Biomimetyczne powłoki na bazie węgla aktywujące komórki macierzyste z krwi w warunkach dynamicznych

Biomimetic carbon based coatings which activate stem cells in dynamic conditions

Klaudia Trembecka - Wójciga

Streszczenie

Postęp w dziedzinie inżynierii biomedycznej możliwy jest dzięki efektywnemu połączeniu nauki o materiałach z biologią komórki. Komórki macierzyste są zdolne do samodzielnego odnawiania i posiadają wysoki potencjał różnicowania do innych typów. Każda komórka macierzysta jest zdolna do namnażania, samoodnowy i różnicowania przez podziały, które są asymetryczne [Matthias 2009; Blau 2008]. Prowadzi to do powstania dwóch typów pochodnych komórek, które różnią się od siebie. Jednym z nich jest taka sama, jak oryginalna komórka macierzysta, podczas gdy druga przechodzi do bardziej dojrzałych form. Każda komórka, która rośnie i dojrzewa, ma swoją własną niszę, która stanowi strukturę przestrzenną bogatą w substancję pozakomórkową, tworząc mikrośrodowisko, które utrzymuje komórki i nadaje sygnały do proliferacji, dojrzewania i samoodnowy. Nisza macierzysta jest to funkcjonalna struktura anatomiczna zawierająca składniki komórkowe i pozakomórkowe, które regularnie proliferują i różnicują, wpływając na przeżywalność i lokalizację [Scadden 2006; Jones 2008; Fuchs 2004]. W 1978 roku Schofield zaproponował koncepcję "niszy komórek macierzystych w badaniach" na krwiotwórczych komórkach macierzystych (ang. Hematopoetic Stem Cells - HSC) [Schofield 1978]. Hipotezę tę potwierdziło wiele badań. Dowody in vivo występowania niszy komórek macierzystych, po raz pierwszy przedstawiono w badaniach przy użyciu modelu bezkręgowców [Nie 2010], dla komórek macierzystych generatywnych Drosophila [King 1999; Xie 2000]. U ssaków, nisze komórek macierzystych zidentyfikowano w różnych tkankach np. w szpiku kostnym, mózgu, jelitach, mieszkach włosowych i zębach [Tumbar 2004; Yen 2006; Conover 2008; Mitsiadis 2007; Ohshima 2005; Wilson 2006]. Teoretycznie, nisza komórek macierzystych jest złożona z samych komórek macierzystych, wsparta komórkami podścieliska oraz dodatkowo białkami macierzy komórkowej, naczyniami krwionośnymi i wejściami neuronowymi. Oddziaływanie biomateriału z komórkami macierzystymi jest opisane w literaturze [Chai 2007; Saha 2007; Hwang 2008; Dawson 2008; Dellatore 2008; Evans 2006]. Rusztowania są

wykonane z odpowiednich materiałów biokompatybilnych, które umożliwiają rozpad i absorpcję w organizmie [Blau 2008].
Modyfikacja powierzchni polimerów przez zastosowanie cienkich warstw pozwala tworzyć nowe materiały funkcjonalne przy zachowaniu, lub przy nieznacznie zmienionych właściwościach fizycznych polimeru [Laha 2004; Thornton 1977; Lackner 2005; MoDeSt 2016]. Zmniejszenie całkowitej energii odkształcenia w warstwach poddawanych siłom ściskającym objawia się w postaci tak zwanych fałd powierzchniowych. Sugerowane wyjaśnienie tego typu zjawisk dotyczy wpływu wspólnego odkształcenia powierzchni podłoża i warstwy [Lackner 2006]. Fałdowanie opisane jest jako sinusoidalny twór wzniesień na powierzchni, bez utraty przyczepności do podłoża, a powodem fałdowania osadzonej warstwy jest brak stabilności mechanicznej. Zarówno w warstwie bazowej jak i w podłożu występują naprężenia własne dwuosiowe. Wynikiem relaksacji naprężeń ściskających jest tworzenie struktury falistej na powierzchni [Lackner 2006; Mylvaganam 2003; Lackner 2010]. Struktura warstw z regulowanym układem fałd prowadzi do relaksacji naprężeń w procesie kompensacji odkształceń. Wartości naprężeń własnych zależą od wartości modułu Younga podłoża. Najbardziej widoczne skutki występowania naprężeń w powłokach są dla materiałów o najniższych wartościach modułu sprężystości [Mylvaganam 2003]. Kolejny aspekt dotyczy wpływu sztywności podłoża na różnicowanie komórkowe. Wykryto, że określony rodzaj komórek macierzystych szczególnie intensywnie reagował na podłoże sztywne, bardziej niż na miękkie [Evans 2009].
Niniejsza praca dotyczy nowatorskiego podejścia do modyfikacji powierzchni z wykorzystaniem zaawansowanych metod inżynierii materiałowej i biomedycznej funkcjonalizacji powierzchni. Podłożem bazowym były klinicznie stosowane polimery, głównie wykorzystywane w układach wspomagania serca. Modyfikacja powierzchni miała doprowadzić do efektywnego różnicowania progenitorowych komórek hematopoetycznych poprzez odpowiednie ukształtowanie morfologii powierzchni i sztywności materiału. Komórki progenitorowe miały ulec samoróżnicowaniu do śródbłonka, który efektywnie hamowałby procesy wykrzepiania. Podjęta problematyka naukowa ma szczególne znaczenie w aspekcie projektowania i rozwijania nowych materiałów dedykowanych do regeneracji układu krążenia. Szczególną uwagę zwrócono na opracowanie nowych rozwiązań dla aktywacji komórek progenitorowych, ich przechwytywania i następnie różnicowania. Praca wpisuje się w problematykę związaną z rozwojem nowej generacji funkcjonalnych biomateriałów.
W organizmie, spoczynkowe komórki macierzyste znajdują się w specjalnych niszach, a poprzez modyfikację powierzchni, mogą być utrzymane w stanie wolno dzielących się komórek, który zapewnia stałość środowiska wewnętrznego. Ogólna idea polega na naśladowaniu struktury i funkcji tkanki. Odpowiednia sztywność powierzchni i mikrostruktura powłoki może doprowadzić do różnicowania komórek macierzystych w kierunku komórek śródbłonka, mając na celu skuteczne hamowanie procesów wykrzepiania w bezpośrednim kontakcie z przepływającą krwią.
Biomateriały wielofunkcyjne, dedykowane do przechwytywania komórek macierzystych są postrzegane jako perspektywiczne materiały do zastosowania w medycynie regeneracyjnej [Yen 2006].

Abstract

Integration of biomaterial-tissue is a matter of reconstruction of damaged blood vessels. Endothelial dysfunction is a hallmark of many vascular diseases and often leads to serious consequences such as heart attack. The novelty of the work is based on the reconstruction of endothelial monolayers on the surface of biomaterials from stem cells, which, as a result of metal contact, undergo controlled differentiation, and consequently form endothelial monolayers.

The result of this work was a functional surface that facilitates reconstitution of the natural layer of normal endothelial tissue which inhibits the coagulation process. Based on the construction and properties of cellular niches, which are the natural environment of stem cells, attempts have been made to reconstruct them using appropriate microstructure and topography of the surface, based on surface interference lithography methods. Ultra-thin coatings based on amorphous carbon and diamond-like carbon deposited by physical vapor deposition (PVD) were designed and manufactured. The composition of the coatings was dictated by the high properties of hemocompatible carbon coatings and their low toxicity. Corrugated structures were obtained by controlling the amount of internal stresses in the coating as well as by mechanical deformation of the substrate prior to the application of the coatings.

The dissertation was divided into two stages. In the frame of the first stage the optimization of dedicated coatings for components subjected to high shear loads was made. These coatings will apply to the elements of the ventricles of the heart assist system. The coatings on the smooth substrates shown very good adhesion, which confirmed the scratch tests. Analysis of the adhesion force of the morphotic elements (erythrocytes, platelets) to the surface was performed based on the radial flow chamber. This tester made it possible to evaluate the impact of shear stress on the processes of leaching cells that were chewed to the surface. The materials prepared in the first stage were structured, allowing preliminary analyzes of the differentiation of progenitor cells towards the endothelium.

Periodic structures in a form of wells obtained by ablation of the surface layer of the materials by means of a laser beam shown a high potential for forming endothelial monolayers from HUVEC. Cells have the correct morphology, take the shape of the so-called "Cobblestones", a characteristic form of a full monolayer of the endothelium. The second stage involved the formation of irregular folded structures obtained by modifying the clinically used polyurethane substrates with ultra-thin carbon-based coatings. Analysis of the microstructure with TEM confirmed the presence of folds on the micrometer scale, while AFM analysis allowed the topography to be evaluated on both micro and nanometer scale. On the basis of the results obtained, a greater proportion of nanometer-like folds for diamond-like coatings (DLC) was observed compared to amorphous carbon (a-C: H), which may have a stronger effect on adhesion surfaces, thereby affecting cell adhesion strength.

Materials could be applied to items dedicated to direct contact with blood. The blood-material interaction analysis showed high haemostatic properties. The blood-material impact assessment was done on the basis of dynamic tests. The results show very good properties of amorphous carbon based materials in contact with blood. Final selection of the coating was made by comparing the amount of apoptotic microparticles formed as a function of platelet consumption.

In the study, new materials for coating the surface of cardiac implants used in forced blood circulatory systems, including design, optimization and testing of relevant parameters, were subjected to analysis. The subject matter of the work was dictated by the need for new materials for these devices that show improved interaction with the blood.

The work presents an innovative concept of surface modification based on thin pleated coatings with high hemomorphic properties, modified in the direction of structures that function as stem cell niches. By reconstructing physiological structures and tissue functions, the role of niche environments has been defined. Correctly shaped surfaces obtained by physical vapor deposition have affected the degree of cell differentiation and the efficiency of endothelial monolayer formation which is a direct inhibitor of the activation and coagulation processes. Ultra-thin folded coatings exhibited high potential for controlled differentiation of progenitor cells. The validity of the hypothesis has proved that plasmatic surface modification methods generate a controlled share of residual stress and affect the formation of nano-folded topography, creating a structure similar to cell niches, capturing stem cells from blood flow and affecting their proper differentiation. Based on the research carried out, the conclusions were drawn:

• Flat varnishes can work in hydrodynamic conditions at high shear rates. This property is the basis of this type of object for the vortex components of the heart-assisted ventricle.

• Coatings derived from anodic radiation sources have an appropriate surface in the form of micro and nano metric folds. Through topography material can control inducible progenitor cells. This is the influence of micro and nano-topography as well as phase composition and material microstructure.

• The plasticity of stem cells has allowed reconstruction of the endothelium on the surface. This has the same effect as the situation of the natural blood vessel, effectively inhibiting the coagulation process.

recenzja - Prof. S. Mitura

recenzja - Prof. J. Szewczenko