost stabilności rusztowania oraz poprawę adhezji i proliferacji komórek [93].

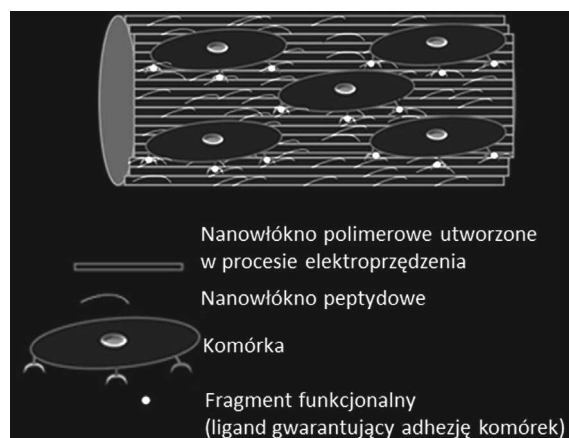
Hybrydowe implanty kostne tworzone były poprzez wypełnianie porowatych pianek tytanowych Ti-6Al-4V za pomocą nanowłókien peptydów amfifilowych. Dla tego materiału wykazano zarówno oczekiwaną mineralizację jak również odpowiedź komórkową na granicy komórki gospodarza – implant [94]. Porowate implanty tytanowe gwarantują długotrwałą stabilność materiału, zaś pożądana osteointegracja ulega wzrostowi dzięki obecności w amfifilowych nanowłóknach peptydowych motywu RGD.

Hybrydowy hydrożel złożony z *N*-(2-hydroksypropylo)metakrylamidu (HPMA) oraz nanowłókien peptydowych o strukturze  $\beta$ -kartki jest jednym z pierwszych materiałów, dla którego obserwowano osteoindukcję w warunkach *in vivo* [95]. Opisany hybrydowy hydrożel posiadał zdolność orientowania hydroksyapatytu (HA) tak jak w kości. Autorzy sugerują, że za orientację HA odpowiada struktura  $\beta$ -kartki nanowłókna peptydowego. Obecność HPMA eliminuje słabe właściwości mechaniczne charakterystyczne dla agregatów peptydowych.

Kompozyt złożony z hydroksyapatytu oraz peptydu RADA16 testowano z użyciem mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) pod kątem regeneracji tkanki kostnej. Obserwowano właściwe różnicowanie komórek [96]. W tym przypadku hydrożel otrzymany z RADA16 zapewnia trójwymiarowe rusztowanie dla zagnieżdżania się komórek MSC, zaś HA gwarantuje odpowiednie właściwości mechaniczne rusztowania.

Wieloskładnikowy kompozyt zawierający gąbkę kolagenową, porowate rusztowanie utworzone z poli-( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL), plazmy wzbogaconej płytkami krwi (ang. *platelet rich plasma*, PRP), morfogenetycznego białka-2 kości (ang. *bone morphogenic protein-2*, BMP 2) osadzonego na mikrocząstkach nanoporowatej krzemionki, amfifili peptydowych o właściwościach mineralizacyjnych oraz mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) okazał się efektywny *in vivo* w szybkiej regeneracji kości oraz procesie angiogenezy. Synergistyczne działanie wszystkich składników kompozytu zapewnia proliferację komórek oraz angiogenezę z uwagi na obecność naturalnych czynników wzrostu tego procesu (białka PRP).

Rusztowanie komórkowe uzyskane z mikrowłókien kwasu poliglikolowego zmodyfikowane za pomocą amfifili peptydowych zawierających sekwencje RGDS oraz PHSRSN wykorzystano w eksperymentach z użyciem komórek mięśni gładkich. Stwierdzono zwiększenie infiltracji komórek, ich adhezji oraz odkładania się w rusztowaniu. Amfifile peptydowe zawierające reszty argininy gwarantowały oddziaływanie pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami guanidynowymi i błoną komórkową, co wspomagało proces zagnieżdżania i infiltracji komórek.



Rysunek 6. Nanowłókna rusztowania polimerowego pokryte nanowłóknami peptydowymi tworzonymi w procesie samo-organizacji oraz fragmentami funkcjonalnymi gwarantującymi oddziaływanie z receptorami komórkowymi

Figure 6. Nanofibers of polymer scaffold covered with a peptide nanofibers formed under self-assembling process and functional fragments assuring interaction with cell receptors

Rusztowania hybrydowe zawierające nanowłókna PCL wytworzone techniką elektroprzędzenia po pokryciu ich nanowłóknami amfifili peptydowych mimi-kujących naturalną ECM testowano pod kątem wykorzystania w kardiologii [97]. Trójwymiarowe wymagania strukturalne oraz porowatość rusztowania gwarantuje wykorzystanie nanowłókien z PCL, natomiast charakterystyczną funkcjonalność ECM mimikuje wbudowanie do amfifili peptydowych bioaktywnych ligandów adhezji komórek. Nanowłókna PCL wykorzystano również do uzyskania mate-riału, który funkcjonalizowany był poprzez zastosowanie peptydów zawierających fragmenty RGD [98]. Peptydy z fragmentami RGD oprócz funkcjonalności biolo-gicznej gwarantowały również wzrost hydrofilowości materiału w porównaniu do rusztowań wytworzonych jedynie z PCL. Gelain i współpracownicy [99] wykazali, że zastosowanie nanowłókien tworzonych z PLGA oraz PCL techniką elektroprzędzenia pozwala na uzyskanie nanorurek o wymiarach dwukrotnie większych w porównaniu do nanorurek uzyskiwanych z peptydów na drodze samo-organizacji. Zróżnicowanie wymiarów nanomateriałów zastosowanych do tworzenia struktur hybrydowych pozwala na modulowanie ich właściwości mechanicznych. Uważa się, że zastosowanie hybrydowych materiałów jest przyszłością medycyny regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej.

## PODSUMOWANIE

Idealne z punktu widzenia inżynierii tkankowej materiały stanowiące rusztowania powinny być: biokompatybilne, biodegradowalne/bio-resorbowalne, bioneutralne, gwarantować bioneutralność produktów ich biodegradacji, brak cytotoksyczności oraz posiadać pożądane właściwości mechaniczne. Rusztowania stanowiąc powinny syntetyczne, tymczasowe zamienniki naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i zapewniać komórkom środowisko jak najbardziej zbliżone do naturalnego, warunkujące i przyspieszające proces tworzenia nowej tkanki. W chwili obecnej żaden z dostępnych materiałów implantacyjnych nie posiada właściwości takich, jakie wykazuje naturalna tkanka. Stosowane materiały stanowią kompromis pomiędzy różnorodnymi kryteriami jakościowymi, którymi powinien charakteryzować się biomateriał. Dla uzyskania pełnego sukcesu niezbędne jest wielopłaszczyznowe podejście do projektowania oraz wytwarzania materiałów do regeneracji tkanek [100-105]. Pod uwagę należy brać wszystkie funkcjonalne składniki ECM: frakcję kolagenową, frakcję niekolagenową oraz matrycę węglowodanową. Działania wykorzystujące białka będące składnikami ECM niosą ze sobą pewne słabości takie jak np. podatność na działanie enzymów proteolitycznych, właściwości immunogenne i inne. Wyeliminowanie wspomnianych powyżej ograniczeń związanych ze stosowaniem białek możliwe jest poprzez wykorzystanie ich funkcjonalnych fragmentów oraz peptydów syntetycznych o właściwościach samo-organizujących i tworzących struktury trójwymiarowe frakcji białkowej ECM.

Problem „naprawy” ubytków ludzkiego ciała zawsze wzbudzał i wzbudza zainteresowanie naukowców i ośrodków badawczych bowiem uważa się, że ten obszar stanowi przyszłość medycyny regeneracyjnej. Główny efekt takich działań widoczny oczywiście będzie w obszarze medycyny regeneracyjnej, jednak do jego uzyskania niezbędne jest ciągłe rozszerzanie badań z chemii organicznej, chemii związków naturalnych, inżynierii materiałowej, biochemii, biologii, enzymologii oraz immunologii.

## PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca została sfinansowana z projektu badawczego UMO-2015/19/B/ST8/02594, pt. „Innowacyjne materiały hybrydowe do regeneracji tkanek wywodzące się wyłącznie ze związków naturalnych”

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H. Wobma, G. Vunjak-Novakovic, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2016, **22**, 101.
- [2] V. Marx, *Nature*, 2015, **522**, 373.
- [3] A. Atala, F.K. Kasper, A.G. Mikos, *Sci. Transl. Med.*, 2012, **4**, 160.

- [4] M.J. Webber, J.A. Kessler, S.I. Stupp, *J. Intern. Med.*, 2009, **267**, 71.
- [5] P.X. Ma, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 184.
- [6] N. Manasa, K. Priyadharshini, M.K. Uma, S. Swaminathan, *Curr. Prot. Pepti. Sci.*, 2013, **14**, 70.
- [7] S. Sethuraman, L.S. Nair, S. El-Amin, M. Nguyen, A. Singh, N. Krogman, Y. E. Greish, H. R. Allcock, P. W. Brown, C. T. Laurencin, *Acta. Biomater.*, 2010, **6**, 1931.
- [8] S. Sethuraman, L.S. Nair, S. El-Amin, M. Nguyen, A. Singh, N. Krogman, Y.E. Greish, H.R. Allcock, P.W. Brown, C.T. Laurencin, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2011, **22**, 733.
- [9] I. Vroman, L. Tighzert, *Materials*, 2009, **2**, 307.
- [10] F. Gelain, *Int. J. Nanomed.*, 2008, **3**, 415.
- [11] S. Kyle, A. Aggeli, E. Ingham, M.J. McPherson, *Trends Biotechnol.*, 2009, **27**, 422.
- [12] L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang, Y. Cao, *Pediatr. Res.*, 2008 **63**, 492.
- [13] N. Angelova, D. Hunkeler, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 409.
- [14] J. Hu, X. Sun, H. Ma, C. Xie, Y. E. Chen, P.X. Maa, *Biomaterials*, 2010, **31**, 7971.
- [15] L. Zhao, M.S. Detamore, *J. Biomed. Sci. Eng.*, 2010, **3**, 1041.
- [16] K. Ragaert, F. De Somer, I. De Baere, L. Cardon, J. De Grieck, *Adv. Product. Eng. Manag.*, 2011, **6**, 163.
- [17] Z. Pan, J. Ding, *Interface Focus*, 2012, **2**, 366.
- [18] E. Chung, S.H. Kim, Y.G. Ko, J.H. Kwon, J.-W. Han, I.S. Park, S.S. Han, S.H. Kim, *Key Eng. Mat.*, 2007, **342-343**, 321.
- [19] L.S. Nair, C.T. Laurencin, *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.*, 2006, **102**, 47.
- [20] S.Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, K.W. Leong, *Biomaterials*, 2008, **29**, 653.
- [21] J.S. Choi, K.W. Leong, H.S. Yoo, *Biomaterials*, 2008, **29**, 587.
- [22] L.N. Novikova, J. Pettersson, M. Brohlin, M. Wiberg, L.N. Novikov, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1198.
- [23] S.J. Lee, S.H. Oh, J. Liu, S. Soker, A. Atala, J.J. Yoo, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1422.
- [24] F. Gelain, S. Panseri, S. Antonini, C. Cunha, M. Donega, J. Lowery, F. Taraballi, G. Cerri, M. Montagna, F. Baldissera, A. Vescovi, *ACS Nano.*, 2011, **5**, 227.
- [25] E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi, K. Roy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 215.
- [26] J.S. Choi, S.J. Lee, G.J. Christ, A. Atala, J.J. Yoo, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1.
- [27] E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton, J. Mey, *Biomaterials*, 2007, **28**, 3012.
- [28] M. Kallrot, U. Edlund, A.C. Albertsson, *Biomaterials*, 2006, **27**, 1788.
- [29] B.S. Miguel, M. Ehrbar, C. Ghayor, M. Textor, F. Weber, *Eur. Cells Mat.*, 2006, **11**, 5.
- [30] A.S. Rowlands, S.A. Lim, D. Martin, J. J. Cooper-White, *Biomaterials*, 2007, **28**, 2109.
- [31] T.W. Chung, S.S. Wang, W.J. Tsai, *Biomaterials*, 2008, **29**, 228.
- [32] H. Shen, X. Hu, F. Yang, J. Bei, S. Wang, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4219.
- [33] A.M.A. Ambrosio, H.R. Allcock, D.S. Katti, C.T. Laurencin, *Biomaterials*, 2002, **23**, 1667.
- [34] P.A. Gunatillake, R. Adhikari, *Eur. Cells Mat.*, 2003, **5**, 1.
- [35] L. Almany, D. Seliktar, *Biomaterials*, 2005, **26**, 2467.
- [36] E. Alsberg, K.W. Anderson, A. Albeiruti, R.T. Franceschi, D.J. Mooney, *J. Dent. Res.*, 2001, **80**, 202.
- [37] E.A. Silva, D.J. Mooney, *Curr. Topics Development. Biol.*, 2004, **64**, 181.
- [38] D.S. Katti, K.W. Robinson, F.K. Ko, C.T. Laurencin, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 2004, **70B**, 286.
- [39] A. Subramanian, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, *Biomed. Mater.*, 2011, **6**, 025004.
- [40] P. Kuppan, K.S. Vasanthan, D. Sundaramurthi, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3156.
- [41] L.S. Nair, S. Bhattacharyya, C.T. Laurencin, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2004, **4**, 659.
- [42] R. Vasita, D.S. Katti, *Int. J. Nanomed.*, 2006, **1**, 15.

- [43] H-Q. Mao, S.H. Lim, S. Zhang, G. Christopherson, K. Kam, S. Fischer, *Tissue Eng. Biomater.*, 2010, **2**, 89.
- [44] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1171.
- [45] D.A. Harrington, A.K. Sharma, B.A. Erickson, E.Y. Cheng, *World J. Urol.*, 2008, **26**, 315.
- [46] B. Dhandayuthapani, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 2010, **94B**, 264.
- [47] C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, **59**, 1413.
- [48] V. Milleret, B. Simona, P. Neuenschwander, H. Hall, *Eur. Cell Mater.*, 2011, **21**, 286.
- [49] F. Yang, R. Murugan, S. Ramakrishna, X. Wang, Y-X. Mac, S. Wang, *Biomaterials*, 2004, **25**, 1891.
- [50] S. Zhang, *Materials Today*, 2003, **6**, 20.
- [51] C. Aleman, A. Bianco, M. Venanzi, *Peptide Materials. From nanostructures to applications*, John Wiley & Sons Ltd., 2013.
- [52] M. Caruso, E. Placidi, E. Gatto, C. Mazzuca, L. Stella, G. Bocchinfuso, A. Palleschi, F. Formaggio, C. Toniolo, M. Venanzi, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 5448.
- [53] M. Caruso, E. Gatto, E. Placidi, G. Ballano, F. Formaggio, C. Toniolo, D. Zanuy, C. Aleman, M. Venanzi, *Soft Matter*, 2014, **10**, 2508.
- [54] E. Longo, K. Wright, M. Caruso, E. Gatto, A. Palleschi, M. Scarselli, M. De Crescenzi, M. Crisma, F. Formaggio, C. Toniolo, M. Venanzi, *Nanoscale*, 2015, **7**, 15495.
- [55] L. Sun, C. Zheng, T.J. Webster, *Int. J. Nanomedicine*, 2017, **12**, 73.
- [56] D.B. Rasale, A.K. Das, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**, 10797.
- [57] M.W. Tibbitt, C.B. Rodell, J.A. Burdick, K.S. Anseth, *PNAS*, 2015, **112**, 14444.
- [58] E. De Santis, M.G. Ryadnov, *Amino Acids, Pep. Prot.*, 2015, **40**, 199.
- [59] P. Kumaraswamy, R. Lakshmanan, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, *Soft Matter*, 2011, **7**, 2744.
- [60] K. Rajagopal, J. P. Schneider, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2004, **14**, 480.
- [61] J.D. Hartgerink, T.D. Clark, M.R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.*, 1998, **4**, 1367.
- [62] A. Bolhassani, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011, **1816**, 232.
- [63] S. Zhang, L. Yan, M. Altman, M. Lasse, H. Nugent, F. Frankel, D.A. Lauffenburger, G.M. Whitesides, A. Rich, *Biomaterials*, 1999, **20**, 1213.
- [64] J. Hyun, W.K. Lee, N. Nath, A. Chilkoti, S. Zauscher, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 7330.
- [65] S. Zhang, C. Lockshin, A. Herbert, E. Winter, A. Rich, *EMBO J.*, 1992, **11**, 3787.
- [66] P.X. Ma, J.H. Elisseeff, *Scaffolding in tissue engineering*, CRC press: Boca Raton, 2005.
- [67] R.G. Ellis-Behnke, Y.-X. Liang, S.-W. You, D.K.C. Tay, S. Zhang, K.-F. So, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, **103**, 5054.
- [68] A. Horii, X. Wang, F. Gelain, S. Zhang, *Plos One*, 2007, **2**, e190.
- [69] R.N. Shaha, N.A. Shah, M.M. Del Rosario Lim, C. Hsieha, G. Nuber, S.I. Stupp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, **107**, 3293.
- [70] S. Gilead, E. Gazit, *Supramol. Chem.*, 2005, **17**, 87.
- [71] T.P.J. Knowles, M.J. Buehler, *Nat. Nanotechnol.*, 2011, **6**, 469.
- [72] E. Gazit, *FASEB J.*, 2002, **16**, 77.
- [73] W. Wang, Z. Yang, S. Patanavanich, B. Xub, Y. Chau, *Soft Matter*, 2008, **4**, 1617.
- [74] B.V. Slaughter, S.S. Khurshid, O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, N.A. Peppas, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 3307.
- [75] A. Liedmann, S. Frech, P.J. Morgan, A. Arndt Rolfs, M.J. Frech, *Biores. Open Access*, 2012, **1**, 16.
- [76] D.A. Narmoneva, R. Vukmirovic, M.E. Davis, R.D. Kamm, R.T. Lee, *Circulation*, 2004, **110**, 962.
- [77] D.A. Narmoneva, O. Oni, A.L. Sieminski, S. Zhang, J.P. Gertler, R.D. Kamm, R.T. Lee, *Biomaterials*, 2005, **26**, 4837.
- [78] S. Zhang, *Biotech. Adv.*, 2002, **20**, 321.

- [79] A. Aggeli, M. Bell, L.M. Carrick, C.W.G. Fishwick, R. Harding, P.J. Mawer, S.E. Radford, A.E. Strong, N. Boden, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9619.
- [80] T.C. Holmes, S. de Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, **97**, 6728.
- [81] J. Guo, K.K.G. Leung, S. Huanxing, Q. Yuan, L. Wang, T.H. Chu, W. Zhang, J.K.S. Pu, G.K.P. Ng, W.M. Wong, X. Dai, W. Wu, *Nanomed: Nanotech. Biol. Med.*, 2009, **5**, 345.
- [82] S. Wang, D. Nagrath, P.C. Chen, F. Berthiaume, M.L. Yarmush, *Tissue Eng. Part A*, 2008, **14**, 227.
- [83] Y. Yuan, C. Cong, J. Zhang, L. Wei, S. Li, Y. Chen, W. Tan, J. Cheng, Y. Li, X. Zhao, Y. Lu, *Transplant Proc.*, 2008, **40**, 2571.
- [84] R.E. Miller, P.W. Kopesky, A.J. Grodzinsky, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2010, **469**, 2716.
- [85] Z. Luo, S. Wang, S. Zhang, *Biomaterials*, 2011, **32**, e2013.
- [86] G.A. Silva, C. Czeisler, K.L. Niece, E. Beniash, D.A. Harrington, J.A. Kessler, S.I. Stupp, *Science*, 2004, **303**, 1352.
- [87] Y. Kumada, S. Zhang, *Plos One*, 2010, **5**, e10305.
- [88] X. Wang, A. Horii, S. Zhang, *Soft Matter.*, 2008, **4**, 2388.
- [89] J.M. Anderson, M. Kushwaha, A. Tambralli, S.L. Bellis, R.P. Camata, H.-W. Jun, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 2935.
- [90] M. Goldberg, R. Langer, X. Jia, *Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2007, **18**, 241.
- [91] I.R. Degano, L. Quitana, M. Vilalta, D. Horna, N. Rubio, S. Borros, C. Semino, J.M. Blanco, D. Horna, N. Rubio, S. Borros, C. Semino, J. Blanco, *Biomaterials*, 2009, **30**, 1156.
- [92] A. Tambralli, B. Blakeney, J. Anderson, M. Kushwaha, A. Andukuri, D. Dean, H.-W. Jun, *Biofabrication*, 2009, **1**, 025001.
- [93] F. Taraballi, A. Natalello, M. Campione, O. Villa, S. M. Doglia, A. Paleari, F. Gelain, *Front. Neuro-engineering*, 2010, **3**, 1.
- [94] T. D. Sargeant, M.O. Guler, S.M. Oppenheimer, A. Mata, R.L. Satcher, D.C. Dunand, S.I. Stupp, *Biomaterials*, 2008, **29**, 161.
- [95] L.C. Wu, J. Yang, J. Kopecek, *Biomaterials*, 2011, **32**, e5341.
- [96] T. Matsumoto, M. Tadokoro, K. Hattori, H. Ougushi, J. Satou, *Bioceram. Dev. Appl.*, 2011, **1**, 1.
- [97] A. Andukuri, M. Kushwaha, A. Tambralli, J.M. Anderson, D.R. Dean, J.L. Berry, Y.D. Sohn, Y. Yoon, B.C. Brott, H. Jun, *Acta. Biomaterialia*, 2011, **7**, 225.
- [98] W. Zheng, Z. Wang, L. Song, Q. Zhao, J. Zhang, D. Li, S. Wang, J. Han, X. Zheng, Z. Yang, D. Kong, *Biomaterials*, 2012, **33**, 2880.
- [99] C. Cunha, S. Panseri, F. Gelain, *Methods Mol. Biol.*, 2013, **1058**, 171.
- [100] D.A. Grande, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2017, **13**, 67.
- [101] Z.M. Jessop, A. Al-Sabah, W.R. Francis, I.S. Whitaker, *BMC Med.*, 2016, **14**, 115.
- [102] L. Zhi, X. Mao-Bin, L. Yi, M. Yan, L. Jia-Shen, D. Fang-Yin, *J. Biomater. Tissue Eng.*, 2016, **6**, 755.
- [103] H. Wobma, G. Vunjak-Novakovic, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2016, **22**, 101.
- [104] A.S. Mao, D.J. Mooney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, **112**, 14452.
- [105] R.K. Upadhyay, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2015, **4**, 1.