

Andrej Dolenc¹, Miha Homar², Mirjana Gašperlin³, Julijana Kristl⁴

Z nanooblaganjem do izboljšanja biokompatibilnosti vsadkov

Improving Biocompatibility of Implants with Nanolayering

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: vsadki, materiali testiranje, biokompatibilni materiali, nanotehnologija

Biokompatibilnost vsadkov v telesu je izjemno zapleten pojav. Čeprav strukturne lastnosti materialov odločajo o primernosti vsadka za določeno uporabo, pa je zlasti biološki odziv po njegovi vstavitvi odvisen predvsem od njegove površine in interakcij s komponentami biološkega okolja. Novost na tem področju so nanometerske obloge na površini vsadkov, ki bistveno povečajo biokompatibilnost. Eden od načinov nanooblaganja je oblaganje plast-na-plast, ki je v prednosti pred preostalimi metodami. Temelji na zaporedni adsorpciji nasprotno nabitih komponent na trdno površino, kar omogoča natančen nadzor nad sestavo in debelino obloge v razredu do nekaj nanometrov. Ugotovili so, da je s premišljeno izbiro polimernih komponent mogoče izboljšati biokompatibilnost že uporabljenih in preizkušenih ogrodnih materialov z dobrimi mehanskimi lastnostmi. Članek razgrinja pogled na biokompatibilnost vsadkov in nekatere primere nano-modificiranih površin in njihove možnosti uporabe.

ABSTRACT

KEY WORDS: implants artificial, materials testing, biocompatible materials, nanotechnology

Biocompatibility of different materials in the body is very complicated phenomenon. Although structural characteristics of implant are decisive for its specific purpose, biologic response mainly depends on surface characteristics of the implant and its interaction with biologic environment. Nanolayering of the implant to improve biocompatibility presents a recent innovation in this field of research. One method of nanolayering is layer-by-layer assembly which has many advantages over other nanolayering methods. The method is based on alternate adsorption of oppositely charged components on a hard surface, allowing for exact control of composition and thickness of the coating in a nanometer range. It was shown that with a proper selection of polymer components the biocompatibility of used and tested structural material with good mechanical characteristics can be improved. The following article presents a view on biocompatibility of implants and highlights some cases of nano-modified surfaces and their potential applications.

¹ Asist. Andrej Dolenc, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana.

² Asist. Miha Homar, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana.

³ Izr. prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana.

⁴ Prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana.

UVOD

Biomateriali, ki so naravnega ali človeškega izvora, se uporabljajo za uravnavanje, dopolnjevanje ali nadomeščanje funkcije tkiva v človeškem telesu. Prva uporaba biomaterialov sega v obdobje antične civilizacije, saj že egipčanske mumije pričajo, da so nadomeščali dele telesa. Kitajci in Indijanci so uporabljali voske, lepila in druge snovi za rekonstrukcijo manjkajočega ali poškodovanega tkiva. Z izboljšanjem sinteznih materialov, kirurških tehnik in sterilizacijskih metod je uporaba biomaterialov mogoča na več področjih. Biomateriali v obliki vsadkov (kostne ploščice, nadomestila sklepov, vezi, krvne žile, srčne zaklopke, intraokularne leče, zobni vsadki idr.) in naprav (srčni spodbujevalniki, biosenzorji, umetna srca idr.) se uporabljajo za nadomestitev ali obnovitev funkcije poškodovanega ali degeneriranega tkiva oz. organa. Uporabljajo se kot pomoč v zdravljenju, za izboljšanje delovanja ali popravilo nenormalnosti, s čimer izboljšajo kakovost bolnikovega življenja. Nekatere materiale telo sprejme, medtem ko druge zavrača. Uspešnost vsaditve je odvisna tudi od pogojev vsaditve. V zadnjih tridesetih letih je močno napredovalo raziskovanje interakcij med tkivi in materiali za vsadke (1).

Medicinski pripomočki za vstavitev v telo so izdelani iz kovin, keramike, polimerov in kompozitov. Polimere uporabljajo na različnih področjih implantacije, kar je predvsem posledica dosegljivosti materialov različnih sestav, lastnosti in oblik (ki so lahko trdne snovi, vlakna, filmi, geli idr.). Dokaj hitro jih je mogoče oblikovati v kompleksne oblike in strukture, vendar so pogosto preveč prožni in prešibki, da bi ustrezali mehanskim zahtevam za določeno uporabo, npr. vsadke v ortopediji. Poleg tega lahko v vodnem okolju nabrekajo, odpuščajo neželene spojine (monomere, plastifikatorje, antioksidante itd.), kar je odvisno od mesta in načina uporabe (1).

Kovine so močni, upogljivi in dokaj odporni materiali proti obrabi. Slabosti številnih kovin so majhna biokompatibilnost, korozija, prevelika trdnost v primerjavi s tkivom, velika gostota in odpuščanje kovinskih ionov, ki lahko povzročijo alergično reakcijo (1, 2).

Keramika je znana po svoji dobri biokompatibilnosti in odpornosti proti koroziji. Slabe

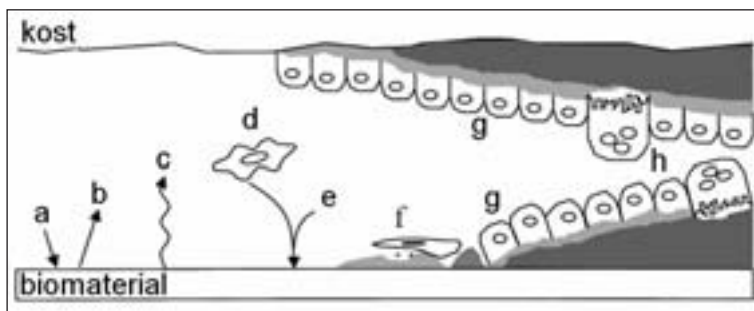
lastnosti pa so krhkost, večja lomljivost, zahtevna proizvodnja, majhna mehanska vzdržljivost in prožnost ter velika gostota. Polimerno sestavljene snovi ponujajo alternativno možnost za izboljšanje nekaterih pomanjkljivosti navedenih materialov (1, 2).

BIOMATERIALI IN BIOKOMPATIBILNOST

Biološke lastnosti materialov so raziskovalci poimenovali z izrazoma biomaterial in biokompatibilnost. Biomateriali morajo biti čimbolj biokompatibilni. Biokompatibilnost pomeni sprejemljivost vsadka z okoliškimi tkivi in s telesom kot celoto (1). Taki materiali ne smejo povzročati toksičnih, alergijskih ali karcinogenih reakcij v telesu. Poleg tega je za vse biomateriale zaželeno, da izzovejo čim manjši imunski odziv organizma oz. da ga sploh ne (1, 2).

Pri biomaterialih ločimo površinsko in strukturno biokompatibilnost. Površinska biokompatibilnost pomeni čim boljše kemično, biološko in fizikalno podobnost površine vsajenega materiala z gostiteljevim tkivom. Strukturna biokompatibilnost je optimalna prilagoditev na mehanski odziv gostiteljevih tkiv in se nanaša na mehanske lastnosti vsajenega materiala, kot so elastični modul in trdnost, oblika vsadka in optimalen prenos obremenitve na površini med vsadkom in tkivom. Dobro medsebojno sprejemljivost biomateriala in tkiva dosežemo, če je vsadek površinsko in strukturno biokompatibilen. Treba je poudariti, da je ustreznost biomateriala v telesu odvisna tudi od preostalih dejavnikov, kot so postopek vsaditve, bolnikovo zdravstveno stanje in aktivnost (1).

Za prvo generacijo biomaterialov je bila značilna bioinertnost. Osnova takih materialov je, da ne tvorijo vezi z okoliškim tkivom, ki okrog vsadka najpogosteje tvori vlaknasto kapsulo, kar v nekaterih primerih vodi do nje gove popolne izolacije. V zadnjih dvajsetih letih se je pojavila t. i. druga generacija biomaterialov, za katere je značilna bioaktivnost, ki je definirana kot sposobnost materiala, da v stiku s telesno tekočino na svoji površini povzroči specifični biološki odziv organizma, kar se pokaže kot tvorjenje vezi z okoliškim tkivom (slika 1). V to generacijo biomateria-

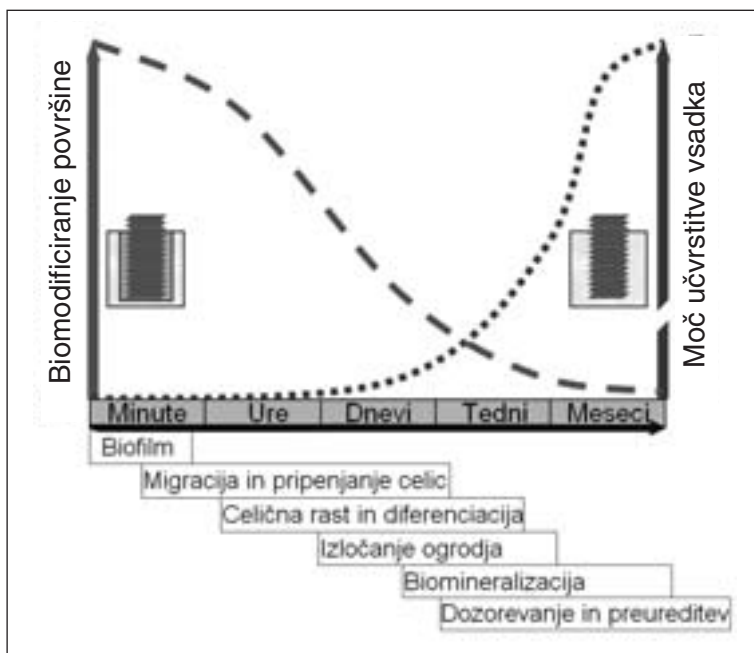


Slika 1. Panzaritev dogodkov, ki se odvijajo na površini med kostjo in vsadkom: a – adsorpcija proteinov iz krvi in tkivnih tekočin na biomaterial, b – desorpcija proteinov, c – spremembe na površini in sproščanje molekul v sledovih, d – prihod vnetnih in povezovalnih tkivnih celic na površino vsadka, e – možno tarčno sproščanje ogradnih proteinov in selektivna adsorpcija proteinov kot sta kostni sialoprotein (BSP) in osteopontin (OPN), f – tvorba »lamina limitans« in adhezija osteogenih celic, g – tvorba kostne mase na površini vsadka ter na izpostavljeni kosti, h – preurejanje na novo tvorjene kosti (prirejeno po: Puleo DA, Biomaterials, 2003).

lov sodijo tudi bioresorbirajoči materiali, ki se v telesni tekočini kontrolirano razgrajujejo oz. raztapljajo in postopno zamenjujejo z obnovljenim tkivom (taka sta polimlečna in poliglikolna kislina, ki se razgradita v CO_2 in H_2O). Tretja generacija biomaterialov pa je oblikovana tako, da biomateriali po vstavitvi sprožijo odgovor na molekularni ravni in poma-

gajo pri obnavljanju živega tkiva. Iskanje takih biomaterialov je v domeni novejši smeri biomedicine, t. i. tkivnega inženiringa (1).

Takoj po vstavitvi vsadka v telo se na površino adsorbirajo proteini. Nastane bioplast, ki je sestavljena iz vode, beljakovin in drugih biomolekul iz fizioloških tekočin in tvori mejo med površino vsadka in celicami oz. tkivom.



Slika 2. Časovni potek sprememb na mejni površini vsadek-kost, ki določajo biokompatibilnost vsadka in moč učvrstitve v kost. Leva krivulja (---) nam prikazuje, da s spremembo površine lahko najbolj vplivamo na potek zdravljenja na samem začetku. Desna krivulja (···) prikazuje moč učvrstitve vsadka v odvisnosti od časa (prirejeno po Lyngstadaa SA, Bio-implant interface, 2003 by CRC Press LLC).

Citokini in rastni faktorji v bioplasti povzročijo adhezijo različnih celic na površino vsadka (slika 1) (2).

Lastnosti površine najbolj vplivajo na potek zdravljenja takoj po vzpostavitvi stika vsadka z biološkim okoljem. Uporabili so določene biomolekule, ki na površini tvorijo bioplast in specifičnim celicam signalizirajo, da se naselijo na površini in diferencirajo v celice, ki tvorijo želeno tkivo (slika 2) (4). V literaturi so najpogosteje opisane interakcije kostnih vsadkov z okoliškim tkivom, nekateri procesi po vstavitvi pa so predstavljeni na slikah 1 in 2.

Vsadki za uporabo v humani medicini morajo ustrezati določenim standardom kakovosti. Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO) je izdala smernice ISO 10993 za biološko vrednotenje medicinskih pripomočkov. Uvedeni standardi so uporabni za pripomočke, ki so posredno ali neposredno v stiku s telesom ali telesno tekočino. Biološko vrednotenje je odvisno od načina in trajanja stika s telesom (ISO 10993-1). Glede na vrsto stika s telesom so medicinski pripomočki razdeljeni v tri razrede: (i) površinski pripomočki, (ii) zunanji povezovalni pripomočki ter (iii) implantirani vsadki. Glede na trajanje stika s telesom pa so razvrščeni na: pripomočke z (i) omejenim stikom (do 24 ur), (ii) podaljšanim stikom (od 24 ur do 30 dni) ter (iii) trajnim stikom (več kot 30 dni) (5).

Za posamezne razrede medicinskih pripomočkov so predpisani postopki preizkušanja. Postopki, s katerimi ugotavljajo biokompatibilnost, so citotoksičnost, senzibilizacija, draženje kože in intrakutana reaktivnost, akutna sistemska toksičnost, subkronična in kronična toksičnost, mutagenost, procesi obvsaditvi, hemokompatibilnost in karcinogenost (5).

Povečanje biokompatibilnosti vsadkov

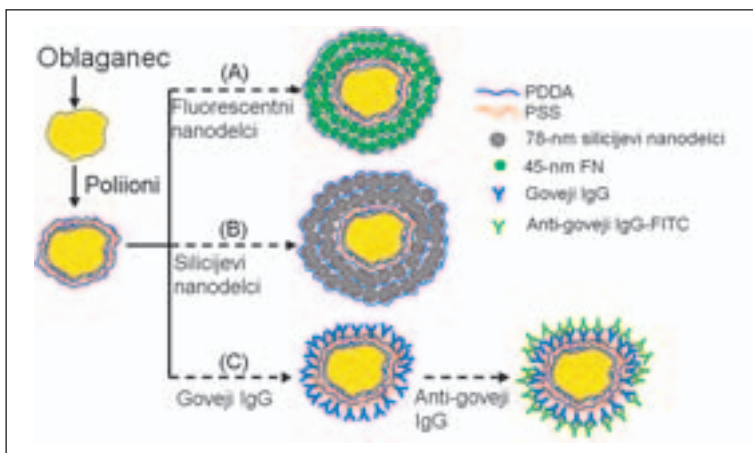
Za doseganje biokompatibilnosti obstajajo različne možnosti. Čeprav so strukturne lastnosti materialov tiste, ki odločajo o primernosti vsadka za določeno uporabo, je biološki odziv odvisen predvsem od njegove površine in površinskih interakcij s komponentami biološkega okolja (6). To poskušajo doseči na različne načine. Najpogostejši način je veza-

va biološko aktivnih peptidov in proteinov, kot so fibronektin, vitronektin, kolagen tipa I, osteopontin in kostni sialoprotein. To so t. i. RGD vsebujoči peptidi z aminokislinskim zaporedjem arginin-glicin-aspartat (Arg-Gly-Asp), ki pospešijo vezavo celic na površino vsadkov. Drugi način je modificiranje površine z oblaganjem s hidroksiapatitom, ki ga pogosto uporabljajo za izboljšanje biokompatibilnosti ortopedskih in dentalnih materialov, katerih osnova je titan (7). Da bi dosegli boljše površinsko biokompatibilnost raziskujejo zadnjih nekaj let vpliv izredno tankih polimernih oblog na površini vsadkov. Te obloge omogočajo boljše adhezijo okoliških celic na površino ter njihovo večje preživetje in nadaljnji razvoj. Tako je mogoče odpraviti določene pomanjkljivosti že uporabljenim in preizkušenim materialom le z modificiranjem njihovih površin (1).

NANOBLAGANJE

Postopki nanooblaganja omogočajo izdelavo obloge, katere debelina je v območju od nekaj deset do nekaj sto nanometrov. Izredna tankost pomeni veliko prednost obloge, ki tako zelo malo prispeva h končni prostornini in masi vsadka, vendar posledično spremenjene površinske lastnosti obloge lahko močno vplivajo na obnašanje v organizmu. Za izdelavo nanooblog uporabljajo več načinov: metodo sol-gel, pulzirajoče lasersko oblaganje, Langmuir-Blodgettovo metodo in oblaganje plast-na-plast. Vse našteje metode imajo različne prednosti in slabosti, ki vplivajo na namembnost uporabe. Med omenjenimi izstopa predvsem metoda plast-na-plast, saj z njo lahko obložimo praktično vse materiale, oblaganje izvajamo v vodnih pogojih ter tako tvorimo stabilne obloge (8).

Oblaganje plast-na-plast (angl. *layer-by-layer*) je leta 1991 uvedel Decher s sodelavci. Temelji na zaporedni adsorpciji nasprotno nabitih polimernih molekul na določeno nabito površino. Rezultat tega postopka je obloga, ki jo sestavlja več plasti polimernih molekul, stabiliziranih z močnimi elektrostatskimi vezmi. Najprimernejši so polielektroliti, ki se elektrostatsko vežejo na oblaganec. Prvi sloj se veže neposredno na površino oblaganca, zato mora imeti naboj, nasproten naboju obla-

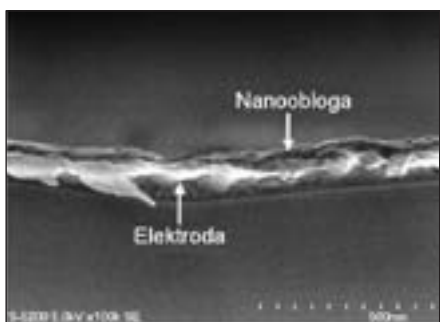


Slika 3. Prikaz številnih možnosti, ki nam jih ponuja nanooblaganje plast-na-plast. Oblaganec so obložili s polielektrolitoma polidimetil-dialilamonijev klorid (PDDA) in polistirensulfonat (PSS). V nanoobloge so vključili tudi silicijeve in fluorescentne nanodelce ter protitelesa IgG (prirejeno po Ai H, *Biomacromolecules*, 2002).

ganca. Pri oblagancu, ki ima manjšo sposobnost za tvorbo elektrostatskih interakcij, pride po prvih nanosih do t. i. okrepljene površinske funkcionalnosti, saj se na površino oblaganca s šibkejšim nabojem veže plast polielektrolitov, ki imajo na voljo več skupin za vezavo naslednje plasti (9–14).

V take polielektrolitne večplastne obloge so vključili tudi druge snovi, npr. anorganske (silicijeve) nanodelce, funkcionalne polimere, proteine, kromofore, biopolimere (DNK). S tovrstnim oblaganjem je mogoče kontrolirati debelino obloge v območju nekaj nanometrov

(slika 4). Za en dvosloj polistirensulfonat/poli-D-lizilamin klorid so določili povprečno debelino od 3 do 4 nm, za dvosloj poli-D-lizin/laminin pa približno 5 nm (slika 4). Končno debelino obloge tako določijo s številom nanesenih slojev (15, 16). Tako so obložili najrazličnejše strukture, kot so silikonski vsadki, steklo, lateks, delce učinkovine, celice ipd. (10–14). Izboljšanje površinske biokompatibilnosti vsadkov z nanooblaganjem plast-na-plast uporabljajo predvsem za ortopedske in dentalne vsadke, modificirajo pa tudi površine, ki pridejo neposredno v stik s krvjo ali so namenjene vsaditvi v osrednji živčni sistem, kar je predstavljeno v nadaljevanju. Nanoobloga lahko vključuje tudi snovi z določeno biološko aktivnostjo (17, 18).



Slika 4. Slika z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) prikazuje približno 50 nm debelo oblogo iz desetih slojev poli-D-lizina/laminina. Debelino nanoobloge izmerijo tako, da proces nanašanja ponovijo na elektrodi kvarčne kristalne mikrotehnice in iz spremembe frekvence nihanja piezoelektričnega kvarčnega kristala določijo maso in debelino obloge (prirejeno po Ai H, *J Neurosci Meth*, 2003).

PRIMERI NANOBLAGANJA VSADKOV

Nanooblaganje vsadkov iz titana

Titan in titanove zlitine se veliko uporabljajo na dentalnem in ortopedskem področju za izdelavo medicinskih pripomočkov kot so zobni vsadki, nadomestki kolkov idr. Titan ima zaradi odpornosti proti koroziji odlične lastnosti, vendar se vsadek le pasivno integrira v kost, saj se ne more neposredno povezati z njo (7).

Pomembno je, da na titanovih vsadkih pospešimo tvorbo kosti, s čimer izboljšamo začetno biokompatibilnost vsadkov v stiku z njo. Kot nov način izboljšanja stika vsadka s kostjo so uvedli nanooblaganja (6, 7, 17, 19). V primerjavi s klasično kemijsko imobilizacijsko metodo pa oblaganje plast-na-plast ne poteka prek kemijskih vezi. Tako narejen večplastni film je stabilnejša obloga zaradi elektrostatskih interakcij med plastmi ter interakcij med plastmi in substratom. (7). Za izdelavo polielektrolitnih oblog nanometrskih debelin na titanovih površinah so uporabili različne polielektrolite. Preizkusili so želatino, hitosan, polietilenimin (7), poli-D-lizin, polialilamin klorid, DNK (6) ter poli-L-lizin in poli-L-glutaminsko kislino (17). Biokompatibilnosti obloženih in neobloženih titanovih površin so preverjali s testom mutagenosti (6) ter s sejanjem in gojenjem celic na teh površinah, katerim so nato določali rast, obliko in sposobnost za življenje (6, 7, 17).

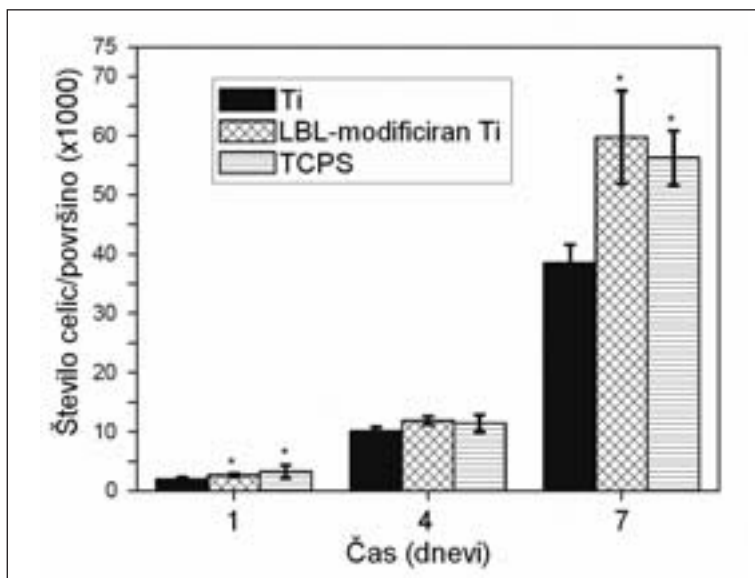
Določanje proliferacije celic

Slika 5 prikazuje hitrost večanja števila osteoblastov na s hitosanom in želatino obloženih titanovih površinah v primerjavi s hitrostjo

na neobloženih titanovih površinah in z rastjo na polistirenu, ki ga sicer uporabljajo za gojenje celičnih kultur (TCPS). S polielektrolitno oblogo z zadnjo plastjo želatine so izboljšali proliferacijo osteoblastov v primerjavi z osteoblasti na neobloženih titanovih površinah (7). Podobne rezultate so dobili tudi pri vrednotenju proliferacije primarnih fibroblastnih celic na površinah titana (Ti) (6).

Določanje sposobnosti celic za preživetje

Test, ki ga imenujemo MTT, ocenjuje mitohondrijsko redoks aktivnost gojenih osteoblastov in s tem njihovo sposobnost za preživetje. Reagent MTT je svetlo rumena spojina, ki se v prisotnosti živih celic preko mitohondrijske sukcinatne dehidrogenaze v kompleksu II reducira v temno moder formosan. Tako tvorba formosana odraža stopnjo sposobnosti celic za življenje. Dokazali so, da so celice, vezane na obložene površine titana, bolj mitohondrijsko aktivne v primerjavi s celicami, gojenimi na neobloženih površinah. S tem so dokazali, da je nanoobloga s končno plastjo želatine biokompatibilna in netoksična (7).



Slika 5. Večanje števila osteoblastov, gojenih na neobloženih površinah (Ti), površinah obloženih s hitosanom in želatino (LBL-modificirani Ti) ter na polistirenu, ki ga uporabljajo za gojenje celičnih kultur (TCPS). Začetno število celic je bilo v vseh primerih 5000 celic/cm² (prirejeno po Cai K, Biomaterials, 2005).

Določanje morfologije celic

Celična adhezija, razširjenje in selitev celic so prve zaporedne reakcije, ki so pomembne za preživetje celic po stiku s površino materiala. Obnašanje celic na površini biomateriala je pomemben dejavnik pri vrednotenju njihove biokompatibilnosti. Slika 6 prikazuje morfologijo osteoblastov, gojenih na obloženih in neobloženih površinah titana. Celice so na obeh površinah naključno adherirane in razprostrte. Osteoblasti na neobloženi površini (slika 6a) imajo vretenasto obliko. Glede na neobloženo površino pa so celice na obloženi površini (slika 6b) bolj razprostrte in so razvile številne lamelipodije in filopodije, zaradi česar se okrepijo interakcije med samimi celicami ter med celicami in substratom. Med celicami so opazili veliko povezav, kar bi dejansko lahko vodilo do popolne spojitve, tako da bi bila površina v celoti pokrita s celicami (7).

Nanooblaganje silikonskih vsadkov za dolgotrajno vstavev v osrednji živčni sistem

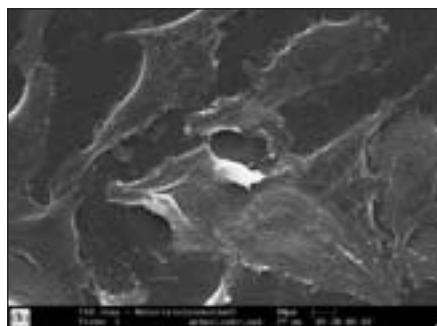
V medicinskih raziskavah se veliko uporablja silikon. Zmožnost rasti celic na silikonu povečuje njegovo klinično uporabnost, omogoča pa tudi boljše proučevanje interakcije med celicami in površino. Silikonske cevčice klinično uporabljajo tudi pri rekonstrukciji perifernih živcev in za pomoč v zdravljenju nekaterih boleznih osrednjega živčnega sistema kot so hidrocefalus (drenažni obvod), tremor (naprava za stimuliranje globljih predelov možganov) in pri poškodbah hrbtenjače (električno stimulirana regeneracija) (10).

Proučevali so adhezijo živčnih celic na silikonske vsadke z nanooblogami. Prve plasti so tvorili z izmeničnim nanašanjem kationskega polietilenimina (PEI) in anionskega polistirensulfonata (PSS). Nadaljnje oblaganje so izvajali z nanašanjem laminina in PDL oziroma fibronektina in PDL. Pri vseh plasteh so določili večjo hidrofilnost kot pri neobloženi silikonski površini, največjo pa so določili plasti PDL. Film okrog silikonskega nosilca je bil biokompatibilen z aktivnimi nevroni, kar so dokazali z merjenjem aktivnosti laktatne dehidrogenaze (LDH), ki se sprosti iz poškodovanih celic, in s fluorescenčnim opazovanjem celičnega metabolizma. LDH test rutinsko uporabljajo za oceno kvantitativne citotoksičnosti in citolize v celičnih kulturah. Z rezultati so potrdili, da so nanofilmske obloge na silikonski podlagi biokompatibilne z nevroni in niso citotoksične (10).

Na neobloženih silikonskih površinah niso opazili adhezije nevronov. Ker sta preživetje nevronov in njihova diferenciacija pogojena z adhezijo na nosilec, so neadherirani nevroni propadli v dveh dneh. Z nanooblogo so opazno povečali adhezijo nevronov na silikonske vsadke. Adherirani nevroni na oblogi laminin/PDL so se začeli povezovati v nevronske omrežje, pri čemer je bila njihova rast in diferenciacija normalna. Normalen je bil tudi njihov metabolizem (10).

Nanooblaganje srčnožilnih vsadkov

Polietilentereftalat (PET) se zaradi odličnih mehanskih lastnosti in sprejemljive biokompatibilnosti veliko uporablja pri srčnožilnih



Slika 6. Slike osteoblastov narejene z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), ki so jih gojili na (a) neobloženi in (b) obloženi površini titana (PEI/Gel/(Chi/Gel)₃) po 24-urni inkubaciji z enako gostoto celic ob začetku inkubacije (prirejeno po Cai K, Biomaterials, 2005).

vsadkih. Okužbe, ki jih povzročajo notranji vsadki (srčne zaklopke, žilni vsadki, žilni ali urinski katetri), predstavljajo velik problem. Začetna adhezija bakterij na površino biomateriala pomeni kritično stopnjo v patogenezi telesne okužbe. Adherirane bakterije metabolizirajo hranila, rastejo, se razmnožujejo in izločajo polisaharidno ogrodje, ki bakterije veže tesno na površino. Nastane biofilm, ki poveča odpornost bakterij proti antibiotikom glede na proste bakterije. Zato je zelo zaželena obloga, ki bi zmanjšala adhezijo bakterij na vsadke in bi hkrati povečala uničevanje bakterij. Protiadhezivno in protibakterijsko nanooblogo so ustvarili z izmeničnim nanašanjem hitosana in heparina na polietilentereftalatne površine. Ugotovili so, da ima hitosan določeno protibakterijsko aktivnost in da heparin s protitrombogenim delovanjem in hidrofilnimi lastnostmi preprečuje adhezijo bakterij na vsadek. Določali so začetno adhezijo *E. coli* na neobložene površine PET in ugotovili, da je bila mnogo večja, kot na površine obložene s hitosanom in heparinom. Število živih bakterij se je na polielektrolitnih plasteh v sedmih urah zmanjšalo za 46 do 68 %, medtem ko se je število živih bakterij na neobloženi površini zmanjšalo le za 7 %. Po 24. urah je na obloženi površini preživelo le še 3 do 8 % bakterij (20).

Polietilentereftalat (DacronTM) so uspešno uporabili tudi pri nadomeščanju arterij večjega premera (>6 mm), medtem ko je nadomeščanje arterij manjšega premera (<6 mm) pogosto neuspešno. Tako tanke umetne žile izkazujejo visoko trombogenost in potrebujejo posebno obravnavo pri njihovi vsaditvi. Eden od načinov povečanja biokompatibilnosti teh vsadkov je vezava plasti celic na notranjo površino umetnih žil, s čimer želijo posnemati mikrookolje endotelija žil. Zato so za povečanje adhezije celic na površini polietilentereftalata tvorili različne polielektrolitne nanoobloge in proučevali njihov vpliv na endotelijske celice v smislu adhezije, začetne povezanosti, rasti, celične presnovne aktivnosti in endotelijskega fenotipa. Ugotovili so, da večplastne polielektrolitne obloge niso citotoksične niti ne spreminjajo fenotipa endotelijskih celic. V primerjavi z monoelektrolitnimi plastmi so z večplastno polielektrolitno nanooblogo na površini pospešili začetno adhezijo celic. Kot najzanimivejša obloga v smislu celične adhezije in

rasti so določili oblogo iz polistirensulfonata ter polialilamin klorida, za katero so določili odlično celično biokompatibilnost (21).

V drugem primeru so površino umetnih žil elektrostatsko obložili s plastmi hitosana (HIT) in hondroitin sulfata. Tudi na tako modificiranih filmih PET, zlasti na obloženih z večjim številom plasti hitosana in hondroitin sulfata, so opazili pomembno povečano vezavo endotelijskih celic. Amino skupine hitosana še dodatno omogočajo imobiliziranje celičnih rastnih faktorjev kot so žilni endotelijski rastni faktor, PDGF in endotelin (22).

Bioaktivna nanoobloga na znotrajžilnih žičnih opornicah

Z nanooblaganjem so obložili tudi žične opornice, ki jih vstavijo v žilo, da razširijo zoženo svetlino in tako omogočijo normalen pretok krvi (slika 7). Teh posegov naredijo več kot milijon na leto in pri 15 do 30 % pride do zapletov, in sicer do tromboze in ponovne zožitve žile (klinična restenoza). Do ponovne zožitve pride tako zaradi poškodbe žile kot tudi zaradi prisotnosti kovinskega vsadka v njeni notranjosti. Da bi zmanjšali ta pojav, so uporabili dva pristopa. Pri prvem pristopu so znotrajžilne žične opornice obložili z materiali, ki delujejo manj trombogeno in manj vnetno (npr. karbon). V drugem primeru pa so uporabili obloge, v katere so vključili tudi terapevtsko učinkovino (npr. Taxol), ki se je sproščala na mestu implantacije (23).

Kot nov pristop za povečanje biokompatibilnosti znotrajžilnih žičnih opornic so preizkusili nanoobloganje plast-na-plast s polielektroliti, pri čemer so uporabili hialuronan (HA) in hitosan (HIT). Tako nanooblogo so ovrednotili *in vitro* ter *ex vivo* na prašičih, kjer so preverili, če se poveča kompatibilnost kovinskih znotrajžilnih vstavkov. Da bi preverili, če nanoobloga iz hitosana in hialuronana lahko služi kot *in situ* dostavni sistem, so v nanoobloge vključili še učinkovino Na-nitroprusid, ki je donor dušikovega oksida in se uporablja za znižanje krvnega tlaka. Uporabljajo ga kot nov način za zdravljenje ponovne zožitve (23).

Ugotavljali so adhezijo trombocitov na različne površine. Ugotovili so, da se trombociti najbolj vežejo na neobdelane površine iz nikelj-titana (NiTi). Z nanooblogo iz petih



Slika 7. Žična opornica, ki jo vstavijo v žilo in razširijo zoženo svetlino in omogočijo normalen pretok krvi.

plasti hialuronana in štirih plasti hitosana (HA/(HIT/HA)₄) na površini so zmanjšali vezavo trombocitov za 38 %, za nadaljnjih 40 % pa še v primeru, ko so v nanooblogo vključili tudi Na-nitroprusid (SNP) in tako tvorili oblogo iz petih plasti hialuronana ter štirih plasti hitosan-Na-nitroprusid (HA/(HIT-SNP/HA)₄) (23).

ZAKLJUČEK

Izboljšanje biokompatibilnosti vsadkov je hitro razvijajoče se področje, na katerem potekajo številne raziskave. Najenostavnejši pristop k izboljšanju biokompatibilnosti je sprememba površine vsadka, ki prihaja v stik s telesom. Obstaja več metod oblaganja vsadkov za izboljšanje njihove biokompatibilnosti. Med temi metodami izstopa oblaganje plast-na-plast, saj z njo lahko na dokaj enostaven način izdelamo obloge z zeleno sestavo in debelino. Zaradi izredne tankosti obloge se masa in mehanske lastnosti vsadka le malo spremenijo, širok izbor polimerov pa nam omogoča izdelavo obloge z zelenimi lastnostmi. Prav tako lahko v oblogo vgradimo različne zdravilne učinkovine oz. hormone, s čimer dosežemo podaljšano lokalno terapijo. Pričakovati je, da bodo pričeli uporabljati vsadke, modificirane z metodo plast-na-plast, že v bližnji prihodnosti.

LITERATURA

- Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, et al. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Comp Sci Tech* 2001; 61: 1189–224.
- Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999; 20: 2311–21.
- Moguš - Milankovič A. Tri generacije biomaterijala. *Kem Ind* 2005; 54: 131–4.
- Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Spahr A, et al. Inducing bone growth using extracellular matrix proteins. In: Ellingsen J E, Lyngstadaas S P. *Bio-implant interface*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 2003.
- Bollen LS, Svendsen O. Biocompatibility: Regulatory guidelines for biocompatibility safety testing. Dosegljivo na: <http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/05/001.html>.
- van den Beucken JJJJ, Vos MRJ, Thune PC, et al. Fabrication, characterization and biological assessment of multilayered DNA-coatings for biomaterial purposes. *Biomaterials* 2006; 27: 691–701.
- Cai K, Rechtenbach A, Hao J, et al. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials* 2005; 26: 5960–71.
- Homar M, Kristl J. Nanooblaganje – možnosti in prednosti. In: *Nanotehnologija v farmaciji*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2004. p. 65–79.
- Dolenc A, Homar M, Kristl J. Nanooblaganje koloidnih delcev s polielektroliti [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2005.
- Ai H, Meng H, Ichinose I, et al. Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *J Neurosci Methods* 2003; 128: 1–8.
- Hua A, Steven AJ, de Villiers M M, et al. Nano-encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug release. *J Control Release* 2003; 86: 59–68.
- Qiu X, Leporatti S, Donath E, et al. Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir* 2001; 17: 5375–80.
- Antipov AA, Sukhorukov GB, Donath E, et al. Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules. *J Phys Chem B* 2001; 105: 2281–4.
- Vodouh  C, Le Guen E, Mendez Garza J, et al. Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 2006; 27: 4149–56.
- Decher G, Hong JD. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol Chem – Macromol. Symp.*, 1991; 46: 321–7.
- Fan YF, Wang YN, Fan YG, et al. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *Int J Pharm* 2006; article in press.
- Schultz P, Vautier D, Richert L, et al. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, α -MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials* 2005; 26: 2621–30.

18. Khopade AJ, Arulsudar N, Surekha AK, et al. Ultrathin antibiotic walled microcapsules. *Biomacromolecules* 2005; 6: 229–34.
19. Troyen-Toth P, Vautier D, Haikel Y, et al. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 657–67.
20. Fu J, Ji J, Yuan W, et al. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* 2005; 26: 6684–92.
21. Boura C, Menu P, Payan E, et al. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* 2003; 24: 3521–30.
22. Liu Y, He T, Gao C. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 46: 117–26.
23. Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, et al. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1564–71.

Prispelo 21.7.2006