

STRESZCZENIE

„Procesy rodnikowe w kolagenie inicjowane radiacyjnie i ich makroskopowe konsekwencje”

Cel i zakres pracy:

Skóra pełni funkcję ochronną utrzymującą homeostazę organizmu. Niejednokrotnie urazy skóry (np. rozległe poparzenia) czy choroby genetyczne (np. Epidermolysis Bullosa) mogą stanowić bezpośrednie zagrożenie utraty życia. W takich sytuacjach jedynym ratunkiem jest przeszczep skóry.

Obecnie na etapie badań jest szereg prac mających na celu stworzenie biokompatybilnych opatrunków, które mogłyby możliwie najdokładniej imitować ludzką skórę. Wzrost zainteresowania właściwościami materiałów biopolimerowych oraz ich wytwarzaniem ukazują potrzebę opracowania metod obróbki stosowanego w medycynie kolagenu. Ten bioresorbowalny materiał stanowi doskonałą bazę do tworzenia opatrunków medycznych.

Jednym z głównych etapów przygotowania przeszczepów do zastosowań medycznych jest sterylizacja zapewniająca skuteczne wyeliminowanie patogenów. W przypadku materiałów biologicznych promieniowanie jonizujące jest rekomendowaną metodą sterylizacji, zapewniającą bezpieczeństwo mikrobiologiczne poprzez eliminację grzybów, wirusów i bakterii.

Proces sterylizacji radiacyjnej, który jest wykorzystywany do dezynfekcji produktów biomedycznych, takich jak kości, przeszczepy, tkanki, może wpłynąć na fizykochemiczne właściwości matrycy kolagenowej. Ekspozycja na promieniowanie jonizujące niesie ze sobą ryzyko uszkodzenia struktury kolagenu.

Głównym celem mojej pracy było pogłębienie wiedzy, jak promieniowanie jonizujące wpływa na fizyko-chemiczne właściwości preparatów kolagenu, w tym bezkomórkowych matryc kolagenowych uzyskanych na bazie ludzkiej skóry, które są używane do inżynierii tkankowej. Zrozumienie tych zmian może pomóc w poprawie skuteczności i bezpieczeństwa przeszczepów i implantów skóry, co jest szczególnie ważne dla pacjentów, którzy wymagają przeszczepów skóry w wyniku oparzeń, urazów lub chorób.

W ramach tego celu podjęłam się zbadania procesów rodnikowych zachodzących w preparatach kolagenowych na skutek działania promieniowania

jonizującego oraz oceny, jakie zmiany we właściwościach fizykochemicznych kolagenu następują podczas procesu sterylizacji.

Podjęłam się następujących zadań:

- Zbadanie wpływu promieniowania jonizującego na poszczególne aminokwasy będące składowymi kolagenu,
- Zbadanie i porównanie skutków działania promieniowania jonizującego na modelowy kolagen typu I i bezkomórkowe matryce kolagenowe otrzymane z ludzkiej skóry.
- Ocena przydatności kolagenu typu I ze ścięgien bydłych jako materiału modelowego dla bezkomórkowych matryc ludzkiej skóry, w badaniach fizykochemicznych.

Metodologia:

Do badań użyłam aminokwasów, komercyjnego, oczyszczonego kolagenu typu I, pozyskiwanego ze ścięgien bydłych oraz bezkomórkowych matryc kolagenowych pozyskanych z ludzkiej skóry, pochodzącej z operacji bariatrycznych. Metodologia otrzymywania tych matryc została opracowana w ramach projektu Bioopa STRATEGMED2/269807/14/NCBR/2015), w ramach którego zostały wykonane badania zawarte w niniejszej dysertacji.

W badaniach zastosowałam metody spektroskopowe: EPR, spektroskopię rozproszonego odbicia UV/VIS, całkowitego osłabionego odbicia w zakresie podczerwieni (ATR-FTIR), metody rozdziału: chromatografię gazową (GC) oraz elektroforezę żelową (SDS-PAGE), metody analizy termicznej: termogravimetrię (TGA) oraz różnicową kalorymetrię skaningową (DSC). Do wizualizacji struktury preparatów posłużyłam się metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). W ramach badań określiłam, jaki jest wpływ dawki 25, 35 i 50 kGy na niektóre właściwości fizykochemiczne i mechaniczne kolagenu. Przeanalizowałam wpływ wilgotności próbki oraz obecności tlenu w atmosferze napromieniowania na badany materiał podczas procesu sterylizacji.

Uzyskane rezultaty:

Badając podstawowe składowe kolagenu, tj. trzy wybrane aminokwasy: glicynę, prolinę i hydroksyprolinę, za pomocą metody EPR zidentyfikowałam rodniki

inicjowane promieniowaniem jonizującym. Widma EPR napromieniowanych aminokwasów są bardzo rozbudowane, spowodowane jest to powstaniem kilku rodników charakteryzujących się podobną stabilnością. Potwierdzona została obecność czterech rodników w napromieniowanej glicynie, jednego rodnika w napromieniowanej prolinie i czterech rodników w napromieniowanej hydroksyprolinie. Analogi tych rodników nie występują w kolagenie. Spowodowane jest to prawdopodobnie strukturą łańcuchową białka, jego inną mobilnością lub obecnością innych składowych łańcucha kolagenowego wrażliwych na promieniowanie.

Badania TGA wykazały, że im wyższa dawka promieniowania, tym niższa temperatura rozkładu aminokwasów. Prawdopodobnie, napromieniowanie aminokwasów w atmosferze powietrza prowadzi do powstawania grup funkcyjnych zawierających tlen, wrażliwych termicznie, których ilość wzrasta wraz ze wzrostem dawki promieniowania. Chromatografia gazowa pozwoliła zauważyć różne wydajności radiacyjne abstrakcji wodoru dla różnych aminokwasów. Największa wydajność została zaobserwowana dla proliny. Porównując była ona prawie 8-krotnie większa w porównaniu z glicyną i 4-krotnie z hydroksyproliną.

Porównanie modelowego kolagenu typu I i bezkomórkowych matryc skórnych prowadzi do następujących wniosków:

- przy użyciu metod TGA i DSC potwierdzono, że właściwości termiczne materiałów na bazie kolagenu, nie zmieniają się znacząco po napromieniowaniu.
- przy użyciu EPR potwierdzono, powstanie identycznych produktów paramagnetycznych w obydwu materiałach kolagenowych. Powstają rodniki, które są prekursorami niewielkich zmian w strukturze badanych materiałów. Badania EPR wykazały, że w biopolimerze zachodzą następujące procesy: pękanie wiązania C-H (-CH^\bullet), uszkodzenie łańcuchów bocznych aminokwasów ($\text{-CH}_2\text{CH}_2^\bullet$) i utlenianie (-COO^\bullet). W temperaturze otoczenia rodniki nie są trwałe, a szybkość ich zaniku wzrasta wraz z ze wzrostem wilgotności kolagenu. Podobnych obserwacji dokonano na podstawie spektroskopii DRS UV-VIS, gdzie w zakresie 264 i 326 nm obserwuje się powstawanie przejściowych pasm absorpcji, które w danej temperaturze zanikają z szybkością zależną od wilgotności, i które można przypisać przejściowym produktom radiolizy. Powstałe modyfikacje, obserwowane metodami spektroskopowymi, nie zaburzają przejść termicznych struktury kolagenu, która pozostaje stabilna. Prawdopodobnie spowodowane jest to unikalną strukturą wewnątrz- i

międzycząsteczkową materiałów kolagenowych, zawierającą liczne wiązania poprzeczne.

- przy użyciu SEM, na podstawie otrzymanych obrazów o różnych powiększeniach, nie stwierdzono istotnych różnic w morfologii powierzchni tworzonej przez włókna kolagenowe obydwu materiałów.
- przy użyciu GC stwierdzono duże różnice w stosunku wydajności radiacyjnej tlenu do wodoru dla obydwu materiałów. Bezkomórkowe matryce ludzkiej skóry posiadają 5-krotnie wyższy stosunek wydajności radiacyjnej tlenu do wodoru, natomiast dla modelowego kolagenu typu I stosunek ten jest aż 60-krotnie wyższy. Powodem może być różnica w powierzchni aktywnej materiału. Modelowy kolagen typu I występuje w postaci „puchu”, o znacznie bardziej rozwiniętej powierzchni w porównaniu z bezkomórkowymi matrycami ludzkiej skóry, co powoduje jego bardziej rozległe utlenienie.

Mimo różnic w intensywności utlenienia, ekspozycja na promieniowanie jonizujące modelowego kolagenu typu I i bezkomórkowych matryc ludzkiej skóry daje podobną odpowiedź radiacyjną, pod względem powstających wolnych rodników. Jednocześnie oba materiały w podobnym stopniu zachowują stabilne właściwości termiczne, przy czym wyniki dla preparatu kolagenu I charakteryzują się większą powtarzalnością, co potwierdza przydatność kolagenu typu I jako materiału modelowego dla bezkomórkowych matryc ludzkiej skóry.

Zbadano także wpływ napromieniowania na fragmentację łańcuchów kolagenowych w bezkomórkowych matrycach skórnych za pomocą elektroforezy żelowej. Badanie pozwoliło zaobserwować fragmentację łańcuchów kolagenowych, która jednak nie przekładała się na stabilność kolagenu w badaniach metodami termicznymi. Warto zauważyć, że efekt fragmentacji obserwowano w preparatach trawionych pepsyną (co umożliwia badanie kolagenu metodą elektroforezy), co sugeruje, że szczególna, usieciowana struktura naturalnego kolagenu zapewnia mu niezwykle stabilność, nawet w obecności licznych uszkodzeń poszczególnych łańcuchów kolagenowych.

Napromieniowanie strumieniem elektronów modelowego kolagenu typu I i bezkomórkowych matryc ludzkiej skóry dawkami 25, 35 kGy i 50 kGy pozwoliło udowodnić, że dawka ma niewielki wpływ na właściwości fizykochemiczne i termiczne kolagenu. Potwierdza to, że zarówno rekomendowana przez MAEA dawka 25 kGy, jak

i stosowana często w praktyce polskich banków tkanek dawka 35 kGy są bezpieczne pod kątem zachowania właściwości fizykochemicznych badanego materiału.

Na podstawie badań TGA, DSC, EPR, UV-VIS, FTIR, SEM i GC nie stwierdzono istotnego wpływu wilgotności na zmiany właściwości fizykochemicznych podczas procesu sterylizacji materiałów, w zastosowanym szerokim zakresie wilgotności od 4 % do 22,5 % zawartości wody w próbce. Jedyne obserwowane różnice dotyczą szybkości procesów rekombinacji wolnych rodników. Większa wilgotność sprzyja szybszemu zanikowi rodników, co jest obserwowane metodami spektroskopowymi EPR i UV-VIS.

Mimo małych zmian zaobserwowanych we właściwościach fizykochemicznych badanych próbek i ogólnej dobrej stabilności kolagenu w procesie sterylizacji radiacyjnej, obserwowane procesy utleniania, oraz zależności wydajności reakcji z tlenem podczas napromieniowania od powierzchni aktywnej materiału wskazują na zasadność wprowadzenia atmosfery ochronnej w procesie sterylizacji materiałów opatrunkowych na bazie kolagenu.

Podsumowując wyniki badań pozwoliły na określenie mechanizmów uszkodzeń radiacyjnych zachodzących w bezkomórkowej matrycy ludzkiej skóry oraz określenie stopnia fragmentacji materiału w zależności od dawki. Osiągnięto aplikacyjny cel jakim było dobranie optymalnych warunków podczas procesu sterylizacji bezkomórkowych matryc ludzkiej skóry na potrzeby dalszych badań laboratoryjnych i postępowań klinicznych.

