



Medicinska fakulteta Maribor

ŠTUDIJA KRVNE SKLADNOSTI MODIFICIRANIH SINTETIČNIH POLIMERNIH POVRŠIN ZA VSADKE

Raziskovalna naloga

Študent: Jan Stana in Domen Stropnik

Študijski program: Univerzitetni;

Medicina

Mentor: doc. dr. Marko Jevšek

Somentorica: doc. dr. Simona Strnad

ZAHVALA

Hvala celotni ekipi Laboratorija za obdelavo in preskušanje polimernih materialov, Fakultete za strojništvo, Univerze v Mariboru za vso podporo in pomoč pri izdelavi raziskovalne naloge.

Prav tako se zahvaljujema vsem sodelavcem Laboratorija za fiziologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru za vse koristne nasvete.

Iskreno se zahvaljujema mentorju doc. dr. Marku Jevšku, dr. med., ki nama je s svojim strokovnim znanjem pomagal pri izdelavi raziskovalne naloge. Na tem mestu bi se še posebej zahvalila doc. dr. Simoni Strnad za vložen trud, angažiranost in človečnost, s katerimi naju je bodrila in naju spodbujala skozi celoten čas nastajanja te naloge. Iskrena zahvala pa gre tudi dr. Tei Indest za posredovana znanja s področja adsorpcije polisaharidov in Tanji Kos za neprecenljivo pomoč v laboratoriju.

Financiranje raziskave je podprlo Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo v sklopu projekta »*Vascular Graft Interfaces*«; *MNT ERA NET* ter Javna Agencija za raziskovalno dejavnost republike Slovenije v sklopu projekta : »*Razvoj postopkov in obdelav za izboljšanje hemokompatibilnosti polietilentereftalatnih površin; HemoPET*«; L2-0330, za kar se iskreno zahvaljujema.

Povzetek

Izhodišča

Glavni vzrok smrti v razvitem svetu predstavljajo kardiovaskularne bolezni, najpogosteje ateroskleroza. Za zdravljenje teh bolezni se najpogosteje uporablja vstavev žilnih vsadkov, pri katerih pa zaradi tvorbe krvnih strdkov in hiperplazije intime prihaja da zmanjšanja njihove prehodnosti. Te zaplete lahko zmanjšamo z izboljšanjem hemokompatibilnosti stičnih ploskev umetnih materialov.

Namen te raziskave je bil uvedba in optimizacija učinkovite metode za analizo hemokompatibilnosti različno kemijsko modificiranih polietilentereftaltnih (PET) površin. Polietilentereftalat in polisaharidi ter njihovi derivati, ki so bili uporabljeni za modifikacijo PET površin so bili izbrani zaradi njihovih obetajočih biokompatibilnih lastnosti in možnostih biomedicinskih aplikacij.

Metode

Za namen raziskave je bila uvedena in optimirana metoda merjenja prostega hemoglobina, ki je bila v preteklosti uporabljena le za vrednotenje kemično različnih površin, kot so teflon, steklo in kolagen. S predstavljen raziskavo smo želeli ugotoviti, ali je ob ustrezni optimizaciji metoda primerna tudi za razlikovanje kemično podobnih površin, kot so z različnimi polisaharidi modificirane površine polietilentereftalata. Z metodo SEM mikroskopije smo želeli dopolniti testiranje trombogenosti površin. Želeli smo opazovati, kako se trombociti v plazmi odzovejo ob stiku z obdelano površino PET folije.

Rezultati

V študiji optimiranja metode smo se posvetili preučevanju dejavnikov, za katere smo predvidevali, da imajo največji vpliv na standardno odstopanje rezultatov (vpliv pH na konformacijo hemoglobina, disperzija prostega hemoglobina v raztopini, vpliv obdelave krvi z antikoagulantni in ohlajanje krvi po njenem odvzemu). S pomočjo optimizacije metode prostega hemoglobina smo dosegli zmanjšanje odstopanja rezultatov in tako dobili evidentno razliko v trombogenosti med vzorci z nanešenimi sulfatiranimi polisaharidi in vzorci z nanešenimi nesulfatiranimi polisaharidi. S pomočjo metode SEM mikroskopije smo primerjali vzorce glede na število trombocitov na vidno polje in opazovali trombocite skozi faze aktivacije na različno obdelanih vzorcih.

Zaključki

Študija je potrdila, da testirani sulfatirani polisaharidi le malo zaostajajo v svojih protitrombogenih lastnostih za heparinom. V nasprotju s heparinom, pa te substance posedujejo tudi pozitivne lastnosti (protimikrobno delovanje in rastlinski izvor). Prav zaradi tega menimo, da je potrebno te substance vključevati v nadaljnje študije, v katerih bi izboljšali tehnike nanosov teh substanc na površine vzorcev, saj bi lahko v prihodnje predstavljale zadovoljivo nadomestilo za heparinske nanose na površinah implantatov.

Ključne besede: biomateriali, polietilenteraftalat, površinska modifikacija, hemokompatibilnost, in-vitro metoda,

Abstract

Introduction

The main causes of death in the modern world are cardiovascular diseases, mainly atherosclerosis. The treatment of choice for these diseases is mostly implantation of a vascular graft. Because of thrombus formation and hyperplasia of vascular intima the diameter of the graft narrows causing inadequate blood flow. We can reduce these complications by improving the hemocompatibility of the artificial surfaces. The purpose of this research was the introduction and optimization of an effective method for analyzing hemocompatibility of different chemically modified PET surfaces. PET and polysaccharides and their derivatives that were used for the modification of the PET surfaces were chosen based on their promising biocompatible properties and the option of biomedical application.

Methods

For the purpose of this research the hemoglobin free method was introduced and optimized. This method has already been used for the assessment of chemically different surfaces, such as Teflon, glass and collagen. In this research we wanted to optimize the method in such a way that it would be possible to differentiate chemically similar surfaces, such as PET surfaces modified with different polysaccharides. In addition, we wanted to observe the reaction of platelets in plasma when they come in contact with the modified PET surface using SEM microscopy.

Results

In the optimization of the hemoglobin free method we wanted to investigate various factors which could have an influence on the standard deviations of the measurements (the influence of pH on the conformation of hemoglobin, the dispersion of free hemoglobin in the solution, the influence of cooling of blood and using anticoagulants). We managed to reduce the standard deviation with the optimization of the hemoglobin free method and got an obvious difference in anticoagulant properties between the samples coated with sulfonated polysaccharides and the samples coated with non-sulfonated polysaccharides. We observed the number of platelets and the reaction of platelets on differently modified samples using SEM microscopy.

Conclusions

The research confirmed that sulfonated polysaharides have similar anticoagulant properties as heparin. But these substances possess, in contrast to heparin, additional properties such as vegetal origin and antimicrobial properties. Based on these facts, it should be necessary to include these substances in additional researches to improve the binding of these substances on the sample surface, because they could replace heparin coatings on vascular grafts in some years.

Key Words: Biomaterials, Poly(ethyleneterephthalate), Hemocompatibility, Surface Modification, in-vitro method

KAZALO

<u>UPORABLJENE KRATICE</u>	<u>1</u>
<u>1. UVOD.....</u>	<u>3</u>
1.1. SINTETIČNI ŽILNI VSADKI	5
1.2. INTERAKCIJE POLIMERNIH BIOMATERIALOV S KRVJO	8
1.2.1. PRIMARNA HEMOSTAZA - INTERAKCIJE Z ELEMENTI ŽILNE STENE	8
1.2.2. SEKUNDARNA HEMOSTAZA - MEHANIZEM KOAGULACIJE KRVI	11
1.3. ANTIKOAGULANTI.....	14
1.4. ALTERNATIVNI VIRI ANTIKOAGULANTOV	15
1.5. REGULATIVA IN TESTI BIOKOMPATIBILNOSTI	16
1.6. NAMEN IN HIPOTEZA	18
<u>2. EKSPERIMENTALNI DEL.....</u>	<u>20</u>
2.1. MATERIALI	20
2.1.1. PET FOLJA.....	21
2.1.2. HITOZAN IN NJEGOVI DERIVATI	22
2.1.2.1. Hitozan -sulfat.....	23
2.1.3. FUKOIDAN	23
2.1.4. HEPARIN.....	24
2.2. METODE	27
2.2.1. PRIPRAVA VZORCEV PET FOLIJ	27
2.2.1.1. Predobdelava PET folij- čiščenje in aktivacija	27
2.2.1.2. Modifikacija površine PET folij	27
2.2.2. IN-VITRO DOLOČANJE KRVNE SKLADNOSTI MATERIALA	28
2.2.2.1. Metoda določanja prostega hemoglobina	28
Optimiranje metode.....	29
Izvedba optimirane metode določanja prostega hemoglobina	30
2.2.2.2. Določanje oblike in števila trombocitov	33
2.3. REZULTATI.....	36
2.3.1. REZULTATI DOLOČANJA PROSTEGA HEMOGLOBINA	36
2.3.1.1. Rezultati optimiranja metode	36
2.3.1.2. Rezultati določanja trombogenosti različno obdelanih PET folij	37
2.3.2. REZULTATI DOLOČANJA OBLIKE IN ŠTEVILA TROMBOCITOV	41

2.4. DISKUSIJA	44
2.4.1. DOLOČANJE PROSTEGA HEMOGLOBINA	44
2.4.1.1. Optimiranje metode	44
2.4.1.2. Določanje trombogenosti različno obdelanih PET folij.....	47
2.4.2. DOLOČANJA OBLIKE IN ŠTEVILA TROMBOCITOV	50
2.5. ZAKLJUČKI	51
3. <u>LITERATURA</u>.....	53

Uporabljene kratice

PET - neobdelan polietilenteraftalat

PET-H - hidrolizirana PET folija

PET-HC - PET folija obdelana z hitozanom

PET-HCF - PET folija obdelana z hitozanom in fukoidanom

PET-HCSH - PET folija obdelana z hitozanom in sulfatiranim hitozanom

PET-HCHEP - PET folija obdelana z hitozanom in heparinom

PTFE – politetrafluoroetilen

PET-W – pleten PET žilni implantat

PET-K – tkan PET žilni implantat

PET-KC – PET žilni implantat obdelan s kolagenom

vWF – von Willebrandov faktor

GP Ib – glikoprotein IB

ADP – adenzin difosfat

AT III – antitrombin III

COX - ciklooksigenaza

PGI₂ – Prostaciklin 2

TXA₂ – tromboksan A₂

APTČ – Aktivacijski parcialni tromboplastinski čas

HCII – Calbiochem

SEM – elektronska vrstična mikroskopija

PDGF-AB – Trombocitni rastni faktor

TGF- β1 – transformirajoči rastni faktor β1

LPS - lipopolisaharid

pH – pH vrednost

pKa – vrednost pKa

T - prepustnost (transmitanca)

I - intenziteta izhodne svetlobe

I_0 - intenziteta vpadne svetlobe

A – absorbanca

ε - absorptivnost

b - dolžina svetlobne poti

C - koncentracija

1. UVOD

Glavni vzrok smrti v razvitem svetu še vedno predstavljajo kardiovaskularni zapleti. Več kot 20 % ljudi v Evropi mora zaradi kardiovaskularnih obolenj poiskati zdravniško pomoč, medtem ko smrtnost zaradi kroničnih kardiovaskularnih zapletov predstavlja 45 % vseh smrti. V Evropi se izvede preko 500 operacij na milijon prebivalcev na leto, pri katerih se uporabljajo različni umetni kardiovaskularni kirurški vsadki. Zaradi staranja populacije širom po svetu se povečuje tudi pojavnost kardiovaskularnih obolenj, posledično se tudi povečuje potreba po zdravljenju[1]. Tako evropski zdravstveni sistemi za zdravljenje kardiovaskularnih obolenj porabijo več kot 100 milijard Evrov.

Najpogostejši vzrok kardiovaskularnih bolezní je ateroskleroza, ki predstavlja kompleksni vnetni proces, pri katerem pride do akumulacije lipidov, makrofagov in proliferacije gladkih mišičnih celic v skupkih znotraj intime v velikih, ter srednje velikih koronarnih žilah epikarda. Število kardiovaskularnih zapletov je tudi zaradi staranja prebivalstva v Evropi iz leta v leto večje, s tem pa rastejo tudi potrebe po biokompatibilnih vsadkih, ki po vstavitvi ne bi povzročali zapletov.

Najpogostejša zapleta, do katerih prihaja po vstavitvi žilnih vsadkov sta tvorjenje trombov zaradi trombogenosti površine vsadka in hiperplazija intime. Zaradi teh dveh pojavov prihaja do zmanjšane prehodnosti implantiranih vsadkov[3]. Rešitev tega problema so nekateri avtorji videli v agresivni antikoagulantni zaščiti, ki pa vendarle ni mogla zavreti hiperplazije intime na vsadku kar je posledično vodilo do odpovedi le-tega[4]. Trenutno lahko zadovoljivo nadomeščamo žile velikega premera. Nasprotno pa vsadki, ki so namenjeni nadomeščanju žil majhnega premera (6 mm in manj), še vedno povzročajo številne zaplete[6][7].

Zgodovina razvoja arterijskih vsadkov se je začela v štiridesetih letih prejšnjega stoletja. V petdesetih letih prejšnjega stoletja je bilo opravljenih veliko raziskav uporabnosti sintetičnih materialov, kot so: poliamid PA (Orlon), Teflon in PET (Dacron) v žilni kirurgiji. Že takrat se je izkazalo da imata Teflon in Dacron prednost pred drugimi materiali, ki po implantaciji izgubljajo prožnostne lastnosti.

Zmanjšanje trombogenosti so v glavnem skušali doseči s povečanjem hemokompatibilnosti stičnih ploskev umetnih materialov [8]. Trombogenost je lastnost materiala, da ob stiku s krvjo povzroči tvorbo krvnih strdkov. Znane so številne metode, ki naj bi zmanjšale

trombogenost žilnih vsadkov. Mednje uvrščamo spreminjanje fizikalno-kemičnih lastnosti, obdelavo s proteini, povečevanje elektronegativnega značaja površin biomaterialov, aplikacijo antikoagulantov in antiagregacijskih snovi na površino, ter endotelizacijo površin z kultiviranimi celicami endotelija, itd [9][10]. Kljub izredno aktivnemu raziskovalnemu delu na tem področju, optimalno hemokompatibilna površina polimernega materiala še vedno ni bila razvita.

Eden od vzrokov za težave pri razvoju biomaterialov z ustreznimi hemokompatibilnimi lastnostmi so tudi težave pri izvedbi in-vitro metod določanja hemokompatibilnosti, saj še vedno ni standarda, ki bi natančno določal velikost, obliko in vrsto in-vitro sistemov. Na področju razvoja novih materialov za biomedicinsko uporabo je zato trenutno v uporabi cela vrsta najrazličnejših sistemov testiranja hemokompatibilnosti in-vitro. V večini primerov niti postopek inkubacije, niti uporabljen inkubacijski sistem nista dovolj natančno opredeljena. Zaradi izjemne kompleksnosti vplivov najrazličnejših eksperimentalnih pogojev na spremembe krvi med in-vitro testi, je primerjava rezultatov, dobljenih na osnovi različnih sistemov določanja hemokompatibilnosti z različnimi postopki inkubacije, dvomljiva. Različni pristopi lahko privedejo celo do popolnoma nasprotujočih si zaključkov [48]. Natančna študija in iskanje odgovorov na pomembna vprašanja, kot so: kako na analizo novih materialov vpliva sam postopek inkubacije krvi, oz. uporabljena oprema, še ni bila izvedena[49].

Namen te raziskave je bil uvedba in optimizacija učinkovite metode za analizo hemokompatibilnosti različno kemijsko modificiranih polietilentereftaltnih (PET) površin. Polietilentereftalat in polisaharidi ter njihovi derivati, ki so bili uporabljeni za modifikacijo PET površin so bili izbrani zaradi njihovih obetajočih biokompatibilnih lastnosti in možnosti biomedicinskih aplikacij. Za namen raziskave je bila uvedena in optimirana metoda merjenja prostega hemoglobina, ki je bila v preteklosti uporabljena le za vrednotenje kemično različnih površin, kot so teflon, steklo in kolagen. S predstavljenimi raziskavo smo želeli ugotoviti, ali je ob ustrezni optimizaciji metoda primerna tudi za razlikovanje kemično podobnih površin, kot so z različnimi polisaharidi modificirane površine polietilentereftalata.

1.1. Sintetični žilni vsadki

Nedavni razvoj na področju kirurških vsadkov, zunajtelesnih naprav, tkivnega inženiringa, protimikrobnih zaščitnih polimernih materialov, trdnih tkivnih implantatov v ortopediji, kardiovaskularnih pripomočkov, endovaskularnega zdravljenja, je vplival tudi na hiter razvoj polimernih biomaterialov, uporabnih v medicinske namene. Uporabo, lastnosti in vplive teh materialov in naprav na človeški organizem, v zadnjem času določa množica predpisov in omejitev, ki ščitijo tako paciente, kot tudi zdravstvene delavce [2].

Kirurški vsadki (implantati) so materiali, ki se vsadijo v človeško telo z namenom, da bi vzpodbujali oz. nadomestili funkcijo notranjega organa oz. okvarjenega tkiva. Kot prve uporabljene vlaknate materiale, ki so jih uporabili znotraj v človeškega telesa, lahko smatramo različne vrste kirurških niti. Uporabnost različnih medicinskih vsadkov, sestavljenih iz polimernih materialov (folij, vlaken, filamentov, membran, itd.), omogočajo njihove specifične lastnosti, kot so: dobre mehanske lastnosti, velika upogibnost in prožnost, velika stična površina, poroznost, inertnost v stiku s fiziološkimi tekočinami. Med medicinske vsadke sestavljene iz vlaknatih polimernih materialov uvrščamo žilne vsadke, umetne vene, dele srčnih zaklopk, umetne kite in ligamente [2].

Najpomembnejša lastnost biomaterialov, uporabnih v medicini kot implantati, je njihova biokompatibilnost. Odvisno od namena medicinske aplikacije, morajo biti vsi biomateriali ovrednoteni v smislu biokompatibilnosti, ki jo lahko opišemo kot sprejemanje (ali zavrnitev) umetnega materiala s strani okoliškega tkiva oz. celotnega telesa. Biokompatibilnost je zelo kompleksen pojem, saj je to, v odvisnosti od aplikacije materiala oz. naprave, skupek različnih lastnosti kot so: netoksičnost, tkivna kompatibilnost in krvna kompatibilnost (hemokompatibilnost) [5]. Lahko torej rečemo, da so biomateriali snovi, ki jih uporabljamo v vsadkih in medicinskih pripomočkih in napravah in morajo biti oblikovani in imeti lastnosti, primerne za uporabo v živih organizmih.

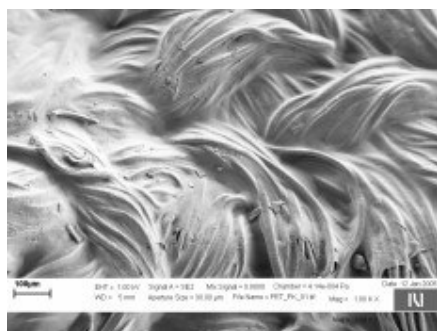
V žilni kirurgiji se pogosto poslužujejo sintetičnih žilnih vsadkov, posebno v primerih, ko vene pacientov kot nadomestek niso primerne. Običajno se v namen nadomestitve žil z umetnimi žilnimi vsadki uporabljajo polimerni vlaknati materiali iz polietilenteraftalata (PET, Dacron) ali membrane iz politetrafluoroetilena (PTFE). Zaradi izvrstnih mehanskih lastnosti se v praksi pogosteje uporabljajo PET žilni vsadki v primerjavi z PTFE žilnimi vsadki (slika 1-1).



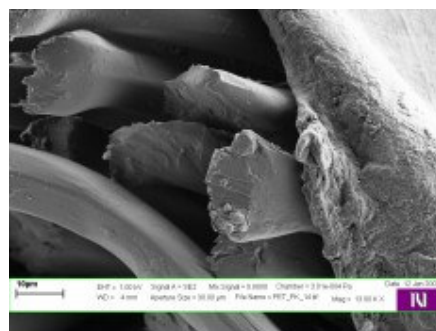
a.) 1000x



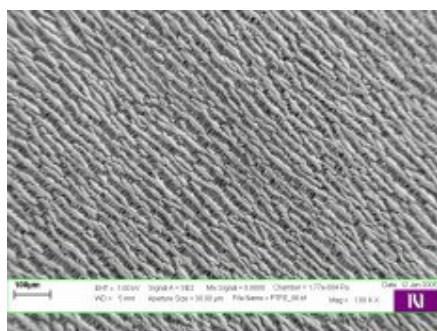
b.) 1000x



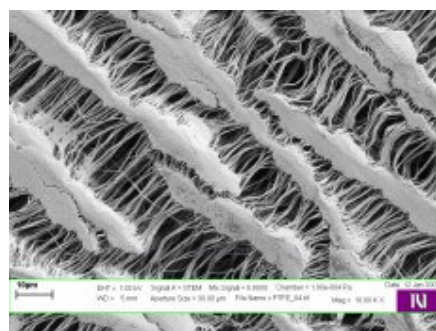
c.) 1000x



d.) 13000x



e.) 1000x



f.) 10000x

Slika 1-1: SEM posnetki površin nekaterih sintetičnih žilnih vsadkov, ki se danes uporabljajo v žilni kirurgiji: a.) PET-W (1000x), b.) PET-K (1000x), c.) PET-KC (1000x), d.) PET-KC (13000x), e.) PTFE (1000x), f.) PTFE (10000x)

PET žilni vsadki se uporabljajo kot tkane ali pletene strukture, ki dajejo vsadkom specifične mehanske lastnosti, kot so radialna raztegljivost in prilagodljivost.

Površine sintetičnih vaskularnih vsadkov ne predstavljajo idealne osnove za zadovoljivo rast celic, kar pa lahko spremenimo s aplikacijo primerne površinskega nanosa proteina (kolagen, albumin, fibrinogen) [11][12]. S tem se dodatno zmanjša poroznost in prepustnost vsadka v primerjavi z neobdelanim vsadkom [1]. Kolagen predstavlja snov, ki spodbudi koagulacijsko kaskado. Zamreženje kolagena lahko v določeni meri zmanjša trombogenost žilnih vsadkov [12].

V komercialnih sintetičnih vsadkih se heparin na površino vsadka veže ponavadi s pomočjo tri-dodecil-metilamonijevega klorida (TDMAC), ki tvori s heparinom netopen kompleks [14]. Zaradi postopnega sproščanja heparina s površine vsadka, ga približno po štirih tednih po implantaciji ni moč več zaslediti na površini vsadka. Nadaljnja pomanjkljivost uporabe heparina se kaže v nekaterih stranskih učinkih, kot je nenormalna krvavitev pacientov, zaradi njegovega živalskega izvora je lahko kontaminiran z nekaterimi živalskimi proteini in patogenimi organizmi itd. [13][15].

Značilnosti idealnega umetnega vsadka obsegajo številne kompleksne zahteve kot so, zadovoljive mehanske lastnosti, voljnost, poroznost, odpornost proti tvorbi anevrizem in predvsem biokompatibilnost. Vsadek mora omogočati vsaditev v telo in zagotavljati minimalno možnost infekcije; luminalni del vsadka mora biti stabilen in imeti dobre antikoagulacijske lastnosti. V idealnem primeru je želeno, da luminalni del vsadka preraste endotelij, ki ima dobre antitrombogene lastnosti [16][17]. Uporaben žilni vsadek torej ne sme biti samo trpežen »kanal«, ki ga vsadimo v telo, temveč mora tudi posnemati kompleksne lastnosti arterij v telesu. Zato danes stremimo k razvoju vsadka, ki bi zadovoljivo nadomestil žile majhnega premera, nizkega pretoka, ter nizkega tlaka [16].

Kljub razvoju na področju žilnih vsadkov pa ostaja okluzija žilnega vsadka zaradi tromboze eden glavnih zapletov v žilni kirurgiji, še posebej kadar nadomeščamo žile majhnega premera. Prav tako pa se kot pooperacijski zapleti lahko pojavljajo tudi infekcije vsadka, ter anevrizmatske razširitve vsadka.

Obdelava površin umetnih materialov z hidrofilnimi materiali ali bioaktivnimi snovmi (ki so lahko vezane na površino s kemijskimi ali fizikalnimi vezmi) so najpogosteje uporabljene tehnike, s katerimi skušamo izboljšati biokompatibilnost umetnih materialov [10]. Žilni

vsadki, ki so trenutno na tržišču, so v namene povečanja biokompatibilnosti obdelani s številnimi snovmi kot so: kolagen, heparin ter za doseganje protimikrobnih lastnosti ogljik, soli srebra...

1.2. Interakcije polimernih biomaterialov s krvjo

V telesu so bio-makromolekule zadolžene za številne življenjsko pomembne procese, ki so predmet številnih bioloških raziskav. Posebno zanimive so interakcije med molekulami ogljikovih hidratov in proteinov. Zadnja spoznanja na tem področju kažejo, da so te molekule soudeležene pri procesih, ki obsegajo kontrolo rasti, apoptoze, diferenciacije, ter proliferacije celice. Nadalje te molekule igrajo pomembno vlogo pri patofizioloških procesih. Kljub vsemu pa so mehanizmi vezave ogljikovih hidratov in proteinov le slabo raziskani [27]. Sulfatirani polisaharidi, ki jih najdemo v organizmih številnih živali in rastlin, imajo mnoge različne lastnosti in strukture, ter so odgovorni za številne funkcije. Sulfatirani polisaharidi na primer imajo sposobnost vezave na različna vezna mesta različnih proteinov.

Eden najpomembnejših in najbolj poznanih sistemov v človeškem telesu, kjer pride do vezave med polisaharidom in proteinom, predstavlja vezava heparina na antitrombin III, ki ima za posledico zavrtje koagulacijske kaskade [28]. Prav zaradi specifične vezave heparina na atitrombin III, ima heparin odlične antikoagulacijske lastnosti.

1.2.1. Primarna hemostaza - interakcije z elementi žilne stene

Trombociti so majhni diski v krvi, ki merijo 1-4 μ m. Trombociti v kostnem mozgu nastajajo v obliki megakariocitov, ki nato razpadejo na manjše elemente. Razpadanje megakariocitov na manjše fragmente se dogaja tako v kostnem mozgu, kot tudi v majhnih kapilarah po celotnem telesu.

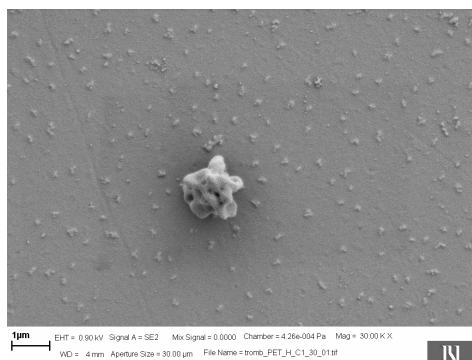
Čeprav trombociti nimajo jedra in niso sposobni reprodukcije, posedujejo številne funkcionalne lastnosti pravih evkariontskih celic. V njihovi citoplazmi lahko zasledimo:

- *aktinske in miozinske molekule*, ki predstavljajo kontraktilne elemente podobne kot jih imamo ljudje v mišičnih celicah,

- *ostanke endoplazmatskega retikuluma in Golgijevega aparata*, ki sta zadolžena za sintezo številnih encimov in shranjevanja kalcijevih ionov,
- *mitohondrije in encimske sisteme*, ki so sposobni sintetizirati adenozin trifosfat (ATP) in adenozin difosfat (ADP),
- *encime, ki sintetizirajo prostagladine*, ki so lokalni hormoni, ki imajo velik vpliv na žilni sistem in okoliško tkivo,
- *protein z imenom fibrin- stabilizirajoči faktor*, ki ima pomembno vlogo v koagulaciji,
- *rastni faktor*, ki povzroča rast žilnega endotelija, gladkih mišic v žilni steni, ter pomnoževanje fibroblastov.

Prav tako pomembno vlogo pri zagotavljanju primarne hemostaze, pa imajo tudi molekule na površini trombocitov. Med te molekule uvrščamo glikoproteine, katerih naloga je, da se sprimejo s poškodovanimi deli žilne stene (še posebej na molekule kolagena). Druga skupina molekul na površini trombocitov so fosfolipidne molekule, katerih naloga je, da aktivirajo različne stopnje v kaskadni reakciji [45].

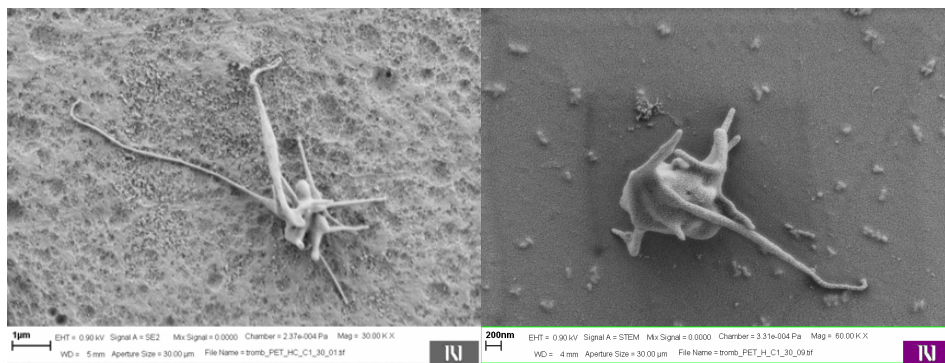
Naloga trombocitov je, da zamašijo majhne poškodbe žilnih sten, ki nastajajo tekom vsakdanjega življenja. Takoj ob stiku trombocita s poškodovano žilno steno, še posebej ob stiku s kolagenom, pride do funkcionalnih sprememb samih trombocitov. Po interakciji med von Wilbrandovim faktorjem (vWF) in glikoproteinom Ib (GP Ib), hitro pride do spremembe v obliki trombocitov, ter do nastajanja filopodijev (pseudopodijev). Med prvo fazo (slika 1-2) aktivacije trombocitov, postanejo le ti kroglaste oblike in imajo številne izrastke. Takšni trombociti se nato »kotalijo« po površini žilne stene, zaradi neprekinjenih reakcij med vWF in GP Ib M [50]



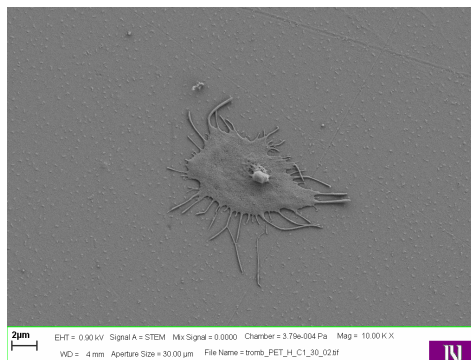
Slika 1-2:1. faza kroglasta oblika trombocitov in izrastki

Zaradi nadaljnje aktivacije trombocitov preko kompleksa GP Ib in vWF, preidejo le ti v drugo fazo aktivacije (slika 1-3), kjer privzemajo hemisferno obliko.

Trombociti hemisferne oblike se nato, kot posledica vezave $\alpha_{IIb}\beta_3$ in vWF prenehajo kotaliti. Pod vplivom povečane intracelularne koncentracije kalcija (za katero se predvideva, da je posledica interakcije med $\alpha_{IIb}\beta_3$ in vWF), pridejo hemisferni trombociti v ploščato/razlito obliko. Med to, tretjo fazo (slika 1-4), pride do ireverzibilne vezave trombocitov na površino žilne stene.



Slika 1-3: 2. faza: spreminjanje oblike v poloblo in aktivacija integrina kar vodi do čvrste adhezije



Slika 1-4 : 3. faza: sprememba poloble celice v ploščato/»razlito« obliko, ireverzibilno prilepljeno na trombogeni površini

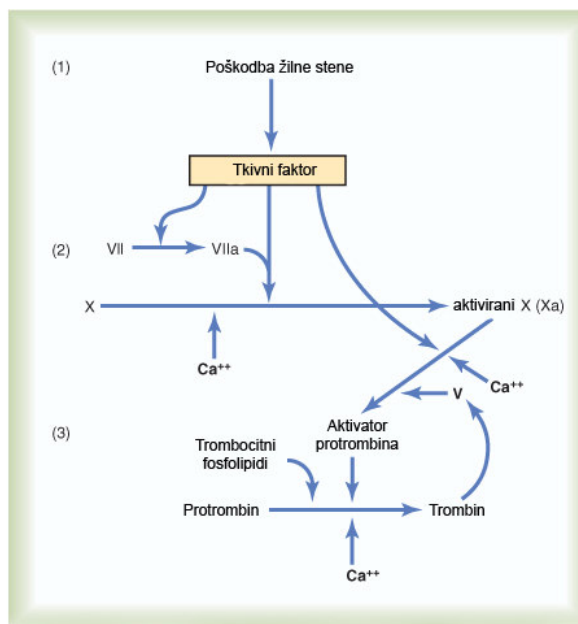
Med vsemi tremi fazami preobrazbe, pa prihaja tudi do krčenja trombocitov in posledično do sproščanja granul. V granulah se nahajata ADP in tromboksan A_2 , ki ob sprostitvi aktivirata trombocite v okolici [45].

1.2.2. Sekundarna hemostaza - mehanizem koagulacije krvi

Koagulacija krvi poteka v treh stopnjah. Ob poškodbi žilne stene ali krvi same se sproži zapletena kaskada kemijskih reakcij, ki vsebuje več kot ducat faktorjev strjevanja. Končni rezultat teh reakcij je tvorba aktivatorja protrombina. Aktivator protrombina nato katalizira reakcijo, pri kateri iz protrombina nastane trombin. Trombin nato deluje kot encim, ki pretvori fibrinogen v fibrinska vlakna v katera se ujamejo trombociti, krvne celice in krvna plazma in tvorijo krvni strdek.

1. Nastanek aktivatorja protrombina

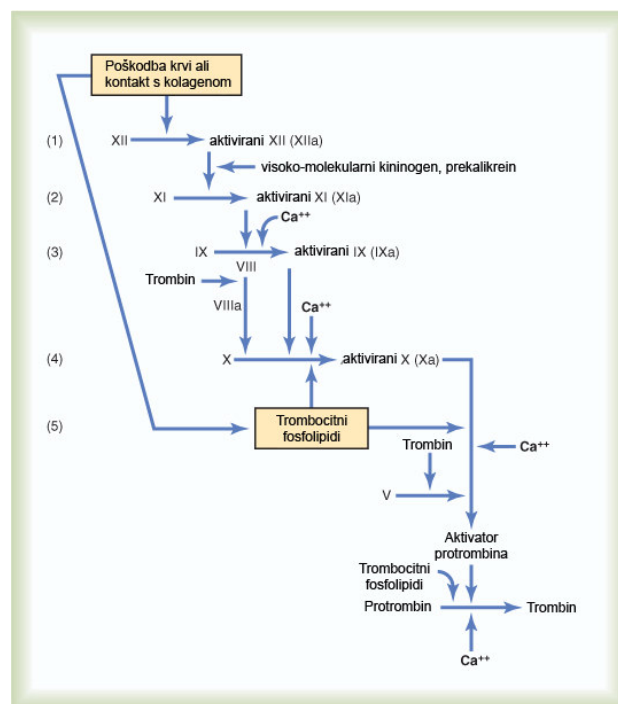
Aktivator protrombina lahko nastane preko kaskade reakcij, ki jih povzroči travma žilne stene in drugih tkiv, poškodba krvnih komponent ali kontakt krvi s poškodovanimi endotelnimi celicami ali drugimi tkivi zunaj krvne žile. Aktivator protrombina nato povzroči konverzijo protrombina v trombin in nato vse naslednje stopnje koagulacije. V splošnem govorimo o dveh poteh nastanka aktivatorja protrombina: ekstrinzična, ki se začne s travmo žilne stene, in intrinzična pot, ki se začne v krvi sami. V obeh poteh imajo glavno vlogo tako imenovani faktorji strjevanja. Večina jih je v krvi prisotna v inaktivni obliki, ko se aktivirajo povzročijo nastanek kaskadne reakcije.



Slika 1-5: Shema ekstrinzične poti koagulacije[45]

Ekstrinzična pot koagulacije (slika 1-5) se začne s poškodbo žilne stene ali kontaktom krvi z ekstravaskularnimi tkivi, kar povzroči sproščanje tkivnega faktorja (tkivni tromboplastin). Tkivni faktor je sestavljen predvsem iz fosfolipidov tkivnih membran in lipoproteinskega kompleksa, ki deluje kot proteolitični encim. Tkivni faktor aktivira Faktor VII. Aktivirani Faktor VII in Tkivni faktor nato ob prisotnosti kalcijevih ionov pretvorita Faktor X v njegovo aktivno obliko. Aktivirani Faktor X se takoj poveže s tkivnimi fosfolipidi, ki so del Tkivnega faktorja, fosfolipidi, ki se sprostijo iz trombocitov in Faktorjem V ter tako tvori aktivator protrombina. V nekaj sekundah se ob prisotnosti kalcijevih ionov protrombin razcepi na trombin. Faktor V je na začetku inaktiviran, vendar pa se ob začetku koagulacije in nastanku trombina aktivira. Aktiviran Faktor V še pospeši aktivacijo protrombina.

Intrinzična pot koagulacije (slika 1-6)



Slika 1-6: Shema intrinzične poti koagulacije[45]

Poškodba krvi oziroma krvnih komponent povzroči aktivacijo Faktorja XII in sproščanje trombocitnih fosfolipidov. Faktor XII ob stiku s kolagenom ali trombogeno površino (steklo) spremeni molekularno konfiguracijo in postane proteolitični encim. Istočasno se poškodujejo

tudi trombociti zaradi adherence na kolagen ali steklo, kar sprosti trombocitne fosfolipide, ki vsebujejo lipoprotein imenovan trombocitni faktor 3. Aktiviran Faktor XII ob prisotnosti visoko-molekularnega kininogena nato aktivira Faktor XI, ki aktivira Faktor IX. Aktiviran Faktor IX skupaj z aktiviranim Faktorjem VIII, trombocitnimi fosfolipidi in faktorjem 3 aktivirajo Faktor X. Ta korak je skupen obema potema koagulacije. Aktiviran faktor X se združi s Faktorjem V in tkivnimi ali trombocitnimi fosfolipidi v kompleks imenovan aktivator protrombina.

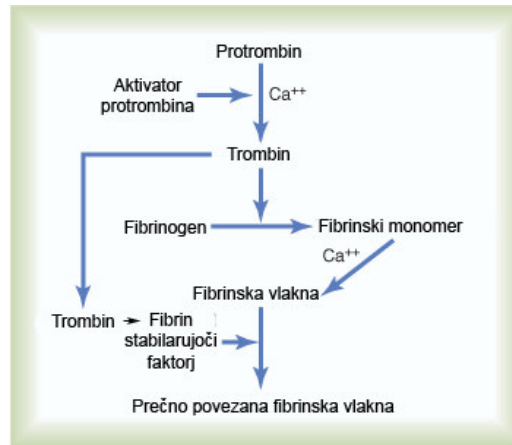
2. Konverzija protrombina v trombin

Aktivator protrombina nastane ob poškodbi žilne stene ali specifične substance v krvi (ekstrinzična ali intrinzična pot). Aktivator protrombina ob zadostni koncentraciji Ca povzroči konverzijo protrombina v trombin. V naslednjih 10 do 15 sekundah povzroči trombin polimerizacijo fibrinogenih molekul v fibrinska vlakna. Ključni korak koagulacije krvi je nastanek protrombinskega aktivatorja, saj si nadaljne reakcije sledijo zelo hitro. Pomembno vlogo pri konverziji protrombina v trombin imajo tudi trombociti, saj se protrombin najprej veže na receptorje za protrombin na trombocitih, ki so že prilepljeni na poškodovano tkivo.

Protrombin je plazemski protein (alfa₂-globulin) z molekulsko maso 68700. Pri normalnih pogojih je koncentracija v plazmi enaka 15 mg/dL. Protrombin je nestabilen protein, ki se hitro razcepi na manjše proteine, eden izmed katerih je tudi trombin z molekulsko maso 33700. Protrombin kontinuirano nastaja v jetrih in se tudi kontinuirano porablja pri koagulaciji krvi po vsem telesu. Za tvorbo protrombina in nekaterih drugih faktorjev strjevanja v jetrih je potreben vitamin K. Zato pomanjkanje vitamina K ali poškodba jeter zmanjšuje koncentracijo protrombina v krvi.

3. Konverzija fibrinogena v fibrin (slika 1-7)

Fibrinogen je plazemski protein z molekulsko maso 340000 in plazemsko koncentracijo 100-700 mg/dL. Fibrinogen nastaja v jetrih, zato jetrna okvara povzroči zmanjšanje koncentracije cirkulirajočega fibrinogena. Zaradi velike molekulske mase fibrinogen ne prehaja v intersticij. V normalnih pogojih tako intersticijska tekočina ne koagulira, ob povečanju prepustnosti kapilar pa se koagulacija lahko pojavi tudi v intersticiju.



Slika 1-7: Shema nastanka fibrinskih vlaken [45]

Trombin deluje kot encim s šibkimi proteolitičnimi sposobnostmi. Fibrinogenu odstrani 4 nizko-molekularne peptide in tvori fibrinski monomer, ki se samodejno poveže z ostalimi monomeri in tvori fibrinska vlakna. V začetnih fazah polimerizacije se fibrinski monomeri povežejo s pomočjo nekovalentnih vodikovih vezi in ne tvorijo prečnih povezav, zaradi česa takšen strdek ni čvrst. V naslednjih minutah postane takšen strdek bolj čvrst ob pomoči substance imenovane fibrin-stabilirajoči faktor, ki je v majhnih količinah prisotna v plazemskih globulinih in se sprošča iz trombocitov ujetih v strdek. Trombin aktivira fibrin-stabilirajoči faktor, ki nato ustvari kovalentne vezi med posameznimi fibrinskimi monomeri kot tudi prečne povezave [45].

1.3. Antikoagulanti

Heparin

Molekula heparina je negativno nabit konjugiran polisaharid. Sam po sebi nima antikoagulantnih lastnosti, vendar pa se ob vezavi na AT-III poveča odstranjevanje trombina do 1000-krat (slika 1-5) [45]. Heparin je eden izmed najpogosteje klinično uporabljenih antikoagulantov. Zaradi svoje direktne vezave na AT-III deluje takoj po i.v. aplikaciji ali v roku 60 min po subkutani aplikaciji. Razpolovna doba je 40-90 min. V urgentnih primerih se zato zdravljenje začne z bolusnim odmerkom, kateremu sledi infuzija. Nizko molekularni

heparini se aplicirajo subkutano, imajo daljšo razpolovno dobo kot nefrakcioniran heparin, ki je neodvisna od doze, zato so učinki bolj predvidljivi. Eliminirajo se preko ledvic, zato je ob ledvični odpovedi bolj zaželjena uporaba nefrakcioniranega heparina.

Warfarin – antagonist vitamina K

Warfarin je najbolj pomemben oralni antikoagulant. Antagonisti vitamina K delujejo *in vivo*, saj inhibirajo encimatsko redukcijo vitamina K v aktivno obliko hidrokinon. Hidrokinon sodeluje pri post-translacijski γ -karboksilaciji glutaminske kisline faktorjev strjevanja II, VII, IX in X. Učinek je prisoten šele čez nekaj dni, saj se morajo že nastali faktorji strjevanja razgraditi. Učinek je zato odvisen od razpolovne dobe posameznih faktorjev strjevanja. Najprej se razgradi faktor VII z razpolovno dobo 6 ur, nato še faktorji IX, X in II z razpolovnimi časi 24, 40 in 60 ur.

Antiagregatorne učinkovine

Najbolj znana antiagregatorna učinkovina je zagotovo Aspirin. Svoj učinek doseže preko ireverzibilne inaktivacije encima ciklooksigenaza (COX). S tem se zmanjša tvorba tromboksana (TXA₂) v trombocitih in prostaciklina 2 (PGI₂) v endoteliju. Zaradi presistemske eliminacije je oralna administracija relativno selektivna za trombocite. Zraven tega lahko endotelne celice sintetizirajo nove COX encime. Poruši se ravnovesje med PGI₂, ki zavira agregacijo in TXA₂, ki spodbuja agregacijo. Po administraciji Aspirina je zato sinteza TXA₂ zavrta 7-10 dni, dokler se trombociti, ki krožijo po krvi, ne zamenjajo[46].

1.4. Alternativni viri antikoagulantov

Zraven že uporabljenih antikoagulantov, kot so heparin in kumarini, se zaradi znanih stranskih učinkov intenzivno išče tudi nove pristope k antikoagulantni terapiji. Med najbolj znanimi alternativnimi antikoagulantmi so nizko-molekularni heparin, dermatan sulfat in sintetični antitrombin III-vezujoči heparinski pentasaharid. Kljub tem substancam je še vedno potrebno odkriti strukturno definiran antikoagulant, ki ni živalskega izvora, daje konstantne rezultate in ima potencial za oralno aplikacijo. D. Wall s sodelavci, v članku

»Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaharides« opisuje antikoagulantne lastnosti strukturno različnih sulfatiranih oligosaharidov [47]. S pomočjo APTČ (parcialni aktivacijski protrombinski čas) testa so testirali 17 sulfatiranih oligosaharidov. Ugotovili so, da faktorji kot so dolžina verige, struktura monosaharida in način povezave med posameznimi monosaharidi ter vsebnost žvepla odločilno vplivajo na antikoagulantne lastnosti. Vpliv dolžine verige je bil najbolj evidenten pri maltozni seriji, saj so maltopentoza, maltoheksoza in maltoheptoza bili bolj učinkoviti pri podaljšanju APTČ kot krajši maltozni oligosaharidi. Vpliv strukture monosaharida se je najbolj pokazal pri hitozanskem heksamernem sulfatu, ki je pokazal veliko manjše antikoagulantne lastnosti kot glukoheksozni sulfat. Oba monosaharida sta bila med seboj povezana na enak način - β (1 \rightarrow 4). Glukoza serija sulfatiranih oligosaharidov je pokazala pomembnost medsebojnega povezovanja posameznih monosaharidov. Sulfatirani laminarini (β (1 \rightarrow 3) povezana glukoza) so pokazali veliko manjšo aktivnost kot sulfatirani oligosaharidi, ki vsebujejo povezave α (1 \rightarrow 4), α (1 \rightarrow 6) in β (1 \rightarrow 4).

Najboljše rezultate so dosegli s PI-88 (Fosfomanopentoza), ki je APTČ podaljšal za 20% podaljšanja APTČ s Fragminom. Ugotovili so, da PI-88 dosega svoje antikoagulantne lastnosti podobno kot dermatan sulfat in sicer preko direktne inhibicije trombina ob prisotnosti HCII (Calbiochem) in ne preko z ATIII posredovane inhibicije faktorja Xa ali trombina[47].

1.5. Regulativa in testi biokompatibilnosti

Za ugotavljanje in določanje biokompatibilnosti in uporabnosti biomaterialov obstajajo danes številni specifični testi in standardi. S temi testi skušamo ugotoviti, ali materiali, ki so namenjeni za uporabo v medicini vsebujejo snovi, ki so toksične za celice pacienta, izzivajo pacientovo tkivo s katerim so v stiku, povzročajo nepričakovane imunske ali alergijske reakcije, vplivajo na pacientov fiziološki sistem in povečajo možnost mutacij in pojavnost raka. Če povzamemo, morajo vsi proizvajalci zagotoviti, da njihovi pripomočki ne vsebujejo materialov ali snovi, ki bi lahko škodovale pacientom med celotnim časom uporabe njihovega pripomočka.

FDA je izdala dva dokumenta, ki naj bi bila v pomoč proizvajalcem biomedicinskih materialov in naprav pri vprašanjih o biokompatibilnosti njihovih izdelkov in o potrebnih testiranjih zanje. Prvi dokument ki je tudi mednarodno priznan, ISO standard ISO-10993-1:1997, ima naslov »Biocompatibility Evaluation of Medical Device-Part 1: Evaluation and testing«. Druga knjiga, Blue Book Memorandum #G95-1, nosi naslov »Required Biocompatibility Training and Toxicology Profiles for Evaluation of Medical Devices«. Obe knjigi opisujeta številne teste biokompatibilnosti in definirata njihovo uporabo na izdelkih v skladu z aplikacijo. S tem proizvajalcem pomagajo pri odločitvi, katere teste je potrebno izvesti za določene medicinske pripomočke (preglednica 1-1) [54].

Kot je razvidno iz preglednice 1-1 mora biti pri materialih, ki so namenjeni za uporabo v stiku s krvjo, nujno testirana njihova hemokompatibilnost. Mednarodno usklajeni standardi sicer ponujajo nabor testov in parametrov za in-vitro karakterizacijo interakcij med biomateriali in krvjo, kljub temu pa še vedno ni standarda, ki bi natančno določal velikost, obliko in vrsto in-vitro sistemov.

Na področju razvoja novih materialov za biomedicinsko uporabo je zato trenutno v uporabi cela vrsta najrazličnejših sistemov testiranja hemokompatibilnosti in-vitro. V večini primerov niti postopek inkubacije, niti uporabljen inkubacijski sistem nista dovolj natančno opredeljena [48]. Zaradi izjemne kompleksnosti vplivov najrazličnejših eksperimentalnih pogojev na spremembe krvi med in-vitro testi, je primerjava rezultatov, dobljenih na osnovi različnih sistemov določanja hemokompatibilnosti z različnimi postopki inkubacije, dvomljiva. Različni pristopi lahko privedejo celo do popolnoma nasprotujočih si zaključkov [48]. Zaradi tega je na področju analiz biomaterialov nujno potrebna natančna študija uporabe testov na osnovi inkubacije krvi. Natančna študija in iskanje odgovorov na pomembna vprašanja, kot so: kako na analizo novih materialov vpliva sam postopek inkubacije krvi, oz. uporabljena oprema, še ni bila izvedena [49].

Preglednica I-1: Smernice testiranja biokompatibilnosti za pripomočke v medicini po FDA-ju

VRSTA MATERIALA		BIOLOŠKI UČINEK									
		Prvoten							Drugo		
Kontakt s telesom	Trajanja kontakta A – omejen [< 24 ur] B – podaljšan [> 240 ur in < 30 dni] C – trajen [> 30 dni]	Citotoksičnost	Občutljivost	Draženje	Sistemska toksičnost	Subkronična toksičnost	Genotoksičnost	Vsaditev	Hemokompatibilnost	Kronična toksičnost	Karcinogenost
		POVRŠINSKI MATERIALI	Koža	A	●	●	●				
B	●			●	●						
C	●			●	●						
Mukozne membrane	A		●	●	●						
	B		●	●	●	◇	◇		◇		
	C		●	●	●	◇	●	●	◇		◇
Prekinjene površine (rane)	A		●	●	●	◇					
	B		●	●	●	◇	◇		◇		
	C		●	●	●	◇	●	●	◇		◇
ZUNANJI MATERIALI, KI PRIDEJO V KONTAKT S TKIVI	Kri - indirektno	A	●	●	●	●				●	
		B	●	●	●	●	◇			●	
		C	●	●	◇	●	●	●	◇	●	●
	Tkivo / kost / zobovina	A	●	●	●	◇					
		B	●	●	◇	◇	◇	●	●		
		C	●	●	◇	◇	◇	●	●		◇
	Cirkulirajoča kri	A	●	●	●	●		◇		●	
		B	●	●	●	●	◇	●	◇	●	
		C	●	●	●	●	●	●	◇	●	●
MATERIALI ZA VSADKE	Tkivo / kost	A	●	●	●	◇					
		B	●	●	◇	◇	◇	●	●		
		C	●	●	◇	◇	◇	●	●		●
	Kri	A	●	●	●	●				●	
		B	●	●	●	●	◇	●	●	●	
		C	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● - ISO standard ISO-10993-1:1997

◇ - Drugi testi, ki jih priporoča FDA

1.6. Namen in hipoteza

V sklopu študije krvne skladnosti modificiranih sintetičnih polimernih površin za vsadke smo skušali dosedanje metode testiranja krvne skladnosti površin, za katere se je izkazalo, da niso zadovoljivo natančne in ponovljive, izboljšati v to smer, da bi nam omogočile testiranje različno obdelanih površin trdnih struktur, ki so po kemijski zgradbi enake.

Skušali smo dognati, ali imajo sulfatirani polisaharidi, ki so strukturno zelo podobni heparinu, tudi podobne protitrombogene lastnosti. Zanimalo nas je, ali imajo polisaharidni nanosi na površino PET folije kakšen vpliv na trombogenost površine.

S metodo SEM mikroskopije smo želeli dopolniti testiranje trombogenosti površin. Želeli smo opazovati, kako se trombociti v plazmi odzovejo ob stiku s obdelano površino PET folije.

Naša delavna hipoteza se glasi, da je z optimizirano metodo detekcije prostega hemoglobina, možno testirati trombogenost različno obdelanih površin substanc, ki so po kemijski zgradbi enake. Prav tako pričakujemo, da so sulfatirani polisaharidi substance, ki se po svojih trombogenicih lastnostih lahko kosajo s heparinom. Predvidevali smo, da s SEM mikroskopijo lahko opazujemo število trombocitov na površini vzorcev in da s pomočjo opazovanja faz aktivacije trombocitov lahko sklepamo o trombogenosti površine.

2. EKSPERIMENTALNI DEL

2.1. Materiali

Za izvedbo eksperimenta smo uporabili polietilenteraftalantno folijo Mylar®, debeline 175 µm. Osnovni material je bil ustrezno modificiran s pomočjo kemičnih postopkov in adsorpcije biopolimerov. Uporabljeni vzorci in obdelave so zbrani v preglednici 2-1.

Preglednica 2-1: Označbe in opis vzorcev PET folij

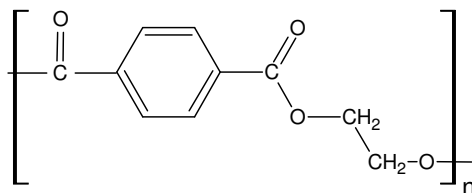
Označba vzorca	Opis obdelave
Steklo	referenčna trombogena površina
PET	neobdelan polietilenteraftalat
PET-H	hidrolizirana PET folija
PET-HC	PET folija obdelana z hitozanom
PET-HCF	PET folija obdelana z hitozanom in fukoidanom
PET-HCSH	PET folija obdelana z hitozanom in sulfatiranim hitozanom
<i>PET-HCHEP</i>	PET folija obdelana z hitozanom in heparinom

Vse uporabljene kemikalije, so bile analitsko čiste in jih nismo dodatno čistili.

Uporabili smo hitozan nizke molske mase (Aldrich, 48869), ter stopnje deacetiliranja (SD) 75 – 85 %, ki je bil pridobljen iz oklepov morskih rakov. Postopki sulfatiranja (stopnja sulfatiranja 15,8%) so potekali na omenjenih vzorcih hitozana. Uporabljen fukoidan je bil pridobljen iz alg vrste *Fucus vesiculosus* (Fluka, 47865), heparin pa iz sluznice svinjskih prebavil (Fluka 51551).

2.1.1. PET folija

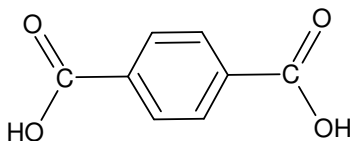
Polietilenteraftalat (PET) je linearni aromatski poliester, katerega so prvič sintetizirali v Dupont-u v štiridesetih letih prejšnjega stoletja (slika 2-1).



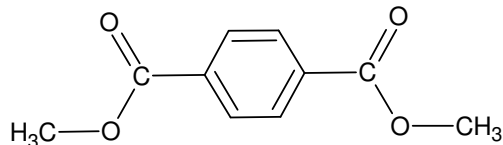
Slika 2-1: Monomerna enota polietilenteraftalata (PET)

Poliester nastaja med stopenjsko polikondenzacijo iz dikarboksilne kisline in dialkohola. Kot izhodne substance najpogosteje nastopajo:

- Tereftalna kislina (TPA)



- Dimetiltereftalat (DMF)



PET oblikujejo v multifilamentne neskončne niti, monofilamente, rezana vlaka in folije. Najbolj poznani komercialni imeni za PET sta Dacron in Terylene. Standardna PET vlakna imajo gladko površino ter po navadi okrogle prečne prereze.

V smislu biokompatibilnosti, lahko PET označimo kot fiziološko inerten, brez toksičnega vpliva na kožo in dobro rezistenten na kolonizacijo z mikroorganizmi [23][24]. Prav tako kot večina ostalih biomaterialov, tudi PET prvotno ni bil razvit za aplikacijo v medicinske namene. Prav zaradi tega, so številni umetni materiali, ki jih uporabljamo kot vsadke velikokrat trši oz. čvrstejši kot tkivo, ki ga s tem materialom nadomeščamo, kar pa lahko privede do težav tako v smislu mehaničnih, kot tudi bioloških zapletov [25].

2.1.2. Hitozan in njegovi derivati

Hitin, skupaj s celulozo in škrobom, predstavlja tri, v naravi najbolj razširjene polimerne ogljikove hidrate (polisaharide). Hitozan se pridobiva iz hitina s pomočjo N-acetilacije z alkalnimi spojinami [2][30]. Makromolekule hitozana so sestavljene iz glukozaminskih in N-acetilglukozaminskih enot, ki so med seboj povezane z 1-4 glukozidnimi vezmi. Hitozan lahko obravnavamo kot analog celuloze, ki pa ima aminske namesto C(2) hidroksilnih skupin [31].

Hitozan je pomemben biopolimer, saj ima edinstvene lastnosti. Primarno je sestavljen iz aaminskih skupin, z vrednostjo pK_a 6.3 [32]-6.5 [33]. Pri pH, ki je nižji od pK_a vrednosti aaminskih skupin v hitozanu, se le-te protonirajo in hitozan postane topen v vodi. Obratno, se pri pH, ki je višji od pK_a , aminske skupine deprotonirajo in hitozan postane netopen v vodi.

Hitozan je netoksičen biopolimer s številnimi biološkimi aktivnostmi. Predvsem pomembne so njegove protimikrobne/protibakterijske lastnosti [19], protimikotično delovanje [34], hemokompatibilnost, hipoholesterolna aktivnost [18], sposobnost pospeševanja celjenja ran in upočasnitev nekaterih procesov levkemije [35].

Rezultati študije, ki jo je opravil Okamoto s sodelavci, kaže, da hitozan poveča agregacijo trombocitov in eritrocitov, ter s tem pospeši koagulacijo krvi, prav tako pa so opazili povečano sproščanje PDGF-AB in TGF- β 1, ki pa imata pomembno vlogo pri procesu celjenja ran [37]. Študija heparina (antiagregacijska učinkovina) in hitozana (protibakterijska učinkovina) na večslojnih filmih, ki jo je izvedel J. Fu s sodelavci je pokazala zmanjšano adhezijo bakterije *Escherichia coli* (E. Coli) na obdelano površino, prav tako pa se je izkazalo, da se je število obstoječih bakterij ob dodatku hitozana zmanjšalo [36].

2.1.2.1. Hitozan -sulfat

Prisotnost dveh različnih funkcionalnih skupin, NH₂ skupine na 2-poziciji, ter OH skupine na 3- in 6- poziciji, omogoča številne derivatizacijske procese hitozana. Tako v literaturi najdemo številne derivate tega polimera, med katerimi se nekateri že sintetizirajo v komercialne namene [51] [52].

Sulfat hitozana predstavlja družino derivatov hitozana, za katero velja, da poseduje protivirusne [22], antikoagulacijske, antioksidantne [30], tumorsupresorske [21][30] lastnosti. Antikoagulacijske lastnosti sulfatiranega hitozana, so posledica strukturne podobnosti s heparinom [53].

Številne raziskave se ukvarjajo s preučevanjem vpliva pozicije sulfatnih skupin na antikoagulacijske lastnosti sulfatiranega hitozana. Študija, ki jo je opravil Nishimura s sodelavci, je pokazala, da sulfatne skupine na poziciji O-2 in/ali O-3 nimajo velikega vpliva na antikoagulacijske sposobnosti sulfatiranega hitozana, medtem ko sulfatne skupine na poziciji O-6 odločilno zavrejo koagulacijo krvi [22].

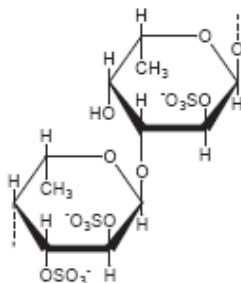
Na antikoagulacijske sposobnosti sulfatiranega hitozana vplivajo številni faktorji kot so, molekulska teža, vsebnost žvepla in stopnja acetilacije hitozana. Vsebnost žvepla je direktno povezana z njegovimi antikoagulacijskimi lastnostmi. Z vnosom žvepla, povečamo gostoto negativnega naboja, za katerega se predvideva, da ima odločilen vpliv na antikoagulacijske sposobnosti sulfoniranega hitozana [21].

2.1.3. Fukoidan

Fukoidan je prvi iz morskih rjavih alg izoliral Killing, in sicer leta 1913. Poimenoval ga je fukuidin. 40 let kasneje je McNeely spremenil njegovo ime v fukoidan, čigar novo ime se tudi sklada z nomenklaturo polimerov. Fukani predstavljajo družino polisaharidov, ki so bogati z L-fukozo [39] [38]. Fukoidan je kompleksen sulfatiran polisaharid, ki ga sintetiziramo iz morskih rjavih alg, ter morskih ehinodermov (stena morske kumare). Večina znanstvenih raziskav se je osredotočila na fukoidan, ki je sintetiziran iz rjavih morskih alg, *Fucus vesiculosus*, za katerega je znano, da ima številne vplive na procese v celicah sesalcev [40].

Do nedavnega so obstajale različne teorije o glukozidnih vezeh v fukoidanu, pridobljenem iz *Fucus vesiculosus*. Leta 1993 je Potanker s sodelavci dognal, da je fukoidan pridobljen iz alg *Fucus vesiculocus* polisaharid, ki je sestavljen iz L-fukoze, ki je med seboj povezana z α

(1→3) glikozidnimi vezmi. Sulfatna skupina se nahaja v glavnem na 4. poziciji. Chevalot s sodelavci je s pomočjo delne hidrolize fukanov ugotovil, da je fukoidan polisaharid, katerega ogradje povezujejo tako α (1→3) kot tudi z α (1→4) glikozidne vezi, ter sulfatnimi skupinami na O-2 in O-2,3 poziciji (Slika 2-2) [41].



Slika 2-2: Značilna struktura fukoidana, sintetiziranega iz alg *Fucus vesiculocus* [39]

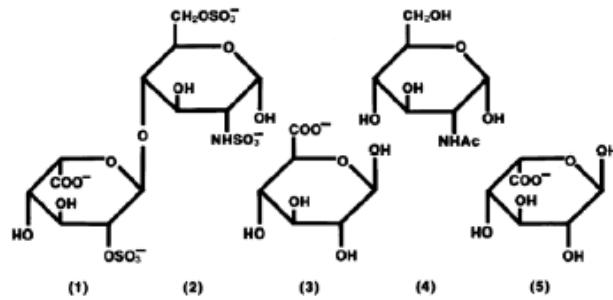
Fukoidan bi lahko kot antikoagulant uporabljali kot nadomestek heparina, saj je rastlinskega izvora in je zato verjetnost, da vsebuje viruse in prione veliko manjša. Fukoidan nima samo odličnih antikoagulacijskih in antitrombotičnih lastnosti [13][26][42], temveč ima tudi vpliv na imunski sistem, zavira proliferacijo in adhezijo celic [43] ter ščiti pred virusnimi okužbami [39].

Fukoidan ima vpliv na molekulo selektina in tako inhibira LPS povzročeno »kotaljenje« in adhezijo levkocitov na epitelne celice aorte. Tako kot heparin, tudi fukani zavirajo proliferacijo gladkih mišičnih celic. Antikoagulacijske in antiproliferativne sposobnosti fukanov nizke molekulske teže so pogojene s stopnjo sulfatiranja le teh [29][44].

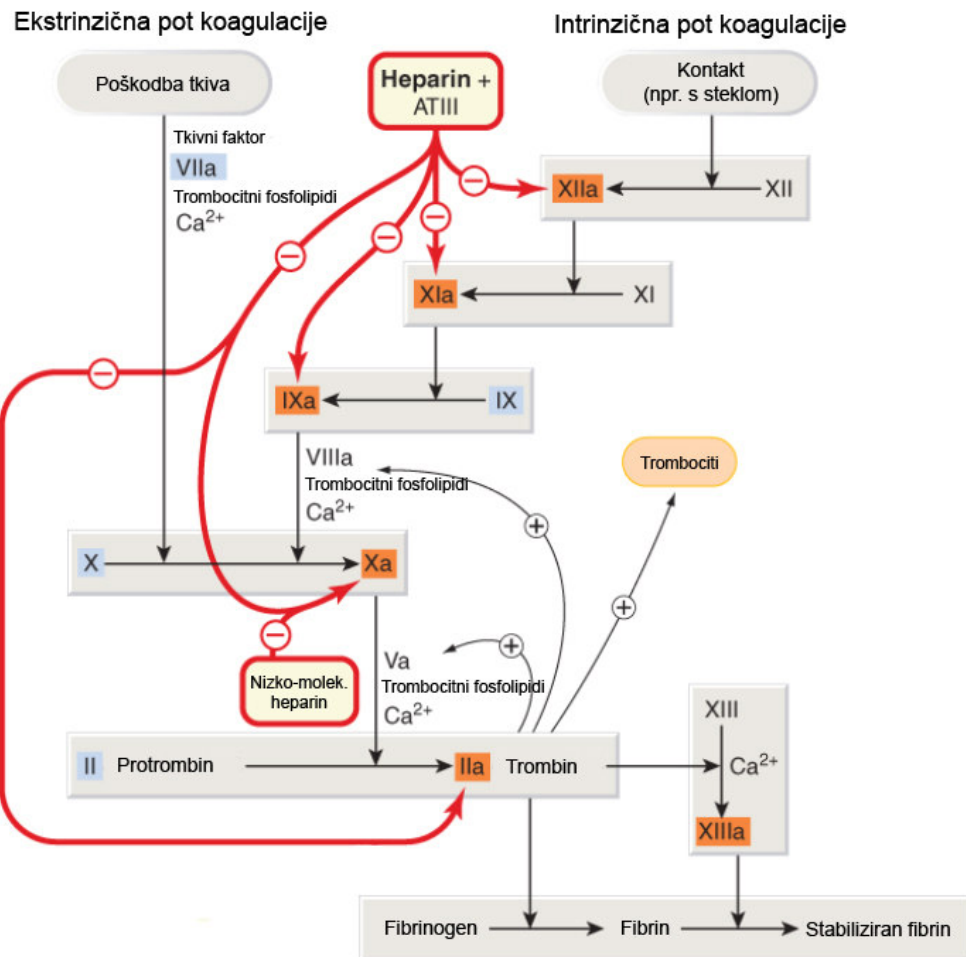
2.1.4. Heparin

Heparin je leta 1916 odkril študent drugega letnika medicine. Med počitniškim delom je poskušal sintetizirati prokoagulacijske substance iz različnih tkiv, a je namesto tega odkril substanco z zelo močnim antikoagulacijskim delovanjem. Substanco je prvič sintetiziral iz jeter in posledično so jo poimenovali heparin.

Heparin uvrščamo v družino sulfatiranih glukozaminoglikanov (mukopolisaharidov). V telesu se pojavlja skupaj z histaminom v granulah mast celic. V komercialne namene ga sintetizirajo iz pljuč goveda ali pa iz svinjskih prebavil.



Slika 2-3: Struktura molekule heparina



Slika 2-4: Delovanje heparina

Dandanes nefragmentiran heparin vse bolj nadomeščajo njegovi fragmenti (enoksaprin, dalteparin) ali sintetični derivati (fondaparinux), za katere se je uveljavilo ime nizkomolekularni heparin.

Heparin, z aktivacijo antitrombina III, deluje antikoagulacijsko tako in-vivo, kot tudi in-vitro. Antitrombin III z vezavo na aktivna mesta trombina in ostalih serinskih proteaz inhibira njihovo delovanje (slika 2-4). Heparin pospeši to delovanje z vezavo na specifično pentasaharidno zaporedje na antitrombinu III, kar ima za posledico konformacijo te molekule [46].

2.2. Metode

2.2.1. Priprava vzorcev PET folij

2.2.1.1. *Predobdelava PET folij- čiščenje in aktivacija*

PET folijo smo potopili v 98 % raztopino. Vzorce smo nato 10 minut čistili s pomočjo ultrazvočne kopeli, ter spirali z demineralizirano vodo. Vzorce smo sušili na zraku. Z namenom aktivacije površine PET folij (boljša adsorpcija hitozana v naslednji stopnji obdelave) smo izvedli hidrolizo s pomočjo 4 M raztopine NaOH. Prekinitev hidrolize in nevtralizacija folij je bila dosežena s pomočjo 1 M raztopine HCl. Na koncu smo folije še enkrat spirali z demineralizirano vodo in jih posušili na zraku.

2.2.1.2. *Modifikacija površine PET folij*

Z namenom izboljšanja biokompatibilnosti površine PET folij, so bile le-te obdelane s hitozanom in nato še z različnimi sulfatiranimi polisaharidi. V prvem koraku je bil pri temperaturi 60 °C na površino PET folij adsorbiran hitozan (kopelno razmerje 1:50). Nato so bili vzorci temeljito izpirani, dokler ni bila dosežena konstantna prevodnost vode po izpiranju. Folije smo posušili s pomočjo vakuumskega sušilnika. Na plast hitozana so bili v naslednjem koraku adsorbirani še različni sulfatirani polisaharidi (fukoidan, sulfatiran hitozan, sulfatiran dekstran, sulfatiran galaktoglukomanan) ter heparin. Adsorpcija fukoidana in heparina sta bili izvedeni pri 40 °C. Koncentracija vodne raztopine hitozana je znašala 0,6 %. Adsorpcijo sulfatiranega hitozana pa je bila izvedena iz 0,3 % vodne raztopine, pri pH 7,4.

Po teh obdelavah površin PET folij je bila opravljena rentgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS) z namenom preverjanja uspešnosti površinskih modifikacij. Površinska atomska vsebnost (at. %) hidrolizirane in z različnimi polisaharidi obdelane PET folije je podana v preglednici 2-2. Iz preglednice 2-2 je razvidno, da se je na površinsko modificiranih vzorcih povečala vsebnost žvepla, kar dokazuje, da je bilo tako sulfatiranje, kot tudi nanašanje polisaharidov na vzorec uspešno.

Preglednica 2-2: Rezultati določanja koncentracije kemičnih elementov na površini vzorcev

PET folij v at. % s pomočjo XPS analize [46].

Vzorec	C	O	N	S	Na	Si	Ca	Al	K	P
PET-H	72,86	27,06	/	/	/	0,07	/	/	0,01	/
PET-HC	63,8	30,2	2,7	/	/	0,6	/	2,0	/	0,8
PET-HCF	59,9	34,15	2,9	1,15	1,05	0,4	0,45	/	/	/
PET-HCSH	45,4	40,3	5,4	6,25	2,05	0,4	0,2	/	/	/
PET-HCHEP	52,55	37,7	5,25	2,65	1,0	0,95	/	/	/	/

2.2.2. In-vitro določanje krvne skladnosti materiala

2.2.2.1. Metoda določanja prostega hemoglobina

Namen raziskovalne naloge je bil vpeljava hitre in učinkovite metode za določanje trombogenosti biomaterialov. Na osnovi obširnega pregleda literature je bilo ugotovljeno, da so se različni raziskovalci posluževali najrazličnejših pristopov in metod. D. Lu s sodelavci v članku »Specific activities of Chinese lacquer polysaccharides« [55], ter S. Sagnela s sodelavci v članku »Chitosan based surfactant polymeres designet to improve blood compatibility on biomaterials« [55] se v svojih študijah poslužujeta plazme bogate s trombociti. V študijah K. J. Leeja s sodelavci, v članku »Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylted chitosan deerivats« [55], ter Y. Imaiya s sodelavci v članku »A new method for evalvulation of antithrombogeneity of materials« [55] se oba avtorja poslužujeta sicer krvi, ki pa jo po odvzetju obdelata s Na-citratom. K. J. Lee s sodelavci, v nasprotju z našo metodo, trombogenost materiala določa s pomočjo reologije krvi

Prav vsak od teh pristopov je imel nekatere pomanjkljivosti, saj je izvedba eksperimentov in-vitro s svežo krvjo izredno kompleksna.

Na osnovi študija objav s tega področja smo kot najprimernejšo izbrali metodo, ki jo je opisal N. Huang s sodelavci v svoji študiji o »Hemocomatibility of titanium oxide films«, pri kateri so s pomočjo spektroskopske metode določali količino sproščenega hemoglobina po določenem času izpostavitve krvi površini biomateriala [55]. Za metodo smo se odločili, ker je bila najpreprostejša za izvedbo in je omogočala največjo ponovljivost rezultatov.

Optimiranje metode

Metoda po Huang in sod. predvideva doziranje 0,1 mL sveže odvzete krvi na površino titanijevega oksida. Po določenem času (10, 20, 30, 40, 50 min) se koagulacijska kaskada prekine z dodatkom 25 mL destilirane vode. Eritrociti, ki niso ujeti v nastajajoči trombi, so podvrženi hemolizi. Tako pride do sprostitve hemoglobina, ki se ga kvantificira po 5 min z uporabo kolometrične metode določanja absorbance raztopine pri valovni dolžini 540 nm.

Po izvedbi metode v skladu s tem postopkom smo ugotovili, da so bila za ločevanje različno obdelanih PET površin sipanja rezultatov prevelika. Opisana metoda se je izkazala za premalo natančno. Zato smo se odločili za postopek optimizacije metode, kjer smo analizirali predvsem:

1. Vpliv pH raztopine uporabljene za inkubacijo vzorcev

Zaradi nizkega pH destilirane vode smo predvidevali, da ob sprostitvi hemoglobina po hemolizi eritrocitov, pride do konformacijskih sprememb le tega in posledično do vpliva na standardno deviacijo izmerjenih rezultatov. Z namenom, določitve vpliva pH na ponovljivost rezultatov, smo izvedli študijo, pri kateri smo za inkubacijo vzorcev uporabili destilirano vodo (pH 5,0-5,3), ter fosfatni pufer (pH 7,2-7,4). Standardna odstopanja obeh skupin rezultatov smo primerjali med seboj.

2. Vpliv temperature odvzete krvi

Ker je izvorna metoda predvidevala uporabo sveže neobdelane krvi. Pri uporabi takšne krvi nastajajo problemi takoj po odvzemu, saj mora biti čas med odvzemom in doziranjem na vzorec čim krajši zaradi reakcij, ki potekajo v krvi v tem času. Ker smo želeli uporabiti čimbolj nespremenjeno kri, ki ji nismo želeli dodajati antikoagulantov ali kakršnih koli drugih kemikalij, smo želeli proučiti uporabo postopka ohlajevanja krvi po odvzemu. Kri smo torej ohlajali z namenom zavrtja koagulacijske kaskade do trenutka doziranja na vzorec. Primerjali smo standardna odstopanja rezultatov, ki smo jih dobili po izvedbi poizkusa z ne ohlajeno krvjo (37°C), ter standardna odstopanja rezultatov, ki smo jih dobili po izvedbi poizkusa s krvjo, ohlajeno na 2-5 °C.

3. Vpliv hitrosti stresanja vzorcev

Pri izvedbi izvorne metode smo ugotovili, da kri zelo počasi difundira od strdka po celotni raztopini. Zaradi tega smo uvedli pazljivo stresanje inkubiranih vzorcev in s tem boljšo difuzijo prostega hemoglobina po celotni raztopini. Da bi ugotovili idealno

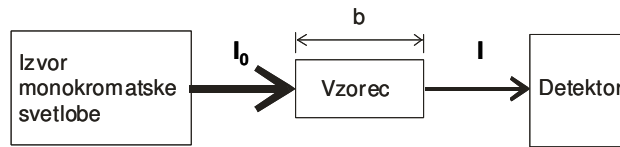
hitrost stresanja vzorcev, smo eksperiment izvajali pri različnih hitrostih stresanja, in sicer 40 obratov/s in 120 obratov/s. Opravili smo primerjavo standardnih odstopanj merilnih rezultatov.

Izvedba optimirane metode določanja prostega hemoglobina

Na osnovi optimizacije metode določanja prostega hemoglobina smo natančno definirali vse ključne pogoje merjenja in le-to uporabili pri izvedbi metode na različno modificiranih vzorcih PET folij. PET folijo smo narezali na vzorce pravokotne oblike, velikosti 8 x 20 mm. Narezane vzorce smo pazljivo spirali z 98 % raztopino etanola, ter sušili v vakuumskem sušilniku pri temperaturi 37°C 24 ur. Tako pripravljene vzorce smo namestili v 50 mL čaše, nameščene v vodni kopeli, s temperaturo vode 37°C. Kri, ki smo jo uporabili za izvedbo poskusa, je bila neposredno pred izvedbo eksperimenta odvzeta zdravim donatorjem moškega spola. Donirana kri ni bila obdelana z antikoagulacijskimi sredstvi, prav tako ni bila ohlajena, saj so poizkusi med procesom optimizacije metode pokazali, da hlajenje krvi ne doprinese veliko k zmanjšanju sipanja rezultatov. Takoj po odvzetju krvi smo natanko 0,1 mL sveže, neobdelane krvi odpipetirali na vzorce PET folij, nameščene v čašah v termostatski kopeli. Čaše smo stresali s 40 obrati/min določen čas (10, 20, 30, 40, 50 min), ko smo z dodatkom fosfatnega pufra prekinili koagulacijsko kaskado (slika 2-5). Eritrociti, ki niso bili ujeti v strdek, ki je nastajal na vzorcu, so bili po dodatku pufra podvrženi hemolizi in hemoglobin se je sprostil v raztopino (slika 2-6). Količino hemoglobina v raztopini smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 540 nm. za vsako merilno točko oz. čas (10, 20, 30, 40, 50 min) smo izvedli pet paralelnih meritev.

Spektrofotometrija je absorpcijska molekulska metoda. Koncentracijo obarvanega vzorca ugotovimo z merjenjem absorpcije monokromatske svetlobe, pri prehodu skozi raztopino vzorca. Uporabljamo monokromatsko svetlobo v UV (190-350nm) ali vidnem (VIS) področju (350-800nm), ki povzroča v molekulah spremembe v elektronskih stanjih.

Kadar svetloba prehaja skozi vzorec, predstavlja absorbirana svetloba razliko med intenziteto vpadne svetlobe in intenziteto izhodne svetlobe. Količino absorbirane svetlobe izražamo kot absorbanco (A) ali kot transmitanco oz. prepustnost (T).



Slika 2-4: Shematski prikaz aparature za spektrofotometrijo

Prepustnost ali transmitanca je definirana kot:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2-1)$$

Kjer je

T - prepustnost (transmitanca)

I - intenziteta izhodne svetlobe

I_0 - intenziteta vpadne svetlobe

Absorbanca pa je definirana kot:

$$A = -\log T \quad (2-2)$$

Oziroma:

$$A = -\log \frac{I_0}{I} = \epsilon b C \quad (2-3)$$

Kjer je

ϵ - absorptivnost [$\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$]

b - dolžina svetlobne poti [cm]

C - koncentracija [mol/L]

Intenziteta monokromatske svetlobe pri potovanju skozi raztopino eksponentno pojema z razdaljo, absorbanca pa je linearno sorazmerna dolžini poti skozi raztopino. Pri merjenju absorbance izberemo tisto valovno dolžino (λ_m) pri kateri je absorptivnost maksimalna. Enačba 3.3 je znana kot Beerov zakon. Beerov zakon velja samo za monokromatsko svetlobo in za raztopine nizkih koncentracij (pri višjih koncentracijah zveza ni več linearna).

Koncentracijo določimo na osnovi primerjave absorbance za vzorec in standard

$$A = k C_x; \quad A = k C_s \quad (2-4)$$

Kjer se indeks x nanaša na vzorec, indeks s pa na standard. Iz enačb dobimo za koncentracijo vzorca izraz

$$\Rightarrow \quad \frac{A_x}{A_s} = \frac{C_x}{C_s} \quad C_x = C_s \frac{A_x}{A_s} \quad (2-5)$$

Absorbanco merimo s spektrofotometri. Enostavni instrumenti so enožarkovni, pri dvožarkovnih istočasno merimo vzorec in primerjalno raztopino ter oba signala odštevamo.

Aparatura in pogoji dela

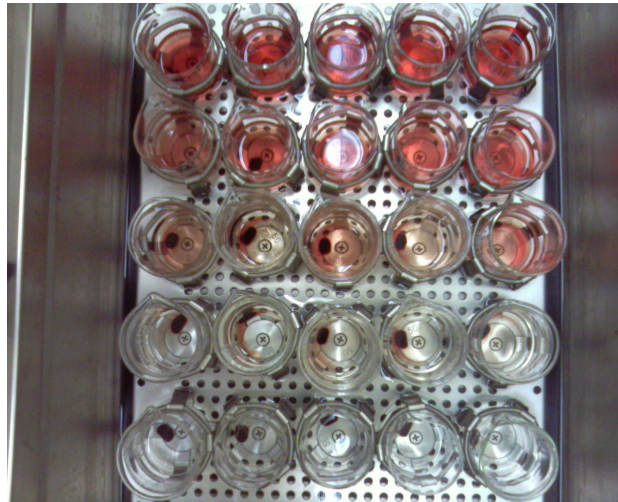
Za meritve absorbance inkubacijskih raztopin smo uporabljali »čitalec mikrotiterskih plošč« (Microplatereader) z modulom za merjenje absorbance v kivetah, TECAN Infinite M200.

Spektrofotometer je sestavljen iz naslednjih komponent:

- **vir svetlobe:** volframova žarnica za Vis, devterijeva za UV področje ali ksenonova za celotno področje
- **monokromator:** prizma ali uklonska mrežica, valovno dolžino lahko izbiramo tudi z optičnimi filtri
- **detektor:** fotocelica, fotopomnoževalka ali fotodioda



Slika 2-5: Inkubacija vzorcev s fosfatnim pufrom



Slika 2-6: Disperzija prostega hemoglobina v fosfatnem pufru

2.2.2.2. Določanje oblike in števila trombocitov

V literaturi so opisane številne metode kako lahko s pomočjo SEM opazuje spremembe trombocitov, ki nastanejo ob stiku z trdnim materialom. M. Kuwahara s sodelavci v članku z naslovom »Platelet shape changes adhesion under high shear flow« metodo, opisuje metodo, kjer s pomočjo epifluorescenčnega mikroskopa določajo faze aktivacije trombocitov [55]. Nato trombocite v želeni fazi fiksirajo s pomočjo glutaraldehida in jih opazujejo s SEM. Ta metoda je zelo zamudna, zato smo se mi odločili za metodo, ki jo opisuje S. Takemoto s sodelavci, v članku »Platelet adhesion on titanium oxide gels, effect of surface oxidation« [55]. Pri tej metodi odpipetiramo na vzorce plazmo. Po določenem času, s površine speremo neaktivirane trombocite. Trombocite, ki so se aktivirali, nato fiksiramo s pomočjo glutaraldehida, ter vzorce opazujemo s pomočjo SEM.

Izvedba metode

Priprava vzorcev za SEM analizo

Priprava plazme

Za pripravo plazme je bilo odvzeta ena epruveta (5mL) krvi, ki je vsebovala 3,6mL raztopine Na-citrata. Epruveto smo 10min ohlajali na ledu. Kri smo nato odpipetirali v dve 2mL veliki epruvete (2x1,5mL), ki smo jih pri temperaturi 4°C centrifugirali pri 300g.

S tem postopkom smo pridobili 1mL plazme, ki je vsebovala $3,5 \times 10^8$ trombocitov/l (trombociti so bili prešteti s pomočjo Burker – Turk Haemocytometra), ki smo jo za 25min ohlajali na ledu. Preden smo plazmo odpipetirali na vzorce smo jo ogreli na 37°C.

Pripravili smo po 2 PET-H(-), PET-HC(+) in PET foliji (10 x 10 mm). Na vsako smo dodali 0,05 mL plazme in inkubirali 30 min. Po 30 min je sledila fiksacija.

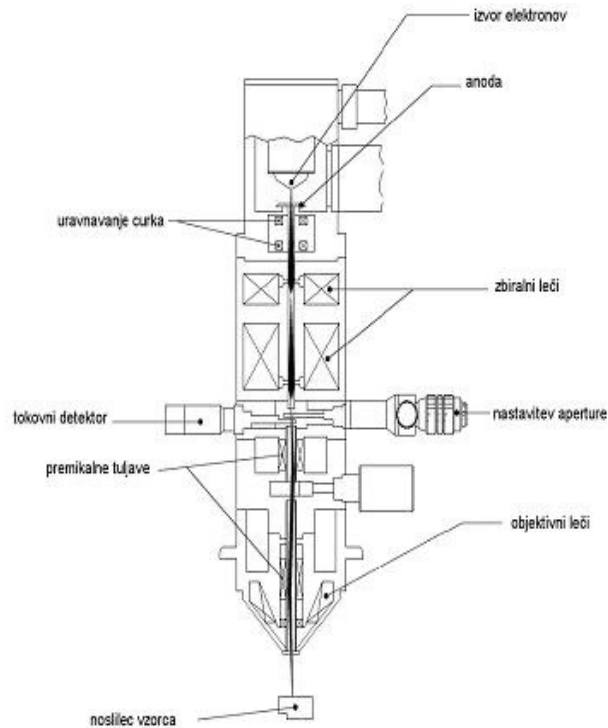
Fiksacija

Po 30 min smo trikrat nežno sprali vzorce z raztopino fosfatnega pufra. S tem smo dosegli, da se je večina trombocitov, ki ni reagirala z vzorci, sprala s površine. Nato smo vzorce potopili v 2% raztopino glutaraldehida, ter 1% raztopino osmične kisline, kjer smo jih pustili 1 uro. S pomočjo glutaraldehida smo dosegli fiksacijo trombocitov na površini vzorcev. Vzorce smo sprali z destilirano vodo. Postopno dehidracijo vzorcev smo dosegli s pomočjo raztopine t-butanol in destilirane vode. Vzorce smo postopoma izpostavljali vedno večji koncentraciji alkohola (50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5, 100/0). Po dehidraciji smo pri kritični točki sušili vzorce preko noči [55].

Pripravljene in fiksirane vzorce folije smo s pomočjo ogljikovega lepilnega traku zlepili na posebne nosilce za elektronsko mikroskopijo. Nosilce smo namestili v komoro FESEM in opazovali obliko in število trombocitov na površini.

Aparatura in pogoji dela

Za opazovanje oblike in določanje števila prilepljenih trombocitov na površine vzorcev PET folij smo uporabljali vrstični elektronski mikroskop FESEM Supra VP35 firme C. Zeiss. Mikroskop je opremljen s 3. generacijo kolone za poljsko emisijo Gemini, visoko zmogljivim »In-lens« detektorjem sekundarnih elektronov ter možnostjo uporabe variabilnega pritiska. Vse to omogoča visoko resolucijo tudi pri zelo nizkih napetostih (0.1 kV) in na ta način opazovanje neprevodnih vzorcev tudi brez posebne predpriprave.



Slika 2-7: Shema vrstičnega elektronskega mikroskopa

Vrstični elektronski mikroskop je mikroskop, ki za izdelavo slike površine uporablja curek elektronov (slika 2-7). Curek elektronov prehaja preko raziskovane površine tako, da jo tipa v obliki cik-caka in na osnovi tega »pridobiva« informacije s površine vzorca in proizvaja sliko. Sestavljen je iz elektronske puške, ki proizvaja snop pospešenih elektronov, elektronskih leč, ki služijo za fokusiranje in odklanjanje elektronskega curka, detektorjev, ki zaznavajo učinke in posledice trkov elektronskega curka ob vzorec (sekundarne elektrone, odbite elektrone, različna elektromagnetna valovanja, ki nastanejo pri interakciji elektronskega snopa z vzorcem) ter krmilja za optimiranje pogojev dela in prikaz slike. Poleg tega je potrebna tudi vakuumska enota, ki zagotavlja v komori dovolj nizke tlake za prost prehod elektronov.

Ločljivost elektronskega mikroskopa je 100 krat večja kot pri svetlobnem mikroskopu, prav tako ima tudi izjemno globinsko ostrino in sicer do 0,05 mm, kar je 1000 krat boljše kot pri svetlobnem mikroskopu.

2.3. Rezultati

2.3.1. Rezultati določanja prostega hemoglobina

2.3.1.1. Rezultati optimiranja metode

1. Analiza vpliva pH raztopine za inkubacijo vzorcev

Rezultati določanja vpliva pH raztopin za inkubacijo vzorcev na raztros merilnih rezultatov absorbance raztopin so predstavljeni v preglednici 2-3.

Preglednica 2-3: Srednje vrednosti določanja absorbanc inkubacijskih raztopin (A_1 – destilirana voda - pH 5,3; A_2 – fosfatni pufer – pH 7,4) in odgovarjajoče standardne deviacije meritev

	A_1	STD	A_2	STD
0 min	0,404	0,064	0,508	0,003
10 min	0,367	0,064	0,450	0,024
20 min	0,282	0,075	0,235	0,029
30 min	0,198	0,050	0,080	0,041
40 min	0,173	0,071	0,004	0,003
50 min	0,154	0,051	0,001	0,002

V preglednici so predstavljene srednje vrednosti merjenja absorbanc na petih vzporednih vzorcih inkubacijskih raztopin po določenem času inkubacije in pri različnem pH (A_1 – destilirana voda - pH 5,3; A_2 – fosfatni pufer – pH 7,4), in odgovarjajoče standardne deviacije.

2. Analiza vpliva temperature odvzete krvi

Rezultati določanja vpliva temperature odvzete krvi na raztros rezultatov absorbance raztopin so predstavljeni v preglednici 2-4.

V preglednici so predstavljene srednje vrednosti merjenja absorbanc na petih vzporednih vzorcih inkubacijskih raztopin po določenem času inkubacije po predhodnem ohlajanju krvi (A_1); oz. brez predhodnega ohlajanja krvi (A_2) in odgovarjajoče standardne deviacije.

Preglednica 2-4: Srednje vrednosti določanja absorbcanc inkubacijskih raztopin (A_1 – brez ohlajanja krvi; A_2 – ohlajanje krvi), in odgovarjajoče standardne deviacije meritev

	A_1	STD	A_2	STD
0 min	0,564	0,002	0,558	0,004
10 min	0,422	0,039	0,421	0,028
20 min	0,192	0,018	0,220	0,037
30 min	0,039	0,029	0,016	0,011
40 min	0,004	0,003	0,004	0,002
50 min	0,001	0,001	0,002	0,003

3. Analiza vpliva hitrosti stresanja vzorcev

Rezultati določanja vpliva hitrosti stresanja inkubiranih vzorcev na raztros merilnih rezultatov absorbance raztopin so predstavljeni v preglednici 2-5. V preglednici so predstavljene srednje vrednosti merjenja absorbanc na petih vzporednih vzorcih raztopin po določenem času inkubacije in pri določeni hitrosti stresanja (A_{40} – 40 obratov/min; A_{120} – 120 obratov/min) in odgovarjajoče standardne deviacije.

Preglednica 2-5: Srednje vrednosti določanja absorbcanc inkubacijskih raztopin pri različnih hitrostih stresanja (A_{40} – 40 obratov/min; A_{120} – 120 obratov/min) in odgovarjajoče standardne deviacije meritev

	A_{40}	STD	A_{120}	STD
0min	0,597	0,003	0,404	0,064
10min	0,602	0,046	0,185	0,280
20min	0,390	0,035	0,179	0,236
30min	0,183	0,080	0,101	0,116
40min	0,079	0,059	0,049	0,028
50min	0,034	0,037	0,012	0,014

2.3.1.2. **Rezultati določanja trombogenosti različno obdelanih PET folij**

Rezultati določanja trombogenosti različno obdelanih PET površin in stekla so predstavljeni v preglednicah 2-6 do 2-12. V preglednicah so predstavljene meritve absorbanc, opravljene po različnih časih inkubacije (0 do 50 min) na po petih paralelnih vzorcih (A_1 – A_5), srednje

vrednosti absorbanca (A_{sred}), odgovarjajoče standardne deviacije (STD) in delež hemoglobina v raztopinah glede na vsebnost pri času 0 min.

Rezultati določanja trombogenosti površine stekla so prikazani v preglednici 2-6.

Iz preglednice je razvidno, da se je steklo po pričakovanih pokazalo kot zelo trombogena površina. Že po 10 minutah stika med stekleno površino in kapljico krvi se v pufersko raztopino sprosti le 65 % hemoglobina. Po 20 minutah je ta delež enak 12 %, po 30 minutah pa prostega hemoglobina v raztopini ni bilo več mogoče zaznati.

Preglednica 2-6: Rezultati določanja trombogenosti stekla

Čas inkubacije	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
A ₁	0,546	0,390	0,195	0,003	0,001	0,000
A ₂	0,540	0,305	0,180	0,003	0,001	0,002
A ₃	0,543	0,358	0,062	0,000	0,003	0,000
A ₄	0,544	0,334	0,067	0,003	0,005	0,006
A ₅	0,543	0,391	0,154	0,012	0,001	0,001
A_{sred}	0,543	0,356	0,132	0,004	0,002	0,002
delež hemoglobina /%	100	65,59	24,24	0,76	0,39	0,32
STD	0,002	0,037	0,063	0,005	0,002	0,002

Rezultati določanja trombogenosti vzorca PET-HCHEP so prikazani v preglednici 2-7.

Iz preglednice je razvidno, da je PET-HCHEP vzorec popolno nasprotje stekla. Delež prostega hemoglobina pada zelo počasi in je pri 20 minutah enak 84 %. Tudi kasneje ostane delež prostega hemoglobina zelo visok vse do 40 minute, kjer je enak 63 %. Pri 50 minutah še vedno zabeležimo 42 % prostega hemoglobina.

Preglednica 2-7: Rezultati meritev trombogenosti vzorca PET-HCHEP

Čas inkubacije	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
A ₁	0,579	0,542	0,477	0,448	0,352	0,310
A ₂	0,598	0,540	0,485	0,430	0,356	0,269
A ₃	0,592	0,501	0,498	0,408	0,377	0,218
A ₄	0,595	0,554	0,532	0,469	0,402	0,254
A ₅	0,598	0,539	0,485	0,441	0,366	0,188
A_{sred}	0,592	0,535	0,495	0,439	0,371	0,247
delež hemoglobina /%	100	90,37	83,70	74,16	62,67	41,89
STD	0,008	0,020	0,022	0,023	0,020	0,047

Nesulfatirani vzorci

Prve meritve so obsegale merjenje trombogenosti neobdelanega in hidroliziranega PET (PET, PET-H) ter PET obdelanega z nesulfatiranim hitozanom (PET-HC).

Rezultati določanja trombogenosti neobdelanega PET vzorca so prikazani v preglednici 2-8. Iz preglednice je razvidno, da se neobdelan PET vzorec po 10 minutah obnaša podobno kot heparinizirana folija (89 %), pri 20 minutah pa se ta rezultat razpolovi (46 %). Pri 30 minutah je ta delež še 16 %, medtem ko pri 40 minutah več ne zaznamo prostega hemoglobina.

Preglednica 2-8: Rezultati meritev trombogenosti PET vzorca

Čas inkubacije	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
A ₁	0,508	0,439	0,258	0,033	0,007	0,000
A ₂	0,505	0,422	0,245	0,120	0,001	0,000
A ₃	0,506	0,468	0,262	0,038	0,004	0,004
A ₄	0,505	0,438	0,195	0,100	0,001	0,000
A ₅	0,513	0,481	0,212	0,109	0,006	0,001
A_{sred}	0,508	0,450	0,235	0,080	0,004	0,001
delež hemoglobina%	100	88,56	46,35	17,78	0,79	0,20
STD	0,003	0,024	0,029	0,041	0,003	0,002

Rezultati določanja trombogenosti PET-H vzorca so prikazani v preglednici 2-9.

Iz preglednice je razvidno, da so rezultati, izmerjeni v prvih 10 minutah (76 %) bolj podobni rezultatom, ki smo jih opazili pri steklu, vendar je delež hemoglobina nato padal počasneje kot pri neobdelani PET foliji, zaradi česar smo dobili zelo podobne rezultate obeh folij pri 20 (45 %) in 30 minutah (14 %). Pri 40 minutah hemoglobina v raztopini ni bilo mogoče zaznati.

Preglednica 2-9: Rezultati meritev trombogenosti PET-H vzorca

Čas inkubacije	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
A ₁	0,555	0,474	0,297	0,125	0,016	0,007
A ₂	0,579	0,421	0,260	0,065	0,010	0,001
A ₃	0,578	0,431	0,242	0,106	0,011	0,000
A ₄	0,577	0,436	0,273	0,012	0,003	0,002
A ₅	0,576	0,428	0,221	0,107	0,001	0,000
A_{sred}	0,573	0,43786	0,258	0,083	0,008	0,002
delež hemoglobina%	100	76,64	45,50	14,49	1,40	0,35
STD	0,010	0,021	0,029	0,045	0,006	0,003

Rezultati določanja trombogenosti vzorca PET-HC so prikazani v preglednici 2-10.

Iz preglednice je razvidno, da je vzorec PET-HC nekoliko manj trombogen v prvih 10 minutah (84 %) v primerjavi s PET-H (76 %). Po 20 minutah je bil delež prostega hemoglobina v enakem območju kot pri drugih dveh folijah (42 %), nato pa so se vrednosti strmo znižale, saj je bil hemoglobin v raztopini po 30 minutah prisoten le v 2 %.

Preglednica 2-10: Rezultati meritev trombogenosti PET-HC vzorca

Čas inkubacije	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
A ₁	0,548	0,473	0,257	0,015	0,004	0,014
A ₂	0,544	0,46	0,262	0,016	0,001	0,002
A ₃	0,545	0,482	0,116	0,008	0,037	-1E-04
A ₄	0,543	0,452	0,208	0,007	0,001	0,01
A ₅	0,544	0,41	0,312	0,011	0,002	0,001
A_{sred}	0,545	0,455	0,231	0,011	0,009	0,005
delež hemoglobina%	100	83,60	42,40	2,10	1,70	0,90
STD	0,002	0,028	0,074	0,004	0,016	0,006

Sulfatirani vzorci

Naslednje meritve so obsegale merjenje trombogenosti PET površin, obdelanih s sulfatiranimi polisaharidi (PET-HCF in PET-HCSH). V tem sklopu meritev smo pričakovali nižjo trombogenost površin, saj je bil kemizem površine vzorcev bolj podoben heparinu (večja vsebnost žvepla na površini folije).

Rezultati določanja trombogenosti vzorca PET-HCF so prikazani v preglednici 2-11.

Iz preglednice je razvidno, da vzorec PET-HCF na začetku (10 do 30 min) presenetljivo kaže celo boljšo skladnost s krvjo (nižjo trombogenost) kot vzorec PET-HCHEP (97, 85 in 76 % v primerjavi z 90, 84 in 74 %), vendar se je po 40 min delež prostega hemoglobina močneje znižal kot pri vzorcu, obdelanem s heparinom (PET-HCHEP). Pri tem vzorcu smo opazili nekoliko višjo standardno deviacijo med posameznimi paralelkami, do katere je najverjetneje prišlo zaradi neenakomernosti sloja fukoidana na PET-HC foliji.

Preglednica 2-11: Rezultati meritev trombogenosti vzorca PET- HCF

Čas inkubacije	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
A ₁	0,576	0,551	0,394	0,404	0,335	0,219
A ₂	0,574	0,547	0,509	0,429	0,209	0,254
A ₃	0,575	0,548	0,477	0,448	0,245	0,097
A ₄	0,573	0,571	0,555	0,444	0,348	0,294
A ₅	0,545	0,538	0,495	0,450	0,279	
A_{sred}	0,569	0,551	0,486	0,435	0,283	0,216
delež hemoglobina%	100	96,66	85,41	76,45	49,97	37,96
STD	0,013	0,012	0,059	0,019	0,059	0,085

Rezultati določanja trombogenosti vzorca PET-HCSH so prikazani v preglednici 2-12.

Iz preglednice je razvidno, da se je vzorec PET-HCHS v prvih 10 minutah obnašal zelo podobno heparinizirani foliji, nato pa se je že po 20 minutah delež prostega hemoglobina znižal na 76 %. Po 30 minutah se je razlika v primerjavi s PET-HCHEP folijo še povečala (54 %) in se po 40 in 50 minutah ustalila pri 28 %. Tudi pri tem vzorcu je bilo opaziti večjo standardno deviacijo med posameznimi paralelkami, ki je verjetno nastala zaradi neenakomernosti sloja sulfatiranega hitozana.

Preglednica 2-12: Rezultati meritev trombogenosti vzorca PET-HCHS

Čas inkubacije	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
A ₁	0,597	0,519	0,488	0,391	0,289	0,134
A ₂	0,602	0,550	0,504	0,352	0,086	0,239
A ₃	0,595	0,525	0,412	0,250	0,204	0,316
A ₄	0,591	0,543	0,471	0,316	0,088	0,068
A ₅		0,531	0,435	0,298	0,180	0,074
A_{sred}	0,596	0,533	0,462	0,321	0,169	0,166
delež hemoglobina%	100	89,6	77,52	53,86	28,36	27,85
STD	0,005	0,012	0,037	0,053	0,086	0,108

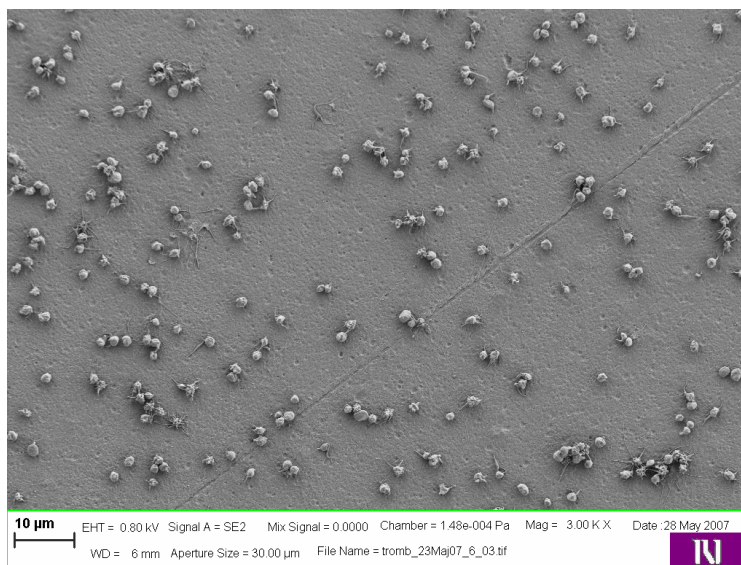
2.3.2. Rezultati določanja oblike in števila trombocitov

Kot podporo študiji krvne skladnosti materialov s pomočjo »metode prostega hemoglobina«, smo na referenčnih vzorcih izvedli tudi analizo oblike (aktivacije) in števila trombocitov s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije. Želeli smo preveriti ali je tudi na različno obdelanih PET površinah možno ločiti vse tri faze aktivacije trombocitov kot jih navajajo M.

Kuwahara in sodelavci v njihovi študiji z naslovom »Platelet Shape Changes and Adhesion Under High Shear Flow« [55].

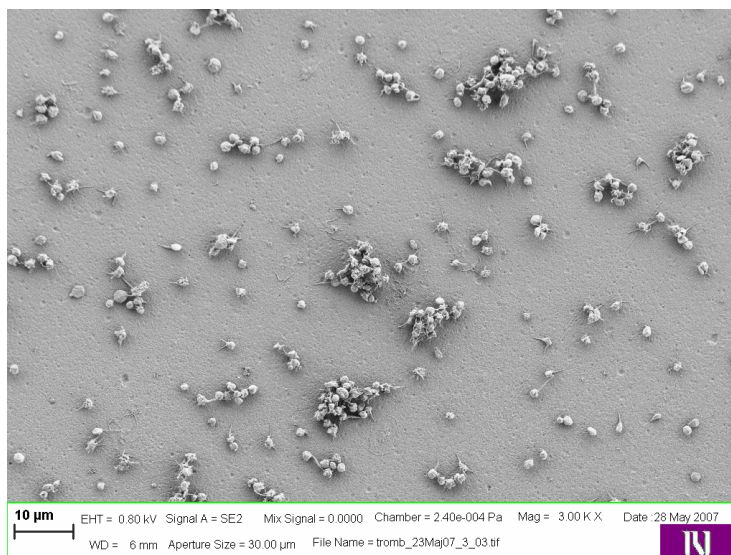
Opazovane površine vzorcev smo vrednotili, glede na število trombocitov v vidnem polju pri določeni povečavi in glede na stopnjo aktivacije (obliko) trombocitov. Ker je priprava bioloških vzorcev za elektronsko mikroskopijo izredno zahtevna, smo izmed vzorcev za analizo izbrali tiste z ekstremnimi lastnostmi, in sicer: neobdelan vzorec PET, močno trombogen vzorec PET-HC in s heparinom obdelan vzorec PET-HCHEP.

Ugotovljeno je bilo, da je povečava 3000 X najprimernejša za te vrste analizo, saj se v tem primeru zajame dovolj velika površina vzorca, obenem pa so oblike trombocitov dobro razpoznavne. Napravili smo po 20 posnetkov površine vsakega vzorca določili povprečno število trombocitov v vidnem polju.



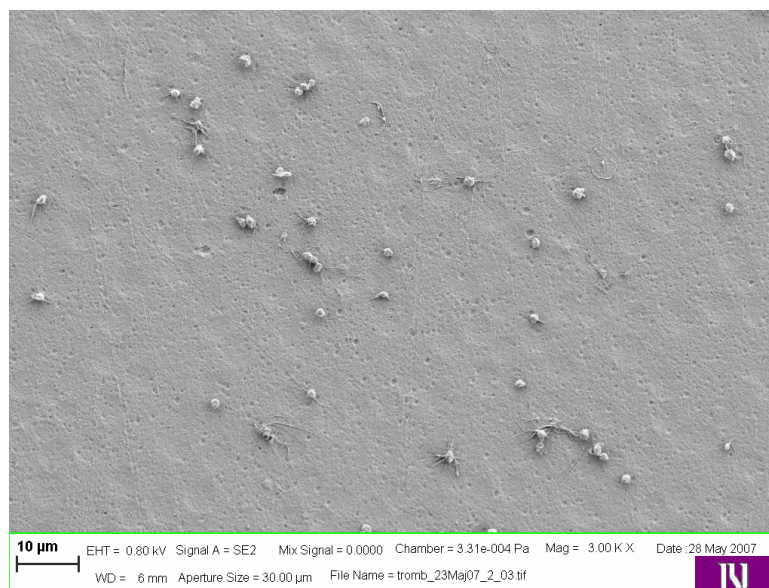
Slika 2-8 : Trombociti na površini vzorca neobdelane PET folije

Slika 2-8 prikazuje vzorec PET folije pri povečavi 3000 X. Vsi trombociti so glede na obliko v 2. oz. 3. fazi aktivacije, saj imajo večinoma hemisferno (sploščeno/razlito) obliko z jasno izraženimi filopodi. Povprečno število trombocitov v vidnem polju pri 3000 X povečavi na površini tega vzorca je bilo 173 ± 29 .



Slika 2-9 : Trombociti na površini vzorca, obdelanega s hitozanom (PET-HC)

Tudi trombociti na površini PET folije, obdelane s hitozanom so glede na obliko v glavnem v drugi fazi aktivacije (Slika 2-9) Že na prvi pogled pa lahko ugotovimo, da je na tem vzorcu prilepljenih več trombocitov, ki se nahajajo v večjih skupkih. Povprečno število trombocitov določeno na tem vzorcu je bilo 185 ± 57



Slika 2-10 : Trombociti na površini vzorca, obdelanega s heparinom (PET-HCHEP)

Trombociti na površini vzorca, obdelanega s heparinom so po obliki v glavnem v 1. fazi aktivacije, saj so kroglaste oblike in le redki imajo nakazane filopode (slika 2-10) Povprečno število trombocitov v vidnem polju pri 3000 X povečavi je bilo 82 ± 62 .

Kakovostno vrednotenje rezultatov je pri tej metodi mogoče samo pri velikih povečavah, kar pa onemogoči istočasno določanje števila prilepljenih trombocitov . Za bolj točno analizo oblike in števila trombocitov bi bilo potrebno natančno optimiranje metode vrednotenja in natančna definicija pogojev merjenja. Takšno normiranje metode je precej dolgotrajno saj zahteva pripravo in analizo velikega števila različnih vzorcev, zato bo to predmet naših nadaljnjih raziskav.

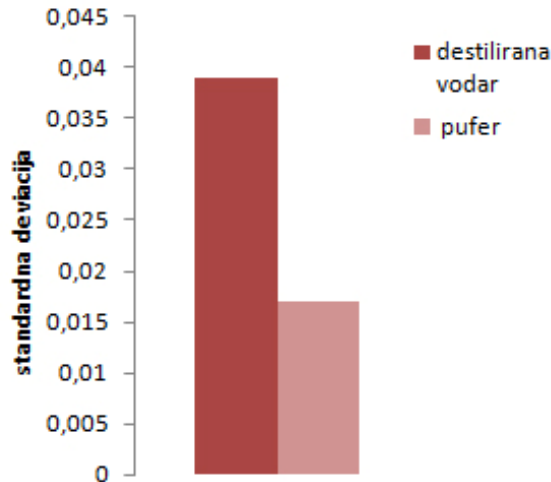
2.4. Diskusija

2.4.1. Določanje prostega hemoglobina

2.4.1.1. Optimiranje metode

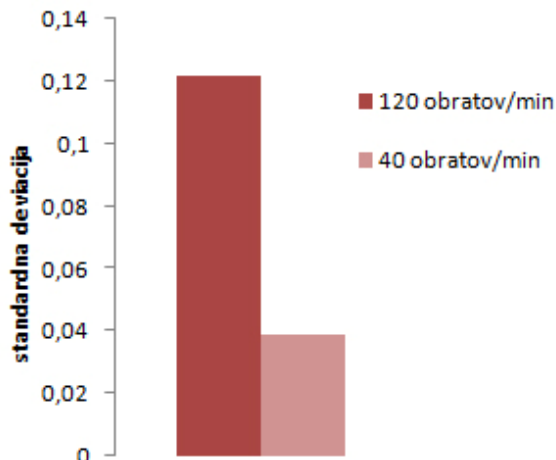
Metoda, ki smo jo povzeli po Huang-u in sod. [55], ni imela zadovoljive ponovljivosti. V študiji optimiranja metode smo se posvetili preučevanju dejavnikov, za katere smo v predhodnih raziskavah ugotovili, da imajo največji vpliv na raztros rezultatov.

V študiji vpliva pH inkubacijske raztopine, smo uporabili destilirano vodo (pH 5,0-5,3), ter fosfatni pufer (pH 7,2-7,4). Pri inkubaciji z destilirano vodo je bil hemoglobin izpostavljen nizkemu pH. V skladu z objavo Kristinsona in sodelavcev [57] hemoglobin pri takšnih nizkih pH zavzame globularno konformacijo. Iz tega smo sklepali, da kot posledica takšne konformacije ne pride do enakomernega sproščanja hema, kar ima lahko za posledico večja odstopanja v izmerjenih absorbancah inkubacijskih raztopin. Naš cilj je bil, da se približamo fiziološkemu pH, kar nam je uspelo z dodatkom fosfatnega pufera. Kot je razvidno iz slike 2-13, smo s tem uspeli zmanjšati standardno odstopanje na zadovoljivo raven. Predvidevamo, da zaradi fiziološkega pH, ni več prihajalo do strukturnih konformacij beljakovinskega dela hemoglobina in s tem je bilo omogočeno bolj enakomerno sproščanje hema iz hemoliziranih eritrocitov.



Slika 2-13: Vpliv dodatka pufru na standardno deviacijo merilnih rezultatov

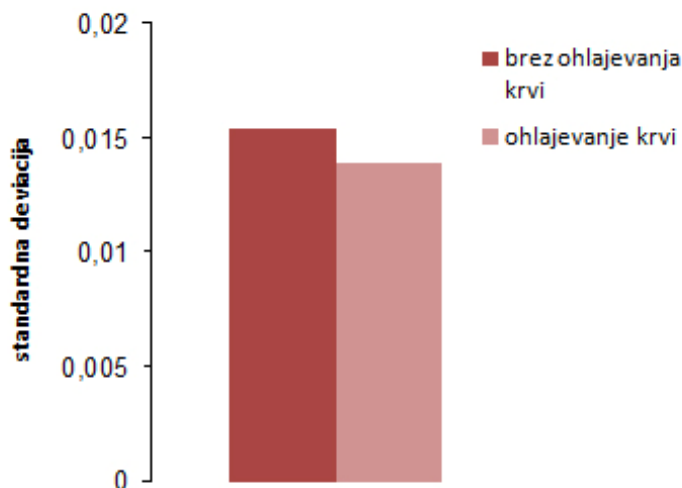
Naslednja težava, s katero smo se soočili med izvedbo metode je bila neenakomerna disperzija sproščenega hemoglobina v raztopini. Opažali smo da se v statični raztopini sproščeni hemoglobin neenakomerno porazdeljuje predvsem na dnu čaše z raztopino. V sklopu optimiranja metode smo določali hitrost stresanja raztopine, ki bi omogočila enakomerno disperzijo in ne bi povzročila dodatnega trganja nastalega strdka s površine vzorca. Iz slike 2-14 je razvidno, da hitrost 120 streslajev na minuto, sicer omogoča enakomerno disperzijo hemoglobina, a prav tako povzroča, da prihaja do trganja nastalega strdka, kar ima za posledico povečano količino prostega hemoglobina v raztopini. Dobljeni rezultati so bili neuporabni, saj je bil standardni raztros merilnih vrednosti velik in razlike med posameznimi vzorci posledično niso bile zaznavne. Ugotovljeno je bilo, da hitrost stresanja 40 streslajev na minuto zagotavlja enakomerno disperzijo hemoglobina ne da bi se strdek dodatno poškodoval. S takšnim načinom izvedbe eksperimenta smo dodatno zmanjšali standardno odstopanje rezultatov in s tem povečali ponovljivost metode.



Slika 2-14: Vpliv hitrosti stresanja na standardno odstopanje rezultatov

Pri postopku optimiranja metode smo preučevali tudi vpliv obdelave antikoagulantna in ohlajanja krvi po odvzemu. Predvidevali smo, da v času od odvzeta do pipetiranja krvi na vzorce že pride do procesa koagulacije. To smo skušali preprečiti z obdelavo krvi z antikoagulanti (natrijev citrat), ki pa ni obrodila sadov, saj nismo uspeli določiti natančne količine antidota (CaCl_2), s katerim bi ponovno omogočili potek koagulacijske kaskade. Predvidevamo, da so bile količine uporabljene krvi na vzorcih (0,1 mL) premale in da je ob dodatku CaCl_2 prišlo do prevelikega razredčenja krvi.

V naslednjem poskusu pa smo želeli koagulacijsko kaskado zavreti za nekaj sekund do nekaj minut s pomočjo ohlajanja krvi. Predvidevali smo, da bomo koagulacijsko kaskado zavrli do trenutka, ko bomo kri odpipetirali na vzorce in jo potem ponovno segreli na temperaturo, ki bi ponovno omogočila koagulacijsko kaskado. Iz slike 2-15 je sicer razvidno, da smo s tem ukrepom uspeli zmanjšati standardno odstopanje rezultatov, a je bilo to zmanjšanje minimalno in ni imelo večjega pomena pri nadaljnjem vrednotenju rezultatov. Odločili smo se, da bomo pri izvedbi metode pred odvzemom krvi ohladili samo epruveto in da po odvzemu krvi ne bomo ohlajali.



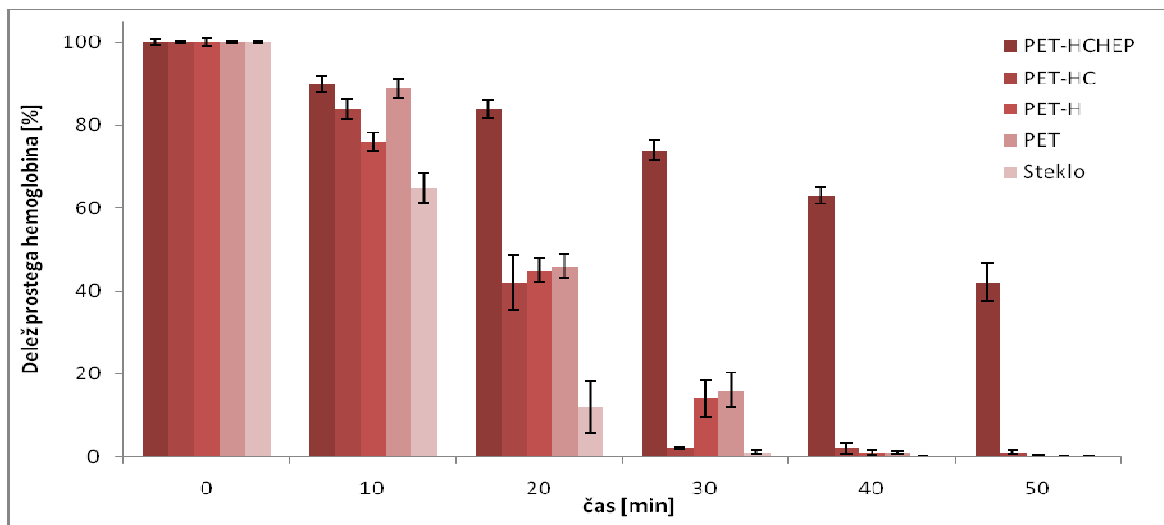
Slika 2-15: Vpliv ohlajanja krvi na standardno odstopanje rezultatov

2.4.1.2. Določanje trombogenosti različno obdelanih PET folij

S pomočjo optimizacije metode določanja prostega hemoglobina, povzete po Huangu in sodelavcih [55] smo dosegli zmanjšanje odstopanja rezultatov, kar je bilo nujno potrebno za zaznavanje razlik med kemično podobnimi vzorci in povečanje ponovljivosti samega poizkusa. Specifika naše raziskave je bila v tem, da smo analizirali PET folije, obdelane z različnimi polisaharidi in heparinom, torej vzorce z zelo podobno površinsko kemično strukturo.

Kot referenčna materiala smo izbrali steklo, ki se po navadi v sorodnih raziskavah uporablja kot standardna trombogena površina in PET folijo z nanosom heparina (PET-HCHEP) kot standardno protitrombogene površino, saj ima heparin zaradi svoje vezave na antitrombin III dobro poznane antitrombogene lastnosti [28] in se v te namene že uporablja za naplastitev žilnih vsadkov. Rezultati so potrdili naša pričakovanja, saj se je delež prostega hemoglobina na steklu zelo hitro znižal s časom stika s površino in ga po 30 minutah v inkubacijski raztopini ni bilo več možno zaslediti. Heparinizirana folija je v nasprotju od stekla pokazala dobre antitrombogene lastnosti. Delež prostega hemoglobina se je namreč s časom stika s površino zelo počasi zniževal in je še po 50 minutah znašal nad 40 %. Nadaljni rezultati, dobljeni na PET površinah so pokazali, da neobdelana PET folija nima dobrih antitrombogenih lastnosti, saj se je po rezultatih bolj približala steklu kot heparinizirani foliji.

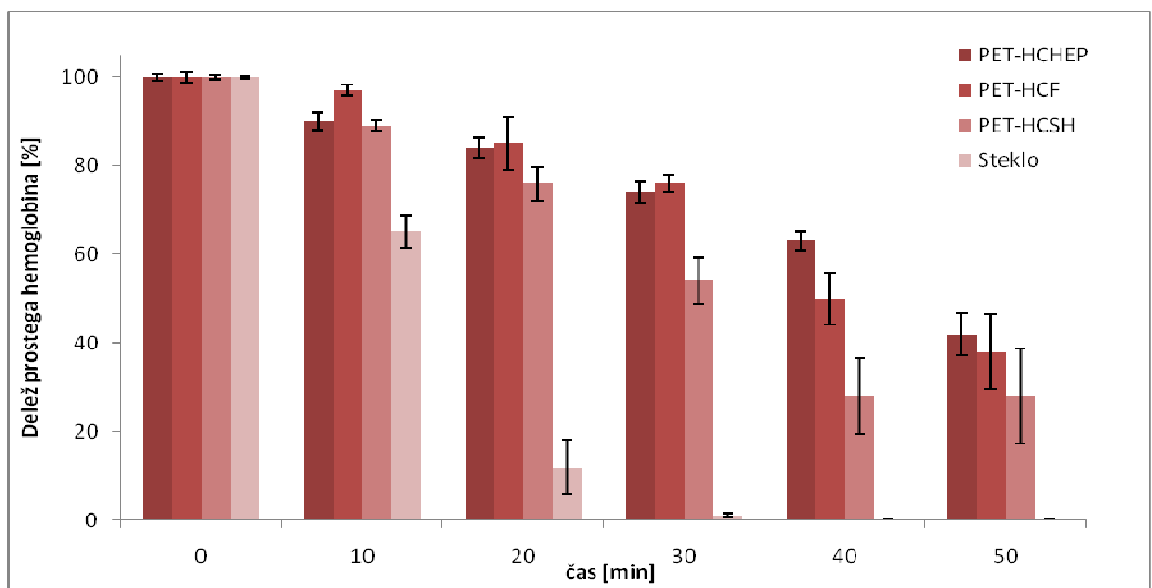
Zelo podobne rezultate smo dobili tudi pri PET-H in PET-HC foliji. S hidrolizo PET folije se na površini poveča število kislih funkcionalnih skupin, kar bi posledično pomenilo slabšo afiniteto do negativno nabitih krvnih celic, obenem pa se s takšno obdelavo poveča tudi specifična površina folije [65], s čimer se je posledično povečala zmožnost adsorpcije molekul. Ta dva nasprotna pojava povzročita, da je vzorec PET-H po obnašanju pri stiku s krvjo podoben neobdelanemu PET vzorcu (slika 2-16).



Slika 2-16: Delež prostega hemoglobina v inkubacijskih raztopinah v odvisnosti od časa stika s površino vzorcev za vzorce, obdelane z nesulfatiranimi polisaharidi

Pri obeh vzorcih smo po 30 min določili še okrog 20 % prostega hemoglobina, medtem ko po 40 min hemoglobina v inkubacijski raztopini ni bilo več mogoče zaznati. Pozitivno nabiteaminske skupine hitozana povečujejo agregacijo trombocitov in eritrocitov in tako pospešujejo koagulacijo [37], kar je razvidno tudi iz naših rezultatov, saj po 30 min v inkubacijski raztopini vzorca PET-HC ni mogoče več zaznati hemoglobina (sliki 2-9 in 2-16). Vzorci, obdelani s sulfatiranimi polisaharidi (PET-HCF in PET-HCSH) so se med testiranjem obnašali signifikantno drugače kot PET folije, ki na površini niso imele žvepla. Iz literature je razvidno, da imajo substance, ki so po kemični strukturi podobne heparinu dobre protitrombogene lastnosti. Kot je bilo omenjeno že v uvodu, D. Wall s sodelavci, v članku »Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides« opisuje antikoagulantne lastnosti strukturno različnih sulfatiranih

oligosaharidov [47], opisuje faktorje, ki vplivajo na protitrombogene lastnosti sulfatiranih polisaharidov. Med te lastnosti spada tudi vsebnost žvepla v sulfatiranem polisaharidu. Najvišje površinske vsebnosti žvepla so bile ugotovljene pri vzorcu, obdelanem s sulfatiranim hitozanom, PET-HCHS (preglednica 2-2). Pričakovali smo, da bo to pomembno vplivalo na protitrombogene lastnosti tega vzorca. Slika 2-17 prikazuje rezultate testiranja sulfatiranih polisaharidov. Najboljše rezultate še vedno kaže vzorec, obdelan s heparinom PET-HCHEP, vendar pa tudi oba ostala sulfatirana vzorca (PET-HCF in PET-HCSH) po lastnostih ne zaostajata bistveno. Predvsem je zanimiv podatek, da po 20 min med temi tremi vzorci praktično ni razlik v trombogenosti, po 40 min sulfatirana vzorca kažeta nekoliko slabše lastnosti v primerjavi s heparinom, medtem ko se po 50 min vzorci po lastnostih spet praktično izenačijo. Vzorec PET-HCSH izkazuje najvišji površinski delež žvepla (preglednica 2-2), a vendar med to trojico kaže najslabše protitrombogene lastnosti. To dejstvo samo potrjuje spoznanja, ki jih navaja D. Wall s sodelavci, v članku »Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaharides« [47], da so vplivi sulfatiranih polisaharidov na krvno skladnost izredno kompleksni. Pomemben vpliv imajo predvsem: kombinacija med dolžino makromolekul, njihovo strukturo, ter medmolekulskimi povezavami med posameznimi oligosaharidi.



Slika 2-17: Delež prostega hemoglobina v inkubacijskih raztopinah v odvisnosti od časa stika s površino vzorcev za vzorce, obdelane z sulfatiranimi polisaharidi

Ob primerjavi vseh rezultatov lahko opazimo 2 trenda. Nesulfatirani vzorci so pokazali manj antitrombogenih lastnosti, zato je krvni strdek ob stiku s temi površinami nastal hitreje. Posledično smo v raztopini zaznali manj prostega hemoglobina. Pri stiku s površinami nesulfatiranih vzorcev je kri popolnoma koagulirala po 30 oziroma 40 minutah, saj v teh primerih prostega hemoglobina v inkubacijskih raztopinah nismo več zaznali. Sulfatirani vzorci pa so pokazali dobre antitrombogene lastnosti, primerljive celo z rezultati dobljenimi na PET foliji, obdelani s heparinom (PET-HCHEP). V vseh primerih vzorcev, obdelanih s sulfatiranimi polisaharidi kri ni popolnoma koagulirala niti po 50 minutah.

2.4.2. Določanja oblike in števila trombocitov

V sklopu študije števila in oblike trombocitov na površinah vzorcev po stiku s krvno plazmo, smo se srečevali s številnimi težavami predvsem pri statističnem vrednotenju rezultatov štetja trombocitov in določanja števila oblikovanih filopodov oz. stopnje »razlitosti« trombocitov na površini. Trombociti so bili zelo neenakomerno porazdeljeni po celotni površini, ki je bila v stiku s kapljico krvne plazme. To je predstavljalo veliko težavo pri vrednotenju števila trombocitov v vidnem polju. Težavo smo deloma odpravili s tem, da smo opazovali predvsem centralna področja vzorcev, kjer je bila razporeditev trombocitov po površini najbolj homogena.

Kljub vsemu, dobljeni rezultati (slika 2-8, slika 2-9, slika 2-10) nakazujejo pričakovane trende. Na PET-H foliji je moč opaziti relativno veliko število trombocitov, ki so v glavnem v 2. oz. 3. fazi aktivacije (v skladu s [55]). Na tej površini je znašalo povprečno število trombocitov v vidnem polju 173 ± 29 . trombociti so imeli hemisferno obliko in v glavnem jasno izražene filopode, iz česar lahko sklepamo, da gre za relativno trombogeno površino.

Na osnovi rezultatov za PET-HC folijo (slika 2-9) lahko sklepamo, da je bila med tremi analiziranimi vzorci ta najbolj trombogena. Na površini tega vzorca so trombociti združeni v skupkih po obliki pa jih lahko uvrstimo v 2. ali 3. fazo aktivacije s številnimi jasno izraženimi filopodi. Povprečno število trombocitov v vidnem polju za ta vzorec je znašalo 185 ± 57 .

Hepariniziran vzorec pa v tej skupini kaže najnižjo trombogenost, saj je bilo povprečno število prilepljenih trombocitov v vidnem polju 82 ± 62 . Oblike trombocitov so bile v glavnem kroglaste in pri nekaterih so bili nakazani filopodi. Glede na to, da je vzorec v stiku s

krvno plazmo 30 min, lahko te rezultate primerjamo z rezultati, dobljenimi pri enakem času stika s krvjo pri metodi določanja prostega hemoglobina. Tudi tukaj kaže hepariniziran vzorec najnižjo trombogenost, vendar pa na osnovi analize števila in oblike trombocitov s pomočjo SEM ne moremo zadovoljivo ločevati tudi ostalih površin. Metoda je torej v tej fazi primerna le kot podpora metoda, ki nudi dodatne informacije o stanju na površini, za pridobitev točnejših rezultatov pa bodo potrebni še nadaljnji postopki optimizacije.

2.5. Zaključki

Namen predstavljene raziskovalne naloge je bil vpeljati učinkovito in relativno hitro metodo za določanje krvne skladnosti kemično podobnih polimernih materialov. V ta namen smo na osnovi široke študije literature in raziskovalnih dosežkov s tega področja izbrali metodo določanja prostega hemoglobina. Ker metoda, kot je bila opisana v literaturi ni bila primerna za ločevanje kemično podobnih polimernih površin, smo izvedli nekatere postopke optimiranja.

Poleg optimirane metode določanja prostega hemoglobina smo za določanje trombogenosti dodatno uporabili tudi metodo določanja števila in oblike trombocitov na površinah vzorcev po stiku s krvno plazmo. Ugotovili smo, da je metoda zaenkrat primerna v glavnem kot podpora vrednotenju trombogenosti, saj se v tej fazi še vedno pojavljajo številne težave predvsem pri statističnem vrednotenju rezultatov štetja trombocitov in določanja števila oblikovanih filopodov oz. stopnje »razlitosti« trombocitov na površini. Na izbranih vzorcih smo s to metodo sicer ugotovili podoben trend glede trombogenosti vzorcev, vendar pa bodo, za detekcijo manjših razlik v trombogenosti površin, potrebni dodatni postopki normiranja metode.

Optimirana metoda detekcije prostega hemoglobina pa je omogočila dovolj signifikantno določanje trombogenosti polimernih površin. Po optimizaciji, je metoda postala zadovoljivo ponovljiva. S tem je bilo zagotovljeno, da lahko teste izvajamo na večjih serijah vzorcev.

Z metodo detekcije prostega hemoglobina smo potrdili predvidevanja, da imajo polisaharidi s heparinu podobno kemično strukturo dobre protitrombogene lastnosti. Opazili smo evidentno razliko med vzorci, ki so bili obdelani s slulfatiranimi polisaharidi (PET-HCF, PET-HCSH) in heparinom (PET-HCHEP) ter vzorci, ki na površini niso imeli vezanega žvepla (PET, PET-

H in PET-HC). Kot najbolj trombogena površina se je po pričakovanjih izkazala PET folija, obdelana s hitozanom, saj ima lastnosti, podobne steklu, ki je bilo uporabljeno kot referenčna trombogena površina. Pri teh dveh površinah v inkubacijskih raztopinah po 30 min stiku s krvjo nismo več zasledili hemoglobina, kar pomeni, da so bili vsi eritrociti ujeti v strdek, prilepljen na površino. Nanos plasti hitozana na površino PET folije pomeni spreminjanje nenabite PET površine v pozitivno nabito površino zaradi uvajanja aaminskih skupin. Takšna pozitivno nabita površina privlači krvne celice, katerih membrana je negativno nabita, zato površina deluje izrazito trombogeno.

V inkubacijskih raztopinah neobdelanih in hidroliziranih vzorcev PET folije (PET in PET-H) je bilo po 30 min stika s krvjo še okrog 15 % hemoglobina, medtem ko po 40 min hemoglobina ni bilo več mogoče detektirati. Vzorca sta torej izkazovala nekoliko manjšo trombogenost kot steklo in vzorec PET-HC.

Vzorca, obdelana s sulfatiranimi polisaharidi (PET-HCF in PET-HCSH) sta v primerjavi z ostalimi izkazovala izrazito netrombogene lastnosti, ki so bile primerljive z vzorcem, obdelanim s heparinom (PET-HCHEP). V inkubacijskih raztopinah teh vzorcev je še po 50 min ostalo 40 % hemoglobina. Rezultati so še posebej razveseljujoči, če vemo, da te naravne substance posedujejo tudi druge pozitivne lastnosti (protimikrobno delovanje in rastlinski izvor).

Rezultati, doseženi v okviru te raziskave, so lahko dober temelj za nadaljnje študije, v katerih bi morali poskrbeti za izboljšane tehnike nanosov aktivnih substanc na površine vzorcev, obenem pa poiskati še druge možnosti in-vitro testiranja, ki bi pomenile zadovoljivo podporo metodi določanja prostega hemoglobina. Rezultati te naloge namreč jasno kažejo, da bi lahko naravni sulfatirani polisaharidi v prihodnosti zadovoljivo nadomestili heparinske nanose na površinah implantatov.

3. LITERATURA

- [1] M. Szycher (Editor): *High Performance Biomaterials, A comprehensive guide to medical and pharmaceutical applications*; *Woven velour polyester arterial grafts with polypropylene wrap, In vivo evaluation*, 405-424, Technomic Publishing, 1991.
- [2] S.C. Anand: *Implantable devices: An overview, Medical textiles and biomaterials for healthcare*, Woodhead publishing in textiles, 2006, pp.329-334.
- [3] P.C. Begovac, R. C. Thomson, J. L. Fisher, A. Hughson, A. Gällhagen: *Improvements in GORE-TEX Vascular grafts Performance by Carmeda Bioactive Surface heparin Immobilization*, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 25 (2003), 432-437.
- [4] B. H. Walpoth, R. Rogulenko, E. Tikhvinskaia, S. Gogolewski, T. Schaffner, O. M. Hess, U. Althaus: *Improvement of Patency Rate in Heparin- Coated Small Synthetic Vascular Grafts*, *Circulation*, II (1998), 319.
- [5] Y.-X. Wang, J. L. Robertson, W. B. Spillman, R. O. Claus: *Effect of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility*, *Pharmaceuticl research*, 21 (2004), 1362- 1373.
- [6] R. Sipehia: *In vivo evaluation of ammonia plasma modified ePTFE grafts for small diameter blood vessel replacement*, a preliminary report, *Journal of Cardiovascular Surgery* 2001; 42: 537-542.
- [7] P.P.A. Hedeman Joosten: *Thrombomodulin Activity of Fat-Derived Microvascular Endothelial Cells Seeded on Expanded Polytetrafluorethylene*, *Journal of Vascular Research*, 36 (1999), 91-99.
- [8] T. Walles, H. Görler, C. Pushmann, H. Mertsching: *Functional neointima characterization of vascular prostheses in human*, *The Annals of Thoracic Surgery*, 77 (2004), 864 – 868.
- [9] M. Rémy, L. Bordenave, R. Bareille, F. Rouais, C.H. Baquey, A. Gorodkov, E. S. Sidorenko, S. P. Novikova: *Endothelial cell compatibility testing of various prosthetic surfaces*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5 (1994), 808-812.

- [10] P. Klement, Y. J. Du, L. Berry, M. Andrew, A. K. C. Chan: *Blood-compatible biomaterials by surface coating with a novel antithrombin-heparin covalent complex*; Biomaterials 23 (2002) 527-535.
- [11] N. Bonzon, F. Lefebvre, N. Ferre, G. Dacusi, M. Rabaud: *New bioactivation mode for vascular prostheses made of Dacron polyester*; Biomaterials 16 (1995), 747-751.
- [12] M. J. B. Wissink: *Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices*, Journal of Controlled Release 64(2000) 103-114.
- [13] P. A. S. Mourão: *Use of Sulfated Fucans as Anticoagulant and Antithrombotic Agents: Future Perspectives*, Current Pharmaceutical Design, 2004, 10, 976-981.
- [14] *TDMAC-Heparin Complex*, Technical data sheet 172, Polysciences, Inc.
- [15] P. Vongchan, W. Sajomsang, D. Subyen, P. Kongtawelert: *Anticoagulant activity of a sulphated chitosan*, Carbohydrate Research, 337 (2002), 1239-1242.
- [16] Editors: B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons: *Biomaterials Science, An introduction to materials in medicine*; 1996, Academic press.
- [17] T. Chandy, D. S. Gas, R. F. Wilson, G. H. Rao: *Use of plasma glow for surface engineering biomolecules to enhance bloodcompatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis*; Biomaterials 21(2000), 699-712.
- [18] T. A. Khan, K. K. Peh, H. S. Ch'ng: *Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods*, Journal of Pharmaceutical Science, 5(2002), 205-212.
- [19] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou: *Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles*, Carbohydrate Reseach 339 (2004), 2693-2700.
- [20] S.-H. Lim, S. M. Hudson: *Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finishing*, carbohydrate Polymers 56(2004), 227-234.
- [21] R. Huang, Y. Du, J. Yang, L. Fan: *Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulphate*, Carbohydrate Research 338 (2003), 483-489
- [22] S.-I. Nishimura, H. Kai, K. Shinada, T. Yoshida, S. Tokura, K. Kurita, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Uryu: Carbohydrate research, 306 (1998), 427-433.

- [23] J. G. Cook: *Handbook of textile fibres, Man-made fibres*, 1984.
- [24] M. Sfiligoj - Smole: *Fizikalno kemični parametri in lastnosti PES vlaken*; Magistrska naloga, Univerza v Mariboru, 1992.
- [25] L. V. Interrante, M. J. Hampden-Smith (Ed.): *Chemistry of advanced materials, An overview*, 1998, Wiley-VCH, 499-562.
- [26] R. Minix, V. M. Doctor: *Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis*, *Thrombosis Research*, Vol. 87, No. 5, pp. 419 – 429, 1997.
- [27] A. Varenne, P. Gareil, S. Collicec Jouault, R. Daniel: *Capillary electrophoresis determination of the binding affinity of bioactive sulfated polysaccharides to proteins: study of the binding properties of fucoidan to antithrombin*, *Analytical Biochemistry* 315 (2003), 152-159.
- [28] B. Mulloy: *The specificity of interactions between proteins and sulphated polysaccharides*, *Annals of the Brazilian Academy of Science*, 77 (2005), 4, 651-664.
- [29] T. Toida, A. Chaidedgumjorn, R. J. Linhardt: *Structure and Bioactivity of Sulfated Polysaccharides*, *Minireview*, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 15 (2003), 29- 46.
- [30] R. Xing, S. Liu, H. Yu, Z. Guo, Z. li, P. Li: *Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro*, *Carbohydrate Polymers* 61 (2005), 148-154.
- [31] N. Goročovceva, R. Kulbokaitė, R. Jučkėnas and R. Makuška: *Synthesis and study of chitosan and poly(ethylene glycol) graft copolymers containing triazine moiety*, *CHEMIJA*, 2004, T. 15, Nr. 1, 22-27.
- [32] L.-Q. Wu, A. P. Gadre, H. Yi, M. J. Kastantin, G. W. Rubloff, W. E. Bentley, G. F. Payne and R. Ghodssi: *Voltage- Dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface*, *Langmuir*, 18 (2002), 8620-8625.
- [33] R. B. Qaqish, M. M. Amiji: *Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions*, *Carbohydrate Polymers* 38 (1999), 99-107.

- [34] G. Vikhoreva, G. Bannikova, P. Stolbushkina, A. Panov, N. Drozd, V. Makarov, V. Varlamov, L. Gal'braikh: *Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulphated chitosan*, Carbohydrate Polymers 62 (2005), 327-332.
- [35] J. Rosiak, P. Ulański, M. Kucharska, J. Dutkiewicz, L. Judkiewicz: *Radiation sterilization of chitosan sealant for vascular prostheses*, Journal of Radioanalytical And Nuclear Chemistry, Articles, 159 (1992), 87-96.
- [36] J. Fu, J. Ji, W. Yuan, J. Shen: *Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan*, Biomaterials, 26 (2005), 6684 – 6692.
- [37] Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shiegemasa, S. Minami: *Effects of chitin and chitosan on blood coagulation*, Carbohydrate Polymers 53 (2003), 337- 342.
- [38] T. Ryo: *Desulfation of Sulphated Carbohydrates*, Minireview, Trends in Glycoscience and Glycothechnology, Vol. 14 (2002), 343-351.
- [39] O. Berteau, B. Mulloy: *Review, Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide*, Glycobiology, 13 (2003), 29R-40R.
- [40] Chi-Huey Wong (Editor): *Carbohydrate-based Drug Discovery*, Volume 1, 2003 Wiley-VCH, Weinheim, Tasneem Islam and Robert J. Linhardt: Chapter 15, *Chemistry, biochemistry and pharmaceutical potentials of Glycosaminoglycans and Related Saccharides*, 407- 433.
- [41] N. P. Chandia, B. Matsuhira, J. S. Ortiz, A. Mansilla: *Carbohydrates from sequential extraction of Lessonia vadosa (phaeophyta)*, J. Chill. Chem. Soc., 50 (2005), 501-504.
- [42] L. Chevlot, A. Foucault F. Chaubet, N. Kervarec, C. Sinquin, A.-M. Fisher, C. Boisson-Vidal: *Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity*, Carbohydrate Research, 319 (1999), 154-165.
- [43] S. Soeda, Y. Shibata, H. Shimeno: *Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells*, Biol. Pharm. Bulletin, 20 (1997), 1131-1135.

- [44] F. Haroun-Bouhedja, M. Ellouali, C. Siquin, C. Boisson-Vidal: *Relationship between sulphate groups and biological activities of fucans*, Thrombosis Research, 100 (2000), 453-459.
- [45] A. C. Guyton, J. E. Hall: Textbook of Medical Physiology 11th edition, Elsevier 2006
- [46] H. P. Rang, M. M. Dale: Pharmacology 6th edition, Elsevier Limited 2007
- [47] Characterisation of the Anticoagulant Properties of a Range of Structurally Diverse Sulfated Oligosaccharides: Dominic Wall, Susanne Douglas, Vito Ferro, William Cowden
- [48] Sefton MW, Sawyer A, Gorbet M, Black JP, Cheng E, Gemmell C, Pottinger-Cooper E, J Biomed Mat Res, 2001, 55, 447-459
- [49] U. Streller, C. Sperling, J. Hübner, R. Hanke, C. Werner, Journal of biomedical materials research, Wiley Interscience
- [50] M. Kuwahara, M. Sugimoto, S. Tsuji, Platelet Shape Changes and Adhesion Under High, Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006, 12, 329-334
- [51] H. Dautzenberg, W. Jaeger, J. Kötz, B. Philipp, Ch. Sedidel, D. Stscherbina: Polyelectrolytes, formation, characterisation and application, 1994
- [52] V. Tangpasuthadol, N. Pongchaisirikul, and V. P. Hoven: *Surface modification of chitosan films, Effects of hydrophobicity on protein adsorption*; Carbohydrate Research 338 82003), 937- 942.
- [53] R. Xing, S. Liu, H. Yu, Q. Zhang, Z. Li, P. Li: *Preparation of low-molecular weight and high-sulfate content chitosans under microwave radiation and their potential antioxidant activity in vitro*, Carbohydrate Research 339 (2004), 2515-2519.
- [54] J. K. Shapiro, R. J. Prebula, A Sensible Approach to Biocompatibility Testing, Medical Devices & Diagnostic Industry, 2003, 8,
- [55] N. Huang, P. Yang, Y. X. Leng, Hemocompatibility of Titanium Oxide Films, Biomaterials; 24 (2003), 2177-2187
- [56] F. Boccafoschi, J. Habermeh, S. Vesentini, Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering, Biomaterials, 26 (2005), 7410-7417

- [57] Kristinsson HG. Conformational and functional changes of haemoglobin and myosin induced by pH: Functional role in fish quality [PhD Thesis]. Amherst; University of Massachusetts; 2002.
- [58] S. Takemoto, T. Yamamoto, K. Tsuru, Platelet adhesion on titanium oxide gels, effect of surface oxidation, *Biomaterials*, 25(2004)3485-3492
- [59] D. Lu, T. Yoshida, M. Premanathan, Specific activities of Chinese lacquer polysaccharides, *Carbohydrate polymers*, 43(2000)47-54
- [60] S. Sagnela, K. mai-Ngam, Chitosan based surfactant polymer design to improve blood compatibility on biomaterials, *Colloids and surfaces*, 42(2005)147-155
- [61] K. J. Lee, Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives, *Biomaterials*, 16(1995)1211-1216
- [62] Y. Imai, Y. Nose, A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials, The Cleveland clinical foundation, Cleveland, Ohio, 44106, (1972)165-172
- [63] D. wall, S. Douglas, V. Ferro, Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides, 103(2001)325-335
- [64] M. kumahara, M. sugimoto, S. Tsuji, Platelet shape changes adhesion under high shear flow, *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Journal of the American heart association, 2002;22 329 334
- [65] T. Indest, J. Laine, V. Ribitsch, Adsorption of chitosan on PET films monitored by quartz crystal microbalance, *Biomacromolecules*, 2008, vol. 9, no. 8, str. 2207-2214.