



# Radiacyjna sterylizacja kolagenu

## Radiation sterilization of collagen

Małgorzata Dąbrowska-Gralak, Wojciech Głuszewski

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa, tel. +48 22 504 12 88, e-mail: w.gluszewski@ichtj.waw.pl

### Wprowadzenie

Jednym z najważniejszych organów naszego ciała jest skóra, struktura chroniąca cały organizm przed wpływem niekorzystnych czynników zewnętrznych. Jakiegokolwiek przerwanie jej ciągłości z powodu urazów mechanicznych czy chorób o podłożu genetycznym (np. Epidermolysis Bullosa) niesie ze sobą ryzyko poważnych infekcji. Kiedy niewygodne są procesy regeneracyjne organizmu, skutecznym rozwiązaniem mogą być allogeniczne przeszczepy tkankowe [4]. Z uwagi na zgodność tkankową, najczęściej wykorzystuje się własną skórę chorego, pobraną

z innej, zdrowej okolicy ciała. Taki rodzaj przeszczepu nazywamy przeszczepem autogennym. Posiadają one jednak szereg wad i nie zawsze mogą być zastosowane, na przykład, gdy rany pokrywają dużą powierzchnię ciała.

### Biokompatybilne opatrunki

Z wymienionych powodów poszukuje się innych metod radzenia sobie z problemem ubytków skórnych. Jednym ze sposobów są biokompatybilne opatrunki. Celem badań jest stworzenie implantu o parametrach najbardziej zgodnych z ludzką skórą.

346

### Streszczenie

Procedury przygotowania i przechowania przeszczepów [1] odbywają się w wyspecjalizowanych laboratoriach nazywanych bankami tkanek. W przypadku protez biologicznych (opatrunków) proces przygotowania kończy się sterylizacją produktu. Do wyjąłowania wyrobów medycznych i biomateriałów stosuje się obecnie rutynowo promieniowanie jonizujące. Technika ta znajduje stale nowe zastosowania np. do wytwarzania implantów na indywidualne zamówienie. Sterylizacja [2] i dostarczenie do odbiorcy powinno nastąpić w ciągu 48 h od złożenia zamówienia. Wymaganiem tym może sprostać jedynie metoda radiacyjna. W szczególności polecana jest wiązka szybkich elektronów [3], w której czas wyjąłowania jest rzędu kilku sekund. Unikatową zaletą promieniowania jonizującego, zapobiegającą wtórnemu zakażeniu, jest sterylizacja wyrobu w całej objętości, w opakowaniu jednostkowym i zbiorczym. Zapewniona jest przy tym wysoka skuteczność inaktywacji patogenów, dobra penetracja i nieznaczne jedynie podniesienie temperatury, co ma znaczenie w przypadku wyjąłowania termolabilnych materiałów i tkanek. Działanie promieniowania jonizującego powoduje stosunkowo niewielkie zmiany we właściwościach fizyko-chemicznych w tkankach i ich składnikach. Przykładowo omówiono wyniki badań radiolizy kolagenu w kontekście jego zastosowań do otrzymywania biokompatybilnych opatrunków.

**Słowa kluczowe:** kolagen, radiacyjna sterylizacja, radioliza, biokompatybilne opatrunki

### Abstract

The procedures for the preparation and storage of transplants [1] take place in specialized laboratories called tissue banks. In the case of biological prostheses (dressings), the preparation process ends with the sterilization of the product. Currently, ionizing radiation is routinely used to sterilize medical devices and biomaterials. This technique is constantly finding new applications, e.g. for the production of implants for individual orders. Sterilization [2] and delivery to the recipient should take place within 48 hours of placing the order. Only the radiation method can meet these requirements. Especially recommended is an electron beam [3] in which the sterilization time is in the order of a few seconds. The unique advantage of ionizing radiation, preventing recontamination, is sterilization of the product in its entire volume, in unit and collective packaging. The high efficiency of pathogen inactivation, good penetration and only a slight increase in temperature are ensured, which is important in the sterilization of thermolabile materials and tissues. The action of ionizing radiation causes relatively small changes in the physicochemical properties of tissues and their components. For example, the results of collagen radiolysis are discussed in the context of its applications for the production of biocompatible dressings.

**Key words:** collagen, radiation sterilization, radiolysis, biocompatible dressings

otrzymano / received:

26.08.2021

poprawiono / corrected:

31.08.2021

zaakceptowano / accepted:

01.09.2021

Występowanie kolagenu w naszym organizmie sprawiło, że został wytypowany jako podstawa do budowy opatrunków tego rodzaju. Rusztowanie skórne składa się z samego kolagenu, pozostałego po wytrawieniu żywych komórek. Wycinek skóry po odpowiedniej preparatyce jest sterylizowany. W ostatnim etapie zostają namnożone żywe komórki. Poza doskonałym naśladowaniem struktury spotykanej w tkance, zaletą kolagenu jest brak toksycznych produktów degradacji. Opatrunek biologiczny, który przyspieszałby leczenie ran głębokich, może być tańszym substytutem skóry. „Nowa skóra” będzie przechowywana w banku tkanek i komórek w postaci kolagenowych rusztowań biologicznych.

## Budowa kolagenu

Kolagen to białkowy polimer, z którego zbudowany jest człowiek. Aż 30% białek w naszym organizmie to właśnie kolagen. Znajduje się w skórze, a także w chrząstkach, kościach, a nawet w zębach. Kolagen ma 29 różnych odmian i każda z nich odpowiada za specyficzne właściwości danej tkanki. Cechą wspólną wszystkich rodzajów kolagenu jest występowanie potrójnej  $\alpha$ -helisy, składającej się z trzech skręconych wokół siebie łańcuchów polipeptydowych. W sekwencji łańcuchów najczęściej występują trzy aminokwasy: glicyna, prolina i hydroksyprolina. Glicyna stanowi 1/3 wszystkich aminokwasów obecnych w kolagenu. Natomiast według doniesień literaturowych [5] hydroksyprolina jest odpowiedzialna za stabilność termiczną. Potrójna helisa zawiera telopeptydy zaangażowane w sieciowanie cząsteczek kolagenu w procesie tworzenia włókienek. Każda dojrzała cząsteczka typu I ma dwa krótkie niehelikalne regiony zarówno na N- (NTx), jak i C-końcu (CTx), zwane telopeptydami [6]. Telopeptydy mają rzadko spotykany aminokwas – hydroksylizynę (Hyl), który jest ważny dla tworzenia i stabilizacji struktur kolagenowych. Dzięki działaniu oksydazy lizylowej, enzymu katalizującego kowalencyjną reakcję aldolową pomiędzy resztami lizyny lub hydroksylizyny w N- i C-telopeptydach sąsiednich cząsteczek, powstają wiązania typu dwie cząsteczki głowy do ogona wzdłuż włókienka [7].

Kolejnym ważnym zagadnieniem jest obecność wiązań wodorowych, zapewniająca stabilizację struktury potrójnej helisy. Wiązania te mogą być wewnątrz- lub międzycząsteczkowe. Dodatkowo integralnym elementem kolagenu jest woda, która ma ogromny wpływ na właściwości fizykochemiczne. Wyróżniamy trzy warstwy hydratacyjne w kolagenu [8, 9]: wodę swobodną, związaną i strukturalną. Woda strukturalna jest permanentnym elementem łańcucha i to ona tworzy wiązania wodorowe. Za obecność

wiązań intramolekularnych odpowiada woda związana. Natomiast woda swobodna migruje pomiędzy makrocząsteczkami kolagenu. Istotną rzeczą jest obecność wiązań kowalencyjnych (krzyżowych), które pojawiają się stopniowo wraz z naturalnym starzeniem się organizmu [10, 11]. Biosynteza kolagenu może zachodzić na skutek procesów enzymatycznych oraz nieenzymatycznych [11]. Droga powstawania wiązań krzyżowych na drodze enzymatycznej jest dominująca. Na kolagen wpływa również cukier. Dzieje się to w wyniku reakcji glikacji, czyli nieenzymatycznego przyłączenia glukozy do pierwszorzędowej wolnej grupy aminowej terminalnego aminokwasu w białku. Reakcja ta przyczynia się do formowania wiązań krzyżowych, które prowadzą do zmniejszenia elastyczności tkanki. Naruszenie procesów powstawania wiązań krzyżowych jest przyczyną chorób skóry. Według doniesień literaturowych zaburzenie tych procesów odpowiada w pewnym stopniu także za chorobę Alzheimera [12] i choroby sercowo-naczyniowe [13].

## Sterylizacja radiacyjna

Integralnym procesem otrzymywania materiałów biologicznych dla zastosowań medycznych jest sterylizacja [2, 3]. Promienionowanie jonizujące jest jedyną ordynowaną metodą, efektywnie eliminującą grzyby, bakterie i wirusy. Skóra należy do materiałów termolabilnych i wyjaławianie jej np. środkami chemicznymi czy wysokimi temperaturami jest niemożliwe. Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej do radiacyjnej sterylizacji przeszczepów rekomenduje dawkę 25 kGy. W Polsce Krajowe Centrum Bankowania Tkanek i Komórek zaleca dawkę 35 kGy. Promienionowanie jonizujące powoduje pewne modyfikacje materiału, które potencjalnie mogą mieć niekorzystny wpływ na parametry biomechaniczne sterylizowanych preparatów. Należy więc w praktyce ocenić, jaka dawka, eliminując zakażenie, w najmniejszym stopniu



**Ryc. 1** Kobaltowe źródła promieniowania gamma o różnej mocy dawki stosowane między innymi do badań radiolizy materiałów w ciekłym azocie. W przypadku kolagenu zastosowano źródło hinduskiej produkcji znajdujące się w środku (moc dawki 2 kGy/h)

Źródło: Sylwester Wojtas, IChTJ.



zmieni właściwości mechaniczne i chemiczne implantów. Zmiany te dotyczą zresztą bardzo małej liczby merów naturalnego polimeru. Energia promieniowania jonizującego odkładana jest bowiem niehomogenicznie w stosunkowo niewielkiej liczbie tzw. gniazd jonizacji. Można przyjąć, że jedno gniazdo jonizacji przypada na kilkadziesiąt tysięcy niezmiennych radiacyjnie merów. Z tego zresztą wynika unikatowość techniki radiacyjnej. Promieniowanie jonizujące tylko lokalnie deponuje dużą ilość energii, niewiele podwyższając średnią temperaturę reszty materiału. W gnieździe jonizacji następuje najczęściej oderwanie atomu wodoru, który po rekombinacji bezpowrotnie opuszcza materiał w postaci gazowego  $H_2$ . Towarzyszy temu powstanie wolnego rodnika w łańcuchu polimeru (makrorodnika). Rodnik ten jest natychmiast atakowany przez cząsteczkę tlenu, co zapoczątkowuje proces oksydegradacji. W obecności wody pod uwagę należy brać również produkty jej radiolizy, w szczególności bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy. Ze względu na duży stopień skomplikowania układów biologicznych poznanie mechanizmów reakcji rodnikowych zachodzących *in vitro* w modelowych biocząsteczkach może się przyczynić do zrozumienia procesów rodnikowych zachodzących *in vivo* oraz przeciwdziałania ich negatywnym skutkom.

## Radioliza kolagenu

Konsekwencjami powstawania w wyniku radiolizy kolagenu wolnych rodników są konkurujące zjawiska: sieciowanie oraz postradiacyjna oksydegradacja [14]. Procesy te powodują zmiany właściwości fizykochemicznych. Pierwotne rodniki z tlenem tworzą rodniki nadtlenkowe, które prowadzą następnie do powstawania nowych grup funkcyjnych. Tak więc, promieniowanie jonizujące, w szczególności sterylizacja radiacyjna, może powodować lokalną degradację polimerów, a chemia tych zjawisk jest bardzo urozmaicona [15]. Dlatego ważną kwestią jest poznanie radiolizy kolagenu w zakresie potencjalnych dawek sterylizacyjnych.

## Eksperyment i omówienie wyników

Materiałem badawczym był handlowy liofilizowany kolagen ze ścięgien bydłych typu I oraz allogeniczne kawałki ludzkich skór. Skafoldy przygotowywano na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Jest to materiał pozbawiony komórek, liofilizowany i pakowany w atmosferze powietrza. Próbkę napromieniowano w temperaturze suchego lodu wiązką szybkich elektronów (akcelerator Elektronika o energii elektronów 10 MeV i mocy 10 kW) oraz w ciekłym azocie promieniowaniem gamma (średnia energia 1,25 MeV, Gamma Chamber 5000, BRIT). Badania w temperaturze ciekłego azotu ( $-192^\circ\text{C}$ ) miały na celu śledzenie pierwotnych procesów rodnikowych (Ryc. 1). Użyto następujących dawek: 10 kGy, 25 kGy, 35 kGy i 50 kGy.

Badania miały charakter interdyscyplinarny. W celu opisanego wpływu promieniowania jonizującego na kolagen użyto technik analitycznych typowych dla badań materiałowych chemii polimerów i chemii radiacyjnej. Jednym z głównych celów było

zidentyfikowanie makrorodników kolagenowych. Wykorzystano w tym celu Elektronowy Rezonans Paramagnetyczny (EPR). Z analiz widm EPR wynika, że obserwowane rodniki pochodzą z bocznych grup głównego łańcucha kolagenu. Odpowiadają one za tworzenie wiązań poprzecznych. Zidentyfikowano także rodnik nadtlenkowy, co oznacza, że w kolagenie zachodzi utlenianie grup funkcyjnych.

W celu zbadania przebiegu rozkładu termicznego kolagenu wykonano analizy termogravimetryczne (TGA). Zaobserwowano 3 etapy rozkładu. Pierwszy to utrata wody swobodnej, drugi i trzeci to tworzenie się różnych produktów gazowych:  $NH_3$ ,  $CO_2$ ,  $HNCO$ ,  $NO$ ,  $CH_4$  [16]. Wykazano także, że wielkość dawki nie wpływa znacząco na utratę masy w wymienionych etapach rozkładu.

Badania Różnicowej Kalorymetrii Skaningowej (DSC) potwierdziły istnienie struktury potrójnej helisy w kolagenie suchym, co wskazuje na obecność cząsteczek wody strukturalnej. Badania DSC uzupełniły znacząco badania TGA. Pierwszy etap rozkładu obserwowany w TGA oznacza proces odwodnienia kolagenu [17-19]. Natomiast drugi pik w DSC przypisuje się termicznej denaturacji [9]. Przy wzroście temperatury pękają wiązania wodorowe, które stabilizowały potrójne helisy. Kolagen ze struktury helikalnej przemienia się w kłębek statystyczny. Proces ten jest nieodwracalny i dlatego podczas drugiego cyklu chłodzenia/ogrzewania piki nie były obserwowane.

Za pomocą chromatografii gazowej (GC Shimadzu, kolumna pakowana, detektor ciepło- przewodnościowy) oznaczano radiolityczne wydajności wydzielania wodoru i pochłaniania tlenu. Zaobserwowano intensywną degradację oksydacyjną kolagenu, co potwierdzało wcześniejsze badania EPR. Wydajność radiacyjna absorpcji  $O_2$  przez polimer była 10 razy większa niż wydajność wydzielania  $H_2$ . Możemy założyć, że radiacyjnie inicjowane utlenianie kolagenu zachodzi w procesach łańcuchowych.

Bezpośrednio po napromieniowaniu próbek kolagenu i skóry w temperaturze suchego lodu obserwowano efekt zmiany barwy z białej na bładożółtą. Odpowiedzialne są za to nietrwałe rodniki nadtlenkowe. Spektroskopia Rozproszonego Odbicia (DRS) UV-Vis [20] potwierdziła istnienie tych rodników, co jest także dowodem słuszności interpretacji widm EPR.

## Podsumowanie

Ostatnio podjęto wiele wysiłków, aby znaleźć skuteczną opcję leczenia pacjentów cierpiących na urazy skóry i trudno gojące się rany, takie jak oparzenia, wrzody, pęcherzowe zapalenie skóry [21] i inne. Pomimo znacznego postępu w zakresie podstawowych mechanizmów regulujących gojenie ran i wkładu substytutów skóry w tym zakresie, skuteczne możliwości leczenia ogromnej większości z nich nadal ograniczają się do inwazyjnych przeszczepów autologicznych i alloprzeszczepów. Co więcej, zastosowanie autologicznych przeszczepów skóry jest znacznie ograniczone ze względu na ich wielkość i dostępność [21, 22]. Powszechnie rozważaną i ustaloną alternatywą jest zastosowanie bezkomórkowych [22, 23, 24] rusztowań skóry (czyli skóry,



z której usunięto żywe komórki) lub biokompatybilnych matryc kolagenowych, które spełniają większość oczekiwań klinicznych i mogą służyć jako opatrunek samodzielnie lub w połączeniu z terapią komórkową [21]. W rzeczywistości zastosowanie rusz-towań kolagenowych jako nośników komórek macierzystych stanowi ekscytującą opcję poprawy zamykania ran, odbudowy nabłonka i przebudowy ran.

Na przykładzie kolagenu ogólnie opisano metodykę materiałowych badań biologicznych wyrobów medycznych przed ich wdrożeniem do radiacyjnej sterylizacji. Powyżej opisane prace potwierdziły występowanie uszkodzeń w materiale badawczym i pozwoliły oszacować ich zakres. Generalnie kolagen zachowuje swoją strukturę, która charakteryzuje się specyficzną konstrukcją zawierającą sporą liczbę wiązań poprzecznych. Odporność na działanie promieniowania jonizującego kolagenu jest wystarczająca dla rekomendacji technik radiacyjnych do ich wyjąłowania. Obecność degradacji oksydacyjnej, która jest odpowiedzialna za modyfikację grup funkcyjnych w peptydzie, wymaga dalszej analizy. Temat jest interesujący w kontekście prowadzonych aktualnie prac nad stworzeniem nowatorskich opatrunków na bazie kolagenu.

*Badania wykonane w ramach działalności statutowej IChTJ i pracy doktorskiej Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak.*

## Piśmiennictwo

1. H. Lewandowska, A. Eljaszewicz, I. Popławska et al.: *Optimization of Novel Human Acellular Dermal Dressing Sterilization for Routine Use in Clinical Practice*, Int. J. Mol. Sci, 22(8467), 2021, 2-17.
2. R. Singh, D. Singh, A. Singh: *Radiation sterilization of tissue allografts: A review*. World J Radiol., 8(4), 2016, 355-369.
3. W. Głuszewski: *Unikatowe cechy radiacyjnej sterylizacji i higienizacji*, Inżynier i Fizyk Medyczny, 2 (10), 2021, 99-102.
4. M. Nowacka: *Etyka Transplantacji*, Bioetyka, Wolters Kluwer, 2013, 220-232.
5. Xu. Songcheng, Min Gu, Kun Wu\*, Li Guoying: *Unraveling the Role of Hydroxyproline in Maintaining the Thermal Stability of the Collagen Triple Helix Structure Using Simulation*, J. Phys. Chem. B, 123, 36, 2019, 7754-7763.
6. R. Holmes, S. Kirk, G. Tronci, X. Yang, D. Wood: *Influence of telepeptides on the structural and physical properties of polymeric and monomeric acid-soluble type I collagen*, Mater. Sci. Eng. C, 77, 2017, 823-827.
7. M.D Shoulders, R.T Raines: *Collagen structure and stability*, Annu Rev Biochem, 78, 2009, 929-58.
8. S. Nomura, A. Hiltner, J.B. Lando, E. Baer: *Interaction of water with native collagen*, Biopolymers, 16(2), 1977, 231-246.
9. K. Pietrucha: *Wpływ promieniowania jonizującego na skóry surowe i kolagen. Cz. III. Skutki oddziaływania promieniowania jonizującego na kolagen*, Przegląd Skórzany, 6, 1975, 182.
10. G.J. Smith: *New trends in photobiology. Photodegradation of keratin and other structural proteins*, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 1995, 27, 187-198.
11. J. Gaar, R. Naffac, M. Brimble: *Enzymatic and non-enzymatic crosslinks found in collagen and elastin and their chemical synthesis*, Org. Chem. Front. 7, 2020, 2789-2814.
12. S.Y. Ko, H.A. Ko, K.H. Chu, T.M. Shieh, T.C. Chi, H.I. Chen, W.C. Chang, S.S. Chang: *The possible mechanism of advanced glycation end products (ages) for Alzheimer's disease*, PLOS One, 10, 2015, e0143345.
13. T.R. Einarson, A. Acs, C. Ludwig, U.H. Panton: *Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: A systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017*, Cardiovasc. Diabetol, 17, 2018, 83.
14. A. Dziedzic-Gocławska, A. Kaminski, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, W. Stachowicz: *Irradiation as a safety procedure in tissue banking*, Cell Tissue Bank., 6(3), 2005, 201-219.
15. M. Gauza-Włodarczyk, L. Kubisz, D. Włodarczyk: *Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects*, Int. J. Biol. Macromol, 104, 2017, 987-991.
16. A. Cucos, P. Budrugaec: *Simultaneous TG/DTG-DSC-FTIR characterization of collagen in inert and oxidative atmospheres*, J. Therm. Anal. Calorim, 115, 2014, 2079-2087.
17. M. Schroepfer, M. Meyer: *DSC investigation of bovine hide collagen at varying degrees of crosslinking and humidities*, Int. J. Biol. Macromol, 103, 2017, 120-128.
18. E. Badea, T. Usacheva, G. Della Gatta: *The use of differential scanning calorimetry to characterise collagen deterioration in parchment*, Рос. хим. ж, 59, 2015, 28-45.
19. P. Budrugaec, E. Badea, G. Della Gatta, L. Miu, A. Comănescu: *A DSC study of deterioration caused by environmental chemical pollutants to parchment, a collagen-based material*, Thermochim. Acta, 500, 2010, 51-62.
20. J.R. Whitaker, P.E. Granum: *An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm*, Anal. Biochem, 109, 1980, 156-159.
21. A. Eljaszewicz, M. Moniuszko i in.: *Rare Diseases*, [Working Title]. Ed. Mani T. Valarmathi, London: Intechopen, 2021.
22. L. Mohee et al.: *Investigation of the intrinsic permeability of ice-templated collagen scaffolds as a function of their structural and mechanical properties*, Acta Biomater, 83, 2019, 189-198.
23. M.R. Fontanilla, H.C. de Sousa, E. Suesca, A.M.A. Dias, M.E.M. Braga: *Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds*, Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl, 77, 2017, 333-341.
24. L.B. Jiang et al.: *Shape-memory collagen scaffold for enhanced cartilage regeneration: native collagen versus denatured collagen*, Osteoarthr. Cartil, 26, 2018, 1389-1399.