

PRACE ORYGINALNE

Maria GROLIK¹
 Maciej KOPEĆ¹
 Krzysztof SZCZUBIAŁKA¹
 Bogumił WOWRA²
 Dariusz DOBROWOLSKI²
 Edward WYLĘGAŁA²
 Maria NOWAKOWSKA¹

Regeneracja nabłonka rogówki przy zastosowaniu membran chitozanowych modyfikowanych keratyną

Regeneration of corneal epithelium using keratin modified chitosan membranes

¹Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
 p.o.: prof. dr hab. *Marii Nowakowskiej*
 Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński,
 Ingardena 3, 30-060 Kraków
 +4812 6632020,
 grolikm@chemia.uj.edu.pl, s
 zczubia@chemia.uj.edu.pl

²Oddział Okulistyki
 Okręgowego Szpitala Kolejowego
 w Katowicach
 p.o: prof. dr n. med. *Edwarda Wylęgały*
 Panewnicka 65, 40-760 Katowice

Dodatkowe słowa kluczowe:

membrana
 rogówka
 chitozan
 keratyna
 genipina
 inżynieria tkankowa

Additional key words:

membrane
 cornea
 chitosan
 keratin
 genipin
 tissue engineering

Rogówka jest pierwszym i najsilniej załamującym światło elementem układu optycznego oka, odpowiedzialnym za ponad 2/3 całkowitej mocy optycznej. Histologicznie składa się z 5 warstw o różnej grubości, z których najbardziej zewnętrzną stanowi nabłonek rogówki. Jest to struktura zbudowana z komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Chroni ona oko przed zakażeniami oraz uszkodzeniami jego głębszych struktur.

Uszkodzenia nabłonka rogówki mogą prowadzić nawet do utraty wzroku na skutek uszkodzenia komórek odpowiadających za regenerację nabłonka zlokalizowanych w obwodowej, rąbkowej strefie rogówki. Stan ten nazywany niewydolnością rąbkowych komórek macierzystych prowadzi do unaczynienia rogówki, pokrycia jej spojówką i utraty przezroczystości zrębu. Niejednokrotnie, w przypadku znacznych uszkodzeń koniecznym jest przeszczep rąbka rogówki. Istotnym czynnikiem ograniczającym przeprowadzanie tej procedury na szerszą skalę jest brak odpowiedniej liczby dawców. Alternatywnym rozwiązaniem jest przeszczep autologiczny z wykorzystaniem namnożonych *ex vivo*, na odpowiednich podłożach (rusztowaniach) komórek nabłonka rogówki samego pacjenta.

Celem badań opisanych w niniejszej pracy było otrzymanie polimerowych podłoży komórkowych w formie membran, przeznaczonych do hodowli komórek nabłonkowych. Głównym składnikiem otrzymanych podłoży jest chitozan - biozgodny, biodegradowalny, łatwo dostępny oraz stosunkowo tani polisacharyd pochodzenia naturalnego, usieciowany za pomocą genipiny – naturalnego związku pozyskiwanego z owoców gardenii jaśminowatej. Wiadomo, że membrany powinny spełniać szereg wymagań, wśród których najważniejsze to: biokompatybilność, biodegradowalność i wysoka wytrzymałość mechaniczna. W celu optymalizacji właściwości membran wprowadzono do nich keratynę, białko o budowie fibrylarnej. Przepro-

The cornea is a transparent front layer of the eye. It functions like a window that controls and focuses the light entering into the eye. The cornea contributes to 65-75% of the eye's total focusing power and it acts as a physical barrier against pathogenic microorganisms, dirt and other noxious physical factors. The corneal tissue is arranged in five basic layers. The outermost layer (epithelium) is made up of highly regenerative cells that allow for quick healing of superficial injuries.

Eye infections, diseases, or mechanical injury can harm corneal epithelium and cause blindness. Under certain circumstances, to prevent that, it is recommended to perform complete corneal transplantation. However, due to lack of sufficient number of donors, researchers are searching for alternative solutions. . Regeneration of epidermal tissue can restore and ensure normal functioning of cornea. For that purpose proper grafts are needed. The goal of current research was to develop the material for scaffold preparation providing optimal conditions for the epithelium cornea cell culturing and to determine its chemical, physical, and biological properties. The scaffolds, which could be applied in ophthalmology should fulfill a lot of requirements, among them such as biocompatibility, biodegradability, restorability, non-toxicity. They should also have adequate mechanical strength, flexibility and porosity.

The aim of this work was to synthesize and to determine the properties of polymeric material for ophthalmic surgery applications. A hydrogel scaffold in the form of membrane was obtained from chitosan – natural, biocompatible, biologically inert, stable in the natural environmental and antibacterial polysaccharide derived from chitin. Biodegradable chitosan films containing keratin were crosslinked with genipin – a naturally occurring and nontoxic agent.

In this study we present physicochemical characterization of the

Adres do korespondencji:
 Mgr Maria Grolik
 Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
 Wydział Chemii Uniwersytet Jagielloński
 Ingardena 3
 30-060 Kraków
 Tel. +4812 6632020,
 e-mail: grolikm@chemia.uj.edu.pl

wadzone analizę morfologiczną membran oraz zależność topografii ich powierzchni od składu. Wyznaczono stopień spęcznienia, kąt zwilżania układów oraz przeprowadzono hodowle komórek nabłonkowych.

scaffolds. Porosity, contact angle and swelling ratio (at different pH) were determined. The optical microscope technique was used to visualize the microstructure of the scaffolds. Atomic force microscopy (AFM) measurements revealed the topography of the surfaces of membranes. The biological tests have shown that epithelial cells seeded on the membranes proliferated efficiently.

Wprowadzenie

Zmysł wzroku odgrywa w życiu człowieka dominującą rolę. Aż 80% wszystkich wrażeń i doznań dociera do nas poprzez narząd wzroku [14]. Oko jako organ receptorowy umożliwiający widzenie można uznać za układ optyczny działający na zasadzie soczewki skupiającej. Jego przednią część pokrywa przezroczysta, beznaczyniowa struktura o elipsoidalnym kształcie – rogówka, która z czynnościowego punktu widzenia jest pierwszym i najważniejszym elementem optycznym układu wzrokowego. Stanowi ona bowiem 1/6 przedniej części błony włóknistej gałki ocznej. Dodatkowo należy do wyjątkowo wrażliwych tkanek, gdyż jest bogato unerwiona czuciowo (reaguje bólem lub łzawieniem na dotyk lub ciała obce występujące na jej powierzchni). Głównym zadaniem rogówki jest ochrona wnętrza oka oraz przepuszczanie i załamywanie promieni świetlnych. Nie jest ona unaczyniona, a odżywia się tylko dzięki dyfuzji – przez żyły oraz ciecz wodnistą gałki ocznej [14,19].

Histologicznie składa się z pięciu warstw (Ryc. 1) z których najbardziej zewnętrzną jest nabłonek złożony z 5-7 regularnie ułożonych warstw [7].

Wymiana komórek warstwy nabłonkowej rogówki zachodzi w ciągu 7 dni, a jej ubytki potrafią zabić się już po kilku/kilkunastu godzinach [19].

Chora rogówka o zmniejszonej przezroczystości lub zmienionym kształcie przestaje być precyzyjnym instrumentem optycznym, a staje się przeszkodą dla promieni świetlnych docierających do wnętrza oka. Przyczyną tego stanu rzeczy może być niewydolność rąbkowych komórek macierzystych nabłonka rogówki zlokalizowanych w obwodowej części rogówki (tzw. rąbku rogówki) w warstwie podstawowej nabłonka rogówki [5,8,10]. Uważa się, że komórki te mogą regenerować strukturę rogówki nawet przez 100 - 120 lat, a więc dłużej niż wynosi średnia długość życia człowieka [15,16]. Choroby genetyczne, oparzenia, stany zapalne oraz uszkodzenia

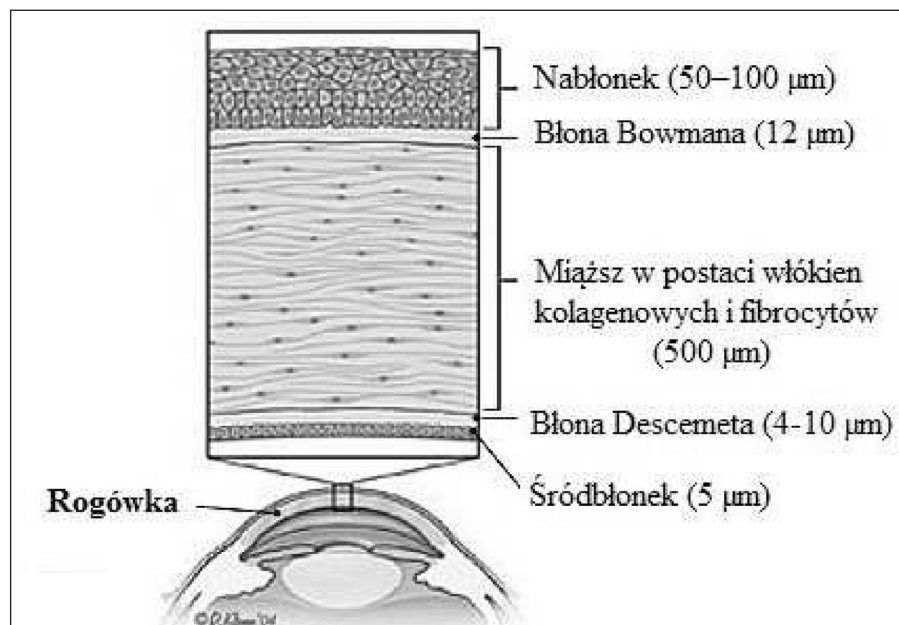
mechaniczne rogówki mogą prowadzić do uszkodzeń rąbkowych komórek macierzystych. Szacuje się, że obecnie już ponad 10 milionów ludzi na świecie cierpi z powodu problemów związanych ze złą kondycją rogówki, które są drugą co do częstości (po zaćmie) przyczyną ślepoty na świecie [10,22].

Zagadnienie hodowli komórek nabłonka rogówki oka jest bardzo istotne ze względu na niewystarczającą ilość dostępnych tkanek. Obecnie na terenie kraju znajdują się 4 banki oczne (Lublin, Warszawa, Sosnowiec, Katowice). Aby zaspokoić popyt na tego typu tkanki należałoby utworzyć we wszystkich regionach Polski sieć szpitali pozyskujących rogówki do przeszczepów, co ze względów finansowych jest trudne do realizacji. W tej chwili na przeszczep rogówki oczekuje się około 15 miesięcy. Jednakże nie we wszystkich przypadkach chorób czy urazów powierzchni oka konieczna jest transplantacja całej tkanki. Szybka pomoc lekarza okulisty może uratować rogówkę dzięki wykorzystaniu stosunkowo nowej metody leczenia, jaką jest przeszczep nabłonka komórek rogówki z wykorzystaniem błony owodniowej. Metoda ta polega na hodowli *ex vivo* rąbkowych komórek macierzystych nabłonka rogówki lub nabłonka błony śluzowej jamy ustnej (zbliżony fenotyp do nabłonka rogówki) na błonie owodniowej, a następnie wszczępieniu jej (wraz z wyhodowanymi komórkami) w miejsce ubytku [2,3]. Zabieg ten może przyczynić się do zrekonstruowania powierzchni rogówki. Niestety koszt pozyskania błony owodniowej jest na tyle istotny, że wraz z kosztami samej hodowli skutecznie ogranicza liczbę przeprowadzanych zabiegów.

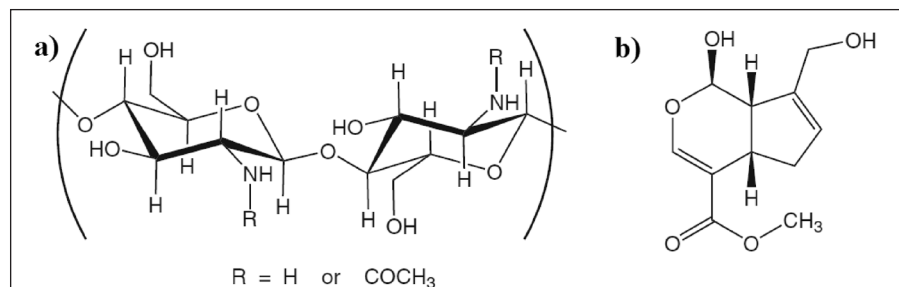
Zsyntetyzowanie materiału będącego łatwo dostępnym, tanim, a zarazem skutecznym zamiennikiem błony owodniowej jest kluczowe dla zwiększenia liczby zabiegów na rogówce. Badania opisane w niniejszej pracy zmierzają do opracowania nowego typu podłoża hodowlanych dla komórek nabłonka rogówki gałki ocznej zawierającego macierzyste komórki rąbkowe. Podłoża te mogłyby być wykorzystywane jako alternatywa dla materiałów stosowanych obecnie. Uzyskany materiał ma pełnić rolę tymczasowej błony podstawnej, dlatego powinien on wykazywać odpowiednią wytrzymałość mechaniczną, pełną resorbowalność oraz brak efektu prozapalnego.

Materiały

Nowe, wykazujące zdolność do ulegania całkowitej biodegradacji podłoża polimerowe przeznaczone do hodowli nabłonka rogówki zawierającego komórki rąbkowe zostały uzyskane na bazie chitozanu – liniowego polimeru pochodzenia naturalnego. Chitozan (poli(2-deoksy-2-aminoglukozę)) to polisacharyd, będący pochodną chityny. Jest nietoksyczny, cechuje się doskonałą sorpcyjnością, posiada zdolność adsorbowania ujemnie naładowanych substancji oraz oddziałuje z powierzchnią



Rycina 1
Budowa anatomiczna rogówki oka [9].
Anatomy of the cornea [9].



Rycina 2
Struktura a) chitozanu, b) genipiny [4].
Structures of a) chitosan, b) genipin [4].

Tabela I

Skład membran Ch-Ker-Gp.

The components of Ch-Ker-Gp membranes.

| Składnik | Ch-7%Ker-Gp | Ch-17%Ker-Gp |
|-------------------------|-------------|--------------|
| 1,4 % w/v r-r chitozanu | 2,5 ml | 2,5 ml |
| 5 % w/v r-r genipiny | 40 µl | 40 µl |
| 6% w/v r-r keratyny | 40 µl | 100 µl |

blon komórkowych, co czyni go dobrym substytutem blon podstawnych. Chitozan posiada również szereg innych właściwości, np. obniża ciśnienie krwi i pomaga zwalczać arteriosklerozę (miażdżycę), poprawia mikrocyrkulację tkanek, likwidując skurcze naczyń szczególnie włosowatych [1,6,11].

W celu zwiększenia wytrzymałości mechanicznej rusztowania chitozanowego sieciuje się go zwykle za pomocą aldehydu glutarowego, glikolu etylenowego, eteru diglicydylowego czy diizocyanianów [12]. Jednakże substancje te są wysoce toksyczne i mogą one negatywnie wpływać na biokompatybilność otrzymanych membran polimerowych. Dlatego w niniejszej pracy zdecydowano się na zastąpienie ich genipiną - naturalną i nietoksyczną substancją pozyskiwaną z owoców gardenii jaśminowatej [13], która, jak donosi literatura, pozwala uzyskać materiały o podobnej wytrzymałości do materiałów sieciowanych w/w związkami [21].

Ponieważ, jak wspomniano, membrany polimerowe mają pełnić rolę tymczasowej błony podstawnej, dlatego też stawiane są im duże wymagania. Podłoże musi wykazywać całkowitą biodegradowalność, minimalną grubość, a także odpowiednią wytrzymałość mechaniczną. Celem poprawy właściwości mechanicznych do układu chitozan-genipina wprowadzono keratynę - białko włókniste, naturalnie występujące w organizmie człowieka.

Chitozan o niskiej masie cząsteczkowej (Ch) zakupiono w firmie Sigma Aldrich. Stopień deacetylacji, wyznaczony na podstawie analizy elementarnej, wynosił 77%. Genipina (Gp) o czystości w wysokości 98% została zakupiona w firmie Challenge Bioproducts Co. Roztwór keratyny (6% w/v, Ker) pochodzącej z kopyt bydłych uzyskano z firmy Croda. Wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4), wodorooctofosforan (V) potasu (KH_2PO_4), kwas solny, alkohol etylowy zakupiono w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne (Gliwice, Polska). 10-ciowodny czeroboran sodu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) uzyskano z firmy Fluka. Chlorek sodu pozyskano z firmy Lach: Ner. Kwas borowy nabyto w firmie Sigma- Aldrich. Wszystkie odczynniki były stosowane bez dodatkowego oczyszczania. W badaniach wykorzystano wodę zdejonizowaną.

Preparatyka

Przezroczysty roztwór chitozanu w kolorze słomkowym (Ch, 2% w/v) przygotowano przez rozpuszczenie 0,8g Ch w formie proszku w 40 mL 0,1 M kwasu solnego. Genipinę (Gp, 5% m/v) sporządzono poprzez rozpuszczenie 0,1g Gp w formie proszku w 2 ml 70% v/v etanolu. Keratyna (Ker) wykorzystywana w badaniach była zakupiona w postaci wodnego roztworu.

Podłoże komórkowe w postaci chitozanowej membrany wzbogaconej keratyną uzyskano w wyniku homogenizacji 2,5 mL czystego 2% w/v roztworu Ch oraz odpowiednio 40 µL lub 100 µL roztworu Ker z 40 µL roztworu Gp. Homogenizację przeprowadzono poprzez worteksowanie przez 45s w temperaturze pokojowej. Tak uzyskane zole przenoszono do plastikowych szalek Petriego o średnicy 60 mm, a następnie umieszczano na 48 h w temperaturze 45°C.

Podczas ogrzewania słomkowy zol zmienił barwę na ciemnoniebieską (nie tracąc przy tym przezroczystości) w wyniku reakcji sieciowania grup $-\text{NH}_2$ pochodzących od Ch przez Gp.

Na podstawie Tabela I określono zawartość wagową Ker w membranach. Wynosiła ona odpowiednio 7% w/w (Ch-7% Ker-Gp) oraz 17% w/w (Ch-17% Ker-Gp).

Metody

Pomiar kąta zwilżania

Hydrofobowość materiału określano za pomocą pomiaru kąta zwilżania wodą powierzchni badanych filmów. Kąt zwilżania wyznaczany był za pomocą aparatury Surfents Universal (OEG GmbH, Frankfurt, Niemcy).

Pomiary zwilżalności przeprowadzono w temperaturze pokojowej wykorzystując metodę swobodnie spadającej kropli. Wartość kąta wyznaczana była bezpośrednio po spuszczeniu kropli na membranę, ale przed jej wchłonięciem. Uzyskana wartość jest średnią arytmetyczną z 10 pomiarów wykonanych w różnych miejscach membrany.

Pomiary spęcznienia

Spęcznienie Ch-Ker-Gp membran polegające na samorzutnym wchłanianiu przez materiał cieczy będącej z nim w kontakcie oparty był na pomiarze swobodnego stopnia spęcznienia mierzonego w procentach. Wykorzystywanymi do badań roztworami były bufor fosforanowy oraz boranowy o różnym pH (6,0, 7,4, oraz 9,0). Suche membrany o średnicy 60 mm były wstępnie ważone (W_0), a następnie zanurzone w 10 mL cieczy o odpowiednim pH. Po 24 h spęczniałe membrany ważono ponownie (W_s) poczym wyznaczano wartość stopnia spęcznienia (S) na podstawie wzoru:

$$S = \frac{W_s - W_0}{W_0} \cdot 100\%$$

Uzyskana wartość jest średnią z 3 powtórzeń wykonanych w temperaturze pokojowej.

Mikroskopia optyczna

Do zobrazowania morfologii powierzchni suchych membran wykorzystano mikroskop optyczny Nikon Eclipse LV 1000. Obrazy uzyskano stosując powiększenie x10.

Mikroskopia sił atomowych (AFM)

W celu potwierdzenia i określenia stopnia porowatości badanych membran przeprowadzono analizę powierzchni z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych (Atomic Force Microscope, AFM). Badania przeprowadzone w trybie kontaktowym pracy mikroskopu, w atmosferze powietrza pozwoliły na wyznaczenie średniej wartości nierówności powierzchni (RMS).

Wytrzymałość mechaniczna

Testy wytrzymałości mechanicznej suchych membran chitozanowo - keratynowych przeprowadzono na w pełni skomputeryzowanej uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 (Zwick GmbH & Co, Ulm, Niemcy). Prostokątne próbki o średnicy 50 x 5mm umieszczane były w szczękach maszyny wytrzymałościowej, a następnie rozciągane ze stałą prędkością 10 mm/min.

Badania biologiczne

Oceny biogodności uzyskanych membran dokonano w oparciu o hodowle nabłonkowych komórek jamy ustnej. Badania przeprowadzono na Śląskim Uniwersytecie Medycznym zgodnie z uzyskaną zgodą Komisji Bioetycznej (numer umowy: NN-6501-184/I/05/06).

Hodowle komórkowe z wykorzystaniem membran Ch-Ker-Gp przeprowadzono w sposób następujący. Komórki nabłonkowe (2 mm²) pobierane były w znieczuleniu miejscowym od zdrowego dawcy, a następnie w płynie transportowym wysyłane do pracowni hodowli komórkowej. Tak uzyskane komórki poddawane były trypsynizacji (0,1% trypsyny i 0,01% EDTA przez 10 min) w celu uzyskania zawiesiny komórek. Zawiesina (w ilości 2 - 4 x 10⁴ komórek na ml) podana została na 6-dołkowe płytki hodowlane w ilości 2ml na dołek. Medium stanowiła wzbogacona mieszanina pożywki DMEM i HAMs F12 w stosunku 1:1. Inkubacja odbywała się w temperaturze 37°C w mieszaninie gazów: 5% CO₂ i 95% powietrza. Wymiana medium odbywała się co 48 godzin.

Badania histologiczne membran obejmowały barwienie w kierunku cytokeratyn K3 i K19 oraz białka p63. Obecność w kolonii komórek nabłonka rogówki (K3 - pozytywne) wraz z obecnymi komórkami macierzystymi (p63 - pozytywne, czyli o dużym potencjale mitotycznym) pozwalało zakwalifikować materiał do przeszczepu komórek macierzystych nabłonka. W tym celu membrany z nahodowanymi warstwami komórkowymi poddano utrwaleniu w 10% roztworze buforowanej formaliny (4% roztwór wodny aldehydu mrówkowego z buforem fosforanowym o pH = 7.2) przez noc w temperaturze 4°C. Następnie próbki odwodniono w szeregu roztworów alkoholu (10 - 20 - 50 - 95 - 100% etanolu) i zalano płynną parafiną. Tak utrwalone poddawano barwieniu z użyciem szeregu przeciwciał. Analiza miała charakter jakościowy.

Wyniki i omówienie

Przedstawione badania prowadziły do uzyskania membran **polimerowych** wykazujących korzystne właściwości fizykochemiczne oraz zadowalające właściwości mechaniczne. Membrany uzyskano poprzez usieciowanie chitozanu genipiną, naturalną, nietoksyczną substancją pozyskiwaną z owoców gardenii oraz wzmocnienie ich struktury dodatkiem fibrylarnego białka - keratyny.

Przeprowadzono szereg badań fizykochemicznych uzyskanych podłoży, zoptymalizowano ich skład oraz określono parametry niezbędne do ich klinicznego

zastosowania.

Badania rozpoczęto od określenia charakteru powierzchni membrany wykorzystując techniki pomiaru kąta zwilżania, określono stopień spęcznienia membran. Następnie zobrazowano morfologię powierzchni wykorzystując do tego techniki mikroskopowe (optycznej, AFM) oraz wyznaczono podstawowe parametry wytrzymałościowe. Kluczowym punktem badań były badania biologiczne *in vitro* przeprowadzone na komórkach nabłonkowych.

Pomiar kąta zwilżania

Jedną z właściwości fizykochemicznych decydujących o jakości materiału i jego przydatności w inżynierii tkankowej jest jego zwilżalność. Stopień zwilżania określany jest na podstawie wielkości kąta zwilżania. Hydrofobowość powierzchni w przypadku materiałów przeznaczonych na nośniki komórkowe jest szczególnie ważna, gdyż znacząco wpływa na jakość adhezji komórek i szybkość ich proliferacji. Przyjmuje się, że przyleganie komórek do powierzchni jest silniejsze, gdy materiał wykazuje umiarkowany stopień hydrofilowości. Wynika to z silniejszych oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi znajdującymi się na powierzchni membrany a komórkami. W pracy przedstawiono metodę pomiaru kąta zwilżania wodą na granicy ciecz – membrana. Uzyskane wyniki zebrano w Tabeli II.

Wartości kąta zwilżania w przypadku obu membran są porównywalne i świadczą o umiarkowanej hydrofilowości membran polimerowych. Jak widać różna zawartość keratyny nie wpływa zasadniczo na charakter powierzchni.

Pomiary spęcznienia

Stopień spęcznienia membrany (w procentach) mówi o względnej ilości pochło-

Tabela II

Średnia wartość kąta zwilżania badanych membran Ch-Ker-Gp.

Water contact angle values for the studied membranes Ch-Ker-Gp.

| Membrana | Kąt zwilżania [°] |
|--------------|-------------------|
| Ch-7%Ker-Gp | 65 ± 9 |
| Ch-17%Ker-Gp | 64 ± 5 |

Tabela III

Wartości stopnia spęcznienia (S) badanych membran w różnym pH.

Swelling ratios, S(%), of the membranes at various pH values determined after 24 h of equilibration.

| pH | Ch-7%Ker-Gp [%] | Ch-17%Ker-Gp [%] |
|-----|-----------------|------------------|
| 6 | 1150 | 880 |
| 7,4 | 656 | 441 |
| 9 | 605 | 360 |

Tabela IV

Średnia kwadratowa chropowatość badanych membran chitozanowo-keratynowych.

Values of the RMS roughness (nm) of the studied membranes.

| Membrana | RMS [nm] |
|--------------|----------|
| Ch-7%Ker-Gp | 73,9 |
| Ch-17%Ker-Gp | 41,8 |

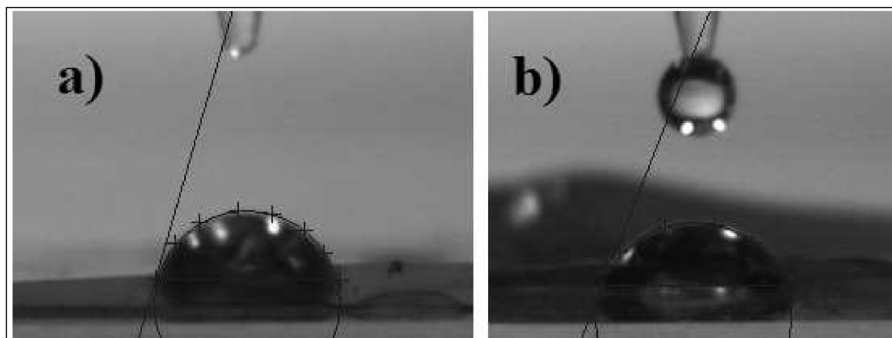
niętej przez polimer cieczy. Podczas badań obserwowano szybki początkowy wzrost masy membrany zanurzonej w roztworze PBS, a następnie osiągnięcie równowagi w ciągu pierwszych 10 godzin od zanurzenia. Uzyskane wartości zestawiono w Tabeli III.

Badane membrany wykazują znaczną zdolność do pęcznienia. Zauważono, że stopień spęcznienia membran wzrasta wraz z obniżeniem wartości pH. Fakt ten można tłumaczyć zjawiskiem protonowania

wolnych grup aminowych należących do chitozanu w wyniku czego jednoimiennie naładowane łańcuchy odpychają się, co skutkuje wzrostem objętości hydrożelu. Dodatkowo na wielkość pęcznienia membran silnie wpływa zawartość keratyny. Stwierdzono niższą wartość pęcznienia dla membrany o wyższej zawartości keratyny (Ch-17% Ker-Gp).

Mikroskopia optyczna

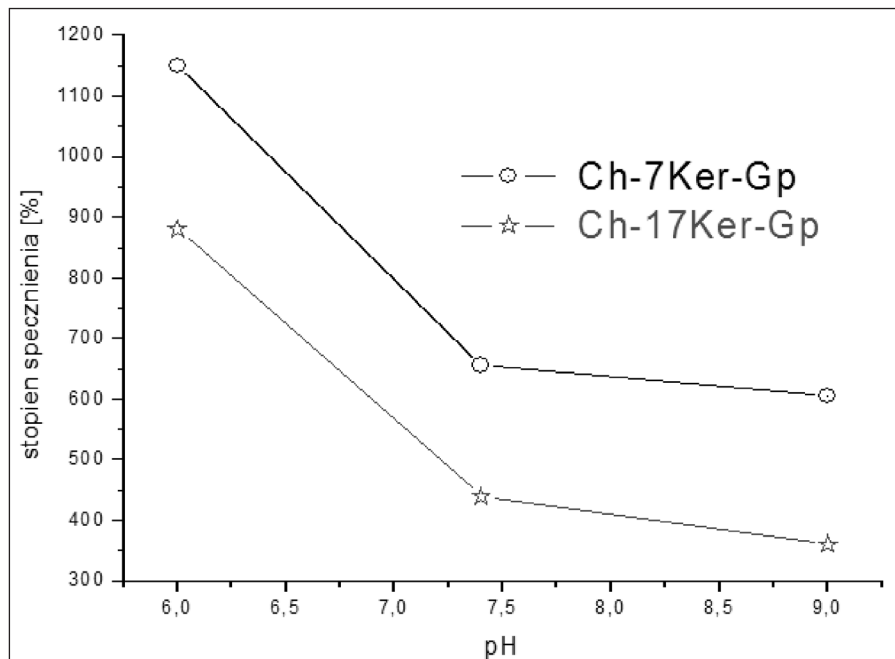
Do wstępnego zobrazowania powierzch-



Rycina 3

Pomiar kąta zwilżania a) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp.

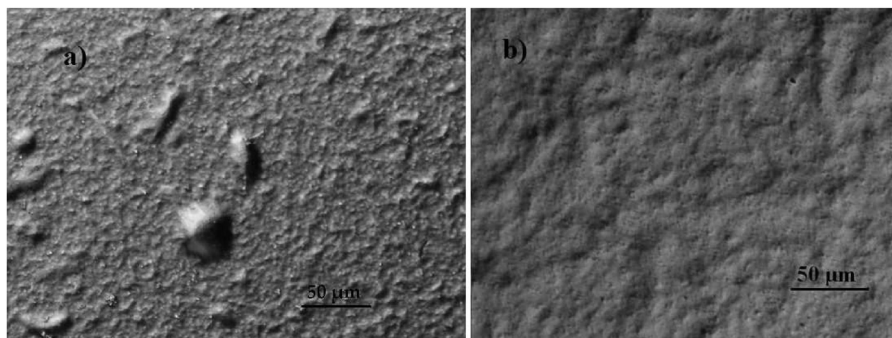
Measurement of contact angle of the membranes a) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp.



Rycina 4

Zmiana stopnia spęcznienia w zależności od wartości pH.

Graph of the changes in the swelling ratio the membranes at different pH.



Rycina 5

Zmiana porowatości membran chitozanowych wynikająca ze zmiany stężenia zawartości keratyny a) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp. Powiększenie 10x. Temperatura pokojowa.

The optical microscopic images of the surface of the dry membranes) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp. Magnification: 10x. Room temperature.

ni nośników komórkowych otrzymanych z usieciowanego genipiny chitozanu modyfikowanego keratyną użyto mikroskopii optycznej w świetle odbitym. Morfologia powierzchni polimerowej membrany, a szczególnie jej chropowatość (szorstkość) może znacznie wpłynąć na proces proliferacji komórek [18]. Badania wykazały różną morfologię powierzchni membran o różnych składach (Rys 5).

Analiza zdjęć wykazała, że membrana Ch-7%Ker-Gp (o mniejszej zawartości keratyny) cechuje się większą chropowatością. Na jej powierzchni obserwuje się liczne krótkie włókna - co sugeruje, że zmieniając zawartość keratyny w membranie można modyfikować morfologię powierzchni.

Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Badania przy użyciu AFM pozwoliły na zobrazowanie topografii membran oraz ilościowe określenie szorstkości uzyskanych membran chitozanowych modyfikowanych keratyną. Poniżej zestawiono zdjęcia 3D uzyskane w procesie obrazowania (Ryc. 6) a w Tabeli IV zebrano średnią wartość

szorstkości RMS obu polimerowych membran.

Zdjęcia potwierdzają obserwacje przeprowadzane za pomocą mikroskopii optycznej. Membrana Ch-7%Ker-Gp wyróżnia się znaczną chropowatością, a średnia wartość chropowatości (root mean square, RMS) jest prawie dwukrotnie większa niż membrany Ch-17%Ker-Gp.

Wytrzymałość mechaniczna

Dokonano także oceny wytrzymałości mechanicznej membran chitozanowo – keratynowych. Wyznaczono wartość wytrzymałości na rozciąganie, moduł Younga i odkształcenie przy zrywaniu. Ze względu na postać materiału membrany poddawane były poddane rozciąganiu. Uzyskane wyniki umieszczono w Tabeli V.

Problem wytrzymałości membran przeznaczonych do hodowli komórek nabłonka rogówki nie należy do trywialnych. Z jednej strony membrany muszą wykazywać odpowiednią wytrzymałość mechaniczną, pozwalającą na prowadzenie ponad 2 tygodniowej hodowli komórkowej i zabiegu transplantacyjnego, polegającego

na przysyciu membrany wraz z namnożonymi komórkami do powierzchni oka za pomocą nici nylonowych. Z drugiej strony, jednym z podstawowych wymagań stawianych tego typu materiałom jest ich całkowita biodegradacja po odpowiednim, niezbyt długim, okresie czasu. Dlatego też skład i forma membrany jest wynikiem kompromisu między jego właściwościami mechanicznymi a zdolnością do biodegradacji.

W celu wzmocnienia mechanicznego membran użyto fibrylarnego białka – keratyny. Jednakże jak pokazują przeprowadzone badania zbyt duże jej stężenie w układzie powoduje całkiem odwrotny skutek – wytrzymałość mechaniczna zostaje obniżona. Warto jednak zaznaczyć, że wytrzymałość otrzymanych membran polimerowych jest i tak znacznie wyższa niż wytrzymałość naturalnej błony owodniowej (2,3 MPa) [17].

Badania biologiczne

Z aplikacyjnego punktu widzenia, badania biologiczne otrzymanych membran polimerowych mają znaczenie kluczowe.. Testy biologiczne pozwalają na wstępne zweryfikowanie biogodności i wytrzymałości podłoża. Zdjęcia membran po utrwaleniu pokazano na zdjęciu (Ryc. 7) wykorzystując przy tym mikroskopię optyczną.

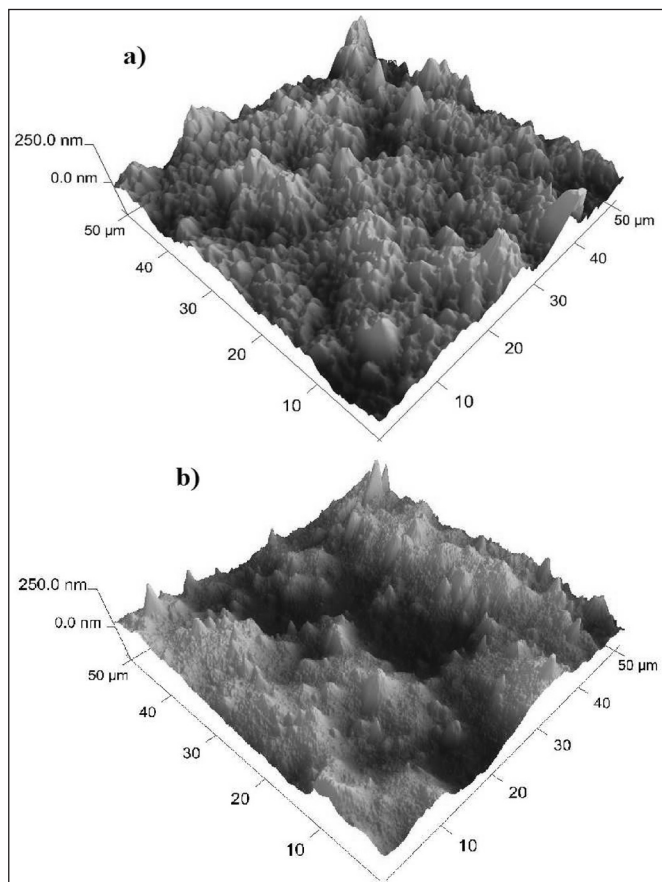
Obserwuje się regularny, warstwowy wzrost zdrowych komórek nabłonkowych. Komórki przylegają stosunkowo luźno do powierzchni niemniej jednak uzyskane rezultaty wydają się być obiecujące. Planowane są dalsze badania w celu ustale-

Tabela V

Wartości wytrzymałości mechanicznej na rozciąganie, wydłużenie przy zerwaniu oraz moduł Younga dla membran Ch-Ker-Gp.

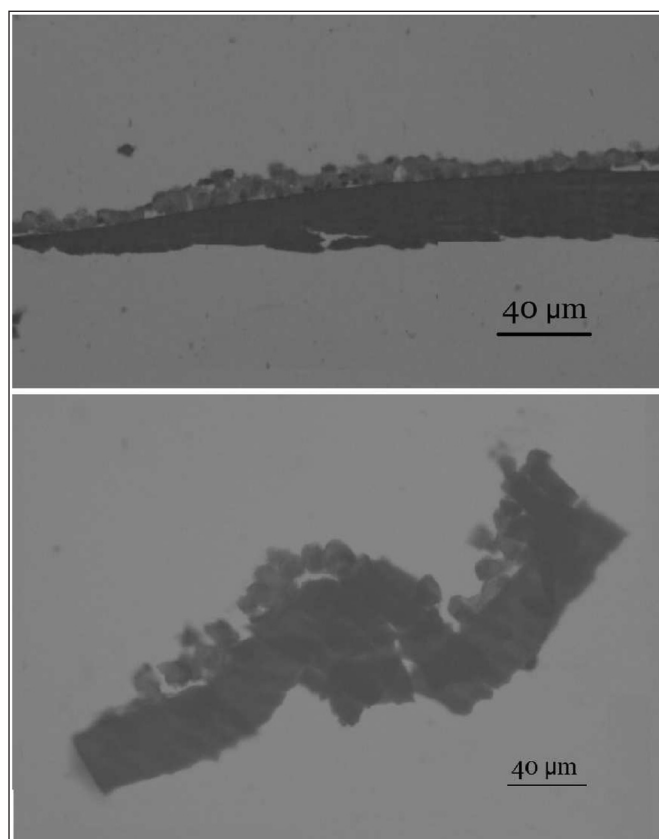
Values of tensile strength, elongation at break, and Young's modulus of the Ch-Ker-Gp membranes .

| Membrana | Siła zrywająca [MPa] | Wydłużenie [%] | Moduł Younga [GPa] |
|--------------|----------------------|----------------|--------------------|
| Ch-7%Ker-Gp | 55,85 ± 2,16 | 1,45 ± 0,22 | 4,78 ± 1,14 |
| Ch-17%Ker-Gp | 49,29 ± 9,26 | 1,16 ± 0,18 | 3,77 ± 0,99 |



Rycina 6
Topografia membran chitozanowo-keratynowych a) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp.

The AFM images of surface of a) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp membranes.



Rycina 7
Zdjęcia membran chitozanowych po obróbce histopatologicznej a) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp.

The histologic specimens of a) Ch-7%Ker-Gp, b) Ch-17%Ker-Gp membranes.

nia odpowiedniego składu chemicznego, morfologii i struktury powierzchni membran polimerowych, sprzyjających lepszej adhezji doń komórek nabłonka.

Wnioski

Stwierdzono, iż usieciowanie naturalnego polimeru jakim jest chitozan za pomocą genipiny – nietoksycznej substancji pozytywnie potencjalnie przydatnych jako podłoża do hodowli nabłonka rogówki gałki ocznej. Przeprowadzone badania fizykochemiczne i mechaniczne oraz test w środowisku *in vitro* wykazały, że membrany Ch-Ker-Gp posiadają bardzo korzystne właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne. Prosta, jednoetapowa synteza membran z niedrogich i łatwo dostępnych materiałów istotnie skraca czas oraz koszt wytworzenia rusztowania komórkowego.

Stwierdzono również, że czynnikiem wpływającym za morfologię oraz wytrzymałość membran chitozanowych jest dodatek keratyny. Jej zawartość w układzie może mieć znaczny wpływ na właściwości fizykochemiczne oraz mechaniczne podłoża.

Podziękowania

Badania przeprowadzono w ramach Programu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej "Team" współfinansowanego przez Europejski Funduszu Rozwoju Regionalnego,

PolyMed - TEAM/2008-2/6 oraz w ramach Projektu Badawczego Narodowego Centrum Nauki numer 2011/01/N/ST5/05544. Autorzy dziękują również dr inż. Ewie Stodolach (Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH, Kraków, Polska) za pomoc w przeprowadzeniu testów wytrzymałościowych oraz Grzegorzowi Zającowi za pomoc w preparatyce.

Piśmiennictwo

1. Biagini G., Bertani A., Muzzarelli R. et al.: Wound management with N-carboxybutyl chitosan. *Biomaterials* 1991, 12, 281.
2. Chen H.C., Chen H.L., Lai Y.L. et al.: Persistence of transplanted oral mucosal epithelial cells in human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009, 50, 4660.
3. Dobrowolski D., Wylegała E., Orzechowska-Wylegała B. i wsp.: Application of autologous cultivated corneal epithelium for corneal limbal stem cell insufficiency – short-term results. *Klin. Oczna* 2011, 10-12, 346.
4. Grolik M., Szczubińska K., Wowra B. et al.: Hydrogel membranes based on genipin-cross-linked chitosan blends for corneal epithelium tissue engineering. *J. Mater. Sci.* 2012, in press.
5. Grueterich M., Espana E., Touhami A.: Phenotypic study of a cause with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002, 109, 1547.
6. Jayakumar R., Prabakaran M. et al.: Novel Chitin and Chitosan Materials in Wound Dressing, *Biomed Eng.* 2011, 13.
7. Kenyon K.R., Tseng S.C.G.: Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989, 96, 709.
8. Kenyon K.R.: Anatomy and pathology of the ocular surface. *Int. Ophthalmol. Clin.* 1979, 19, 3.
9. Wilson S.A., Last A.: Management of Corneal Abrasions. *Am. Fam. Physician.* 2004, 70, 123.
10. Kolli S., Lako M., Figueiredo F., et al.: Loss of corneal epithelial stem cell properties in outgrowths from human limbal explants cultured on intact amniotic membrane. *Regen. Med.* 2008, 3, 329.
11. Kong M., Chen X.G., Xing K., et al.: Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 144, 51.
12. Muzzarelli R.A.A.: Chitin, Pergamon. 1977.
13. Muzzarelli R.A.A.: Genipin-crosslinked chitosan hydrogels a biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr. Polym.* 2009, 77, 1.
14. Niżankowska M.H.: Podstawy okulistyki, Wydanie II, Volumed.
15. Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O.: P63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 98, 3156.
16. Pellegrini G., Golisano O., Paterna P. et al.: Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J. Cell Biol.* 1999, 145, 769.
17. Reichl S., Borrelli M., Geerling G.: Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 2011, 32, 3375.
18. Steele J.G., Johnson G., McLean K.M., et al.: Effect of porosity and surface hydrophilicity on migration of epithelial tissue over synthetic polymer. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 50, 475.
19. Stokłosowa S.: Hodowla komórek i tkanek, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
20. Suliborski S., Sokołowski J., Górecka W.: Zjawisko adhezji. 1998, 2, 14.
21. Sung H.W., Huang R.N., Huang L.L.H. et al.: Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 42, 560.
22. Yan T., Sun R., Deng H. et al.: The morphological and biomechanical changes of keratocytes cultured on modified p (HEMA-MMA) hydrogel studied by AFM. *Scanning.* 2009, 31, 246.