#### Nanostrukturalne materiały dla biomedycznych

#### systemów układu krążenia



E. WYKONANE ZADANIA BADAWCZE WEDŁUG HARMONOGRAMU – wersja rozszerzona

2. Opis wykonanych badań naukowych i prac rozwojowych oraz uzyskanych wyników - w ramach poszczególnych zadań harmonogramu

Nazwa i adres jednostki naukowej

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie,

tel.: +48-12-2952800, fax: +48-12-2952804, strona www: www.imim.pl

Kierownik projektu

Prof. dr hab. inż. Bogusław Major

#### SPIS TREŚCI

Streszczenie projektu				
Realizacja pakietu	1 Optymalizacja powierzchni protezy naczyniowej	str. 5		
Zadanie 1	Płaskie dyski polimerowe	str. 5		
• Zadanie 2	Wykonanie polimerowych elementów rurowych			
• Zadanie 3	Sterylizacja powierzchniowa elementów systemu wspomagania krążenia	str. 7		
• Zadanie 4	Adaptacja powierzchni polimerowych powłokami parylenu			
Realizacja pakietu	<b>2</b> Charakterystyka zaawansowanych materiałów i reakcje kolonii komórkowych	str. 16		
Zadanie 1	Właściwości powierzchniowe i charakterystyka materiału powierzchni	str. 16		
Zadanie 2	Kinetyka adhezji komórek	str. 33		
Realizacja pakietu	3 Inżynieria biomedyczna	str. 46		
Zadanie 1	Reakcje limfocytów T i B na zmodyfikowane powierzchnie biomateriałów	str. 46		
• Zadanie 2	Osadzanie komórek śródbłonka na powierzchni biomateriału	str. 52		
• Zadanie 3	Zagadnienia powikłania- badania bakteriologiczne	str. 76		
Realizacja pakietu	4 Sztuczny pacjent	str. 79		
Zadanie 1	Konstrukcja układu do symulacji oddziaływania sztuczny materiał krew –			
	sztuczny pacjent	str. 79		
Zadanie 2	Selekcja materiału na bazie scenerii oddziaływania krew-biomateriał	str. 85		
Realizacja pakietu	5 Zarządzanie projektem	str. 86		

#### Załączniki- osobny dokument



Streszczenie projektu: Nanostrukturalne materiały dla biomedycznych systemów układu krążenia

Projekt dotyczy opracowania technologii wytworzenia nowej generacji materiałów na przewody w kształcie rurowym, o zmodyfikowanej antyskrzeplinowej powierzchni wewnętrznej przeznaczonych, do wymuszonego przepływu krwi. Głównym celem projektu jest zmodyfikowanie wewnętrznej powierzchni przewodów polimerowych przeznaczonych do terapii układu krążenia (kaniule, konektory, dreny sterujące). **CELEM projektu jest opracowanie nowych powłok o właściwościach bio-neutralnych dla prowadzenia sztucznie wymuszonego przepływu krwi.** Rozwijane są też zagadnienia powłok o właściwościach biomimetycznych, czyli formowanie warstwy naturalnej z komórek śródbłonka. Projekt "CardioBioMat" z założenia miał spełniać funkcję projektu realizowanego jako satelitarny do wieloletniego programu "Polskie Sztuczne Serce". Realizuje rozwiązania nie będące przedmiotem ww. programu, ale spełniające funkcje uzupełniające do ogólnego układu wspomagania serca.



Rys. 1. Schemat powiązania pakietów podczas realizacji projektu



#### Pakiet 1 – Optymalizacja powierzchni protezy naczyniowej

Cel: Optymalizacja powierzchni protezy naczyniowej poprzez zastosowanie hemokompatybilnych powłok o strukturze nanometrycznej oraz powłok polimerowych.

#### Zadanie 1- Płaskie dyski polimerowe

Płaskie dyski polimerowe zostały wykonane w firmie PLASTMED będącym uczestnikiem projektu. Płaskie krążki polimerowe zostały wykonane metodą prasowania z re-granulatu uzyskanego z klinicznie stosowanych elementów rurowych TYGON S-50 HL i wylane na odpowiedniej matrycy. Założeniem tak prowadzonych prac było wykonanie materiałów do analiz bazowych dokładnie z takiego polimeru jaki jest stosowany klinicznie i jaki w późniejszych etapach realizacji projektu jest podstawą do wykonania elementów rurowych.

### Zadanie 2- Wykonanie polimerowych elementów rurowych implantów naczyniowych

Zadanie to jest realizowane wspólnie z Intra-Cordis (wykonanie podłoża polimerowego w kształcie rurowym- implanty naczyniowe) z partnerem austriackim będącym uczestnikiem projektu. Praca polegała nie tylko na wykonaniu prostych elementów rurowych, ale również na optymalizacji i dostosowaniu powierzchni wewnętrznych polimerowych elementów rurowych pod modyfikacje powierzchniowe i osadzanie powłok. W ramach realizacji zadania wykonano selekcję materiałów na implanty naczyniowe.

Zmiana wewnętrznej powierzchni rur staje się coraz ważniejsza w wielu zastosowaniach (np. transport płynów, izolacji elektrycznej, kontakt z płynami biologicznymi). Jednak długie rury wymagają specjalnych technik plazmowych dla uzyskania funkcyjnych powierzchni w skali nanometrów bez ich uszkodzenia. Analizy polimerów wykazały, że poliamid, poliwęglan, politereftalan etylenu

i termoplastyczny poliuretan, bardzo różnie reagują na obojętne i reaktywne trawienia (aktywacja)- warunki z wykorzystaniem plazmy. Płaskie próbki poliwęglanowe (PC), poliamidowe (PA), z termoplastycznego poliuretanu (PU), z politereftalanu etylenu (PET), były wykorzystywane jako podłoże. Próbki zostały oczyszczone ultradźwiękami w etanolu, suszone przez co najmniej 24 godziny i wprowadzone do odpowiedniego układu wg schematu przedstawionego na (Rys. 2).



Rys. 2. Układ przygotowywania powierzchni elementów rurowych implantów naczyniowych

Po odpompowaniu do niskich próżni, przeprowadzono trawienie plazmowe (aktywacja) i polimeryzację. Zostało to wykonywane poprzez niską częstotliwość wyładowań impulsowych (DC) (Diener Electronics GmbH) w zakresie od 54 do 535 Hz. Zastosowano różne cykle pracy, zdefiniowane jako dawka plazmy na czas trwania impulsu (= czas włączenia + czas wyłączenia). Konfiguracja jest podobna do rurowej lampy fluorescencyjnej z płaskimi elektrodami na obydwu końcach elementu rurowego. Podłoże jest modyfikowane w plazmie po wyładowaniu jarzeniowym w kontrolowanych atmosferach. Zaopatrzenie w gaz następuje poprzez katodę, pompowaną od strony anody (Rys. 2).

Kontrola dostawy gazu (argon, tlen, azot, powietrza (25°C, 55% wilgotności względnej) i acetylenu (C2H2)) sterowana jest przepływomierzem masowym i regulowana w celu uzyskania stałych warunkach ciśnienia osadzania.

Zgodnie z teorią wyładowania jarzeniowego [*Poll U-H. 1980; Gronning P. 1994*] napięcie wzrasta nieznacznie, ale liniowo w tzw. kolumnie pozytywnej, a prąd generowany jest przez dyfuzję jonów w gazie. Region ten jest zubożony w elektrony

poprzez ich ruch w kierunku ściany. Charakterystyki impulsu elektrycznego (napięcia, prądu, częstotliwość impulsów, cyklu pracy i kształt impulsu) analizowano na podstawie pomiarów oscyloskopowych (Tektronix). Plazmowe widma emisji zostały zarejestrowane poprzez spektrometr światłowodowy (Ocean Optics HR 4000, 200 - 1000 nm długości fali).

Zoptymalizowane powierzchnie elementów rurowych poddano w zadaniu 3 ("Sterylizacja powierzchniowa elementów systemu wspomagania krążenia") kompleksowej analizie wpływu sterylizacji (głównie plazmy) na zmianę jakości powierzchni.

### Zadanie 3- Sterylizacja powierzchniowa elementów systemu wspomagania krążenia

Obojętne i reaktywne trawienie powierzchni z wykorzystaniem plazmy z wyładowań jarzeniowych zazwyczaj prowadzi do czyszczenia powierzchni polimeru z zanieczyszczeń i chemicznej modyfikacji przez energetyczne cząstki gazu. Spodziewany jest wzrost energii powierzchniowej, objawiające się zmniejszeniem kąta zwilżania. Takie efekty zaobserwowano dla wszystkich badanych polimerów, jak pokazano na rys. 3, na wykresie zależności plazmy w czasie.



Rys. 3. Właściwości zwilżania wszystkich analizowanych materiałów w zależności od zastosowanej plazmy "on-time": (a) Ar, (b) O<sub>2</sub>, (c) N<sub>2</sub> i (d) (25°C, 55% wilgotności). Błąd standartowy kątów zwilżania jest poniżej ± 3°. Wartości kąta zwilżania dla 0 s przedstawiają wartości dla polimerów bez obróbki powierzchniowej

Rys. 4 przedstawia zależność kąta zwilżania polimerów w zależności od częstotliwości impulsu.





Rys. 4. Zależność kąta zwilżania w funkcji częstotliwości. Błąd standardowy < ± 3°

Dłużej trwające impulsy plazmy realizowane zarówno przez dłuższy całkowity czas i dłuższe cykle pracy ma większy wpływ na zmianę właściwości powierzchniowych.

Ogólnie, wyładowanie jarzeniowe plazmy w warunkach gazu obojętnego (Ar) prowadzi do chemicznej modyfikacji polimerowych powierzchni poprzez bombardowanie atomami o wysokiej energii, elektronami, fotonami, jak również niskim ciężarze cząsteczek powstałych poprzez wcześniejsze frakcjami o powierzchni zewnętrznych podłoża. Takie zabiegi odparowanie powoduja modyfikację powierzchniową obrabianego materiału na głębokości ~10 nm. Metastabilne atomy argonu posiadają energię w zakresie 11.55 i 11.72 eV (czas trwania odpowiednio 55.9 i 44.9 s.). Jony Ar<sup>+</sup> posiadają energię jonizacji 15.8 eV. W naszych badaniach spektroskopowych główne linie argonu zostały wykryte pomiędzy 650 i 800 nm. Jest to daleko od linii emisyjnych 100-110 nm i dowodzi o innych stanach wzbudzenia lub o odmienne uwalnianej energii. Ta energia wzbudzenia może być wykorzystana do zrywania wiązań atomowych atomów przypowierzchniowych. Poza tym wykorzystywana jest do sieciowania łańcuchów polimerowych i wiązań typu C=C.

9

Plazma tzw. tlenowa posiada duże atomy tlenu i energetycznie niestabilne cząsteczkowe frakcje tlenowe o energii 1.96 eV. i 9.13 eV. W analizie spektroskopowej emisji plazmy, znaleźliśmy słabe linie 633 nm (dla 2<sup>1</sup>D<sub>2</sub> stanu) i silną emisję UV w pobliżu 298 eV (dla stanu 2<sup>1</sup>S<sub>0</sub>). W porównaniu, jonizacja tlenu wymaga energii 13.62 eV. Te cząsteczki tlenu mogą bezpośrednio zrywać wiązania ze wszystkimi efektami porównywanymi do gazów obojętnych (opisane powyżej dla Ar) i dodatkowo tworzyć produkty reakcji. Typowymi produktami reakcji są CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O; często spotykane powierzchniowe grupy funkcyjne zawierajace zaadsorbowane cząsteczki to grupy hydroksylowe (OH) i karboksylowe (COO), formowane na głębokości modyfikowanej powierzchni do 2.5 nm. Wyładowanie jarzeniowe w atmosferze azotu, ma podobny wpływ na powierzchnie obrabianych polimerów jak wyładowanie w atmosferze tlenu. Powstają (NH<sub>2</sub>) oraz grupy aminowe (NH-R) [Poll U-H. 1980]. Tendencia do sieciowania w atmosferze N<sub>2</sub> jest znacznie silniejsza niż w przypadku O<sub>2</sub>. Metastabilne atomy azotu zostały zidentyfikowane w spektrach emisyjnych plazmy w zakresach 300-400nm i 550-90 nm. Posiadają energie 2.38 i 3.58 eV ( $2^{2}D_{5/2}$  ( $D^{2}D_{3/2}$ ) i  $D^{2}P_{3/2}$  ( $2^{2}P_{1/2}$ )) o czasie trwania powyżej 10 sekund, podczas gdy jony N<sup>+</sup> wymagają energii jonizacji 14.54 eV. Stosując tą podstawową wiedzę dotyczącą wpływu różnych gazów plazmy na polimery, możemy dyskutować ma temat różnych kątów zwilżania dla różnych polimerów: PU i PA zwykle wymagają mniejszej intensywności obróbki plazmowej w celu poprawy zwilżalności natomiast wykazują większe kąty zwilżania w porównaniu do PET i PC. W przypadku jednostki monomeru PET dwa (O-(C=O)-) segmenty są połaczone wich centrach z łańcuchem aromatycznym. Grupa (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) jest usytuowana pomiędzy atomami tlenu tych segmentów, co prowadzi do powstania następujących grup funkcyjnych C-O, C=O and C-H. Podobnie do PC. W przypadku PC, pierścienie aromatyczne są połączone poprzez segment (-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-) i związany poprzez grupy (-O-(C=O)-O-) z łańcuchami makromolekularnymi. W przeciwieństwie, PA i PU posiadają grupy funkcyjne zawierające azot (N-H) w ich jednostkach monomerów. Takie grupy C-N posiadają najniższe energie wiązania (3.17 eV), niższe niż grupy C-C (3.6 eV), C-O (3.71 eV), N-H (4.03 eV) i C-H (4.3 eV) [Sanderson R.T. 1976; Sanderson R.T. 1983]. Im niższa energia wiązania, tym łatwiejsza jest modyfikacja polimerów za pomocą metastabilnych atomów i jonów. Ostatecznie prowadzi to do



szybszej modyfikacji powierzchni polimerów zawierających grupy C-N, takich jak PA i PU. W przypadku takich polimerów jak PC i PET, łańcuchy aromatyczne stabilizują polimer, co powoduje konieczność zastosowania bardziej intensywnej obróbki w przypadku konieczności ich modyfikacji [*Groning P. 1994*]. Wprowadzenie tlenu do takich pierścieni (i przerwanie pierścieni) może łatwo prowadzić do uzyskania właściwości polarnych makrocząstek i w rezultacie obniżyć kąt zwilżania.

#### Zadanie 4 – Adaptacja powierzchni polimerowych powłokami parylenu

Parylen określany jest jako tzw. zielona chemia. Jest samoinicjujący, nie potrzeba inicjatorów, ani żadnych grup kończących. Powstaje bez rozpuszczalników ani katalizatorów. Prekursor [2.2] paracyklofan, wytwarza 100% monomer i nie są wytwarzane żadne inne produkty reakcji (Rys. 5).



Rys. 5. Powstawanie jednostki monomeru z prekursora parylenu



Cechy:

- Nieobecność w całym procesie cząstek innych niż cząsteczki monomeru
- Brak etapu zakończenia łańcucha to sugeruje utworzenie polimeru żyjącego.

Fakt, że proces taki kontrolowany jest dyfuzyjnie, nie pozwala na utworzenie ciekłej fazy przejściowej, w której siły napięcia powierzchniowego mogłyby deformować powstającą warstwę (Rys. 6). W ten sposób warstwa ma jednakową grubość w każdym miejscu. Bardzo istotne jest to, że polimeryzacja zachodzi w temperaturze pokojowej.



Rys. 6. Stopień jednorodności grubości powłok a.) powłoki osadzane w procesach kontrolowanych dyfuzyjnie b.) powłoki osadzane za pomocą procesów nie kontrolowanych dyfuzyjnie

Powłoki parylenu analizowano przy wykorzystaniu skaningowego mikroskopu akustycznego. **Skaningowy Mikroskop Akustyczny** (**SAM**) jest urządzeniem wykorzystującym zogniskowaną falę dźwiękową do analizy, pomiaru i obrazowania materiałów (proces ten nazwany jest Skaningową Tomografią Akustyczną). Jest często stosowany do analizy nieniszczącej wad powierzchniowych i ich propagacji w obszary podpowierzchniowe. **Działanie SAM** jest następujące: krótki, trwający kilka lub kilkanaście okresów fali akustycznej impuls napięcia elektrycznego (impuls nadawczy) podaje się na piezoelektryczny przetwornik, przetwarzający energię elektryczną na energię płaskiej fali akustycznej. Zasada działania została przedstawiona na schemacie (Rys. 7).



Rys. 7. Zasada działania i obserwacji skaningowego mikroskopu akustycznego

Analizę prowadzono przy wykorzystaniu częstotliwości przetwornika 120 MHz (z możliwych 5, 50 i 120 MHz). Wyższe częstotliwości umożliwiają osiągnięcie lepszej zdolności rozdzielczej, natomiast związane jest to z mniejszą głębokością wnikania. Wyniki z obserwacji przedstawiono na rys. 8. Obraz powierzchni nie wykazał zmian, ani wad. Powłoka wydawała się równomierna i odpowiednio nałożona (Rys. 8a). Nieniszcząca analiza obszaru podpowierzchniowego (Rys. 8b) wykazała różnice w przyleganiu powłoki. Analiza tomograficzna obszaru na granicy podłoże-powłoka zilustrowała występowanie miejsc silnej adhezji, słabszego przylegania i obszaru zagrożonego delaminacją. Obszary te nie były widoczne z poziomu powierzchni.



Rys. 8. Akustyczna analiza powłoki parylenu a.) obraz powierzchni b.) obraz granicy podłoże- powłoka

Powłoki parylenu mimo wielu zalet, posiadają jedną, znaczącą wadę eliminującą je z zastosowania w implantach układu krążenia- adhezja. Słabe przyleganie do podłoża mogłoby spowodować powstanie zatoru i natychmiastową śmierć. Dlatego w ramach tego zadania poszukuje się nadal powłok o właściwościach podobnych z punktu widzenia chemii, do parylenu, natomiast o znacznie większej przyczepności do podłoża.



#### Literatura pomocnicza

- [*Groning P. 1994*] Groning P, Collaud M, Dieter G, Schlapsbach L. Plasma surface treatment of polymers: Interfacial properties of adhesion. Vide Couches Minces 1994;272:140-148
- [*Poll U-H. 1980*] Poll U-H, Meichsner J. Plasmamodifizierung von Polymeroberflächen. . Plasma-Polymer-Wechselwirkung. Acta Polymerica 1980;31:757-766
- [Sanderson RT. 1976] Sanderson RT. Chemical Bonds and Bond Energies. New York, Academic Press, 1976

[Sanderson RT. 1983] Sanderson RT. Polar Covalence. New York, Academic Press, 1983

### <u>Pakiet 2</u> – Charakterystyka zaawansowanych materiałów i reakcje kolonii komórkowych

Cel: Testowanie nanometrycznej i chemicznie adoptującej powierzchni poprzez interdyscyplinarne badania materiałowe i biofizyczne.

### Zadanie 1- Właściwości powierzchniowe i charakterystyka materiału powierzchni

Powłoki podczas ich optymalizacji analizowano przy wykorzystaniu mikroskopu świetlnego. Analiza profilometryczna została wykonana przy wykorzystaniu (Veeco DekTak 150). Wykonano pomiary grubości i chropowatości. (Ra). Pomiar kąt zwilżania wykonano przy użyciu urządzenia wykonanego na własne potrzeby, bazującego na analizie wykorzystującej 2  $\mu$ l wody destylowanej (25°C, 55% wilgotności). Do pomiarów statystycznych wykorzystuje się 3 krople. Błąd standardowy nigdy nie przekraczał ± 3°. Porównując wartości kątów zwilżania powłok tuż po procesie nakładania, (max. 5 min), zwykle kąt zwilżania wzrastał o około 10° po ok. 60 min. i odpowiednio o 15° w porównaniu do wartości początkowej po 24 godzinach.

Analiza składu chemicznego osadzanych i optymalizowanych powłok wykonywana była metodą spektroskopii Ramana przy długości fali 325 nm (mikrospektrometr Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq).

Wzrost warstwy w wyniku polimeryzacji węglowodorów gazowych w plazmie – polimeryzacja w stanie plazmy wymaga ciągłego dostarczania energii. Umożliwia to poliaddycję i reakcje polikondensacji w zwykłych warunkach niepolimeryzowalnych wodorowęglanów. Dodatkowo umożliwia to wprowadzanie obcych atomów [*Morosoff N. 1990*]. Formowanie powłok za pomocą polimeryzacji plazmowej polega na powierzchniowej adsorbcji cząstek tworzących powłokę, ich dyfuzji do preferowanych miejsc i ich chemiczne związanie (etap polimeryzacji). Równocześnie,



gazowe produkty reakcji są desorbowane do próżni [*Rother B. 1992; Konuma M. 1992; Biederman H. 1992; Stoykov S. 2001; Ferrari AC. 2004*]. Pulsacyjne wyładowanie prowadzi do powstania faz plazmy tzw. "on-time" i "off-time". Podczas fazy "on-time" (= wyładowanie), gęstość cząstek wzrasta, "off-time"- maleje. W przypadku wyładowania w atmosferze C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, powstaje C<sub>2</sub>H<sup>+</sup>. Formuje się poprzez absorbcję elektronu i odłączenie wodoru (najbardziej prawdopodobny mechanizm) [*Stoykov S. 2001*].

Zadsorbowany C<sub>2</sub>H<sup>+</sup> jest cząstką najprawdopodobniej głównie tworzącą struktury sp<sup>3</sup>. W pierwszym przybliżeniu analizy warstw odjęliśmy fazę plazmy tzw. "off-time" (Rys. 9).



Rys. 9. Zależność stopnia chropowatości Ra na szybkość wzrostu powłok w czasie trwania impulsu plazmy- faza "on-time". Ciśnienie gazu, częstotliwość impulsu i całkowita grubość osadzonej powłoki po 2 minutach przedstawiono dla wszystkich punktów pomiarowych. Linie ilustrują dwie serie pomiarowe. Błąd standartowy dla Ra i grubości powłoki jest poniżej odpowiednio ±3 i ±20 nm.

W porównaniu do polimerów bez warstwy i funkcjonalizacji powierzchniowej, wykazujących kąt zwilżania pomiędzy ~77° (PA, PET) i ~115° (PC), widać, że wszystkie warstwy plazmowe prowadzą do zwiększenia kąta zwilżania. Dodatkowo na właściwości zwilżania warstw o grubości powyżej 200 nm, podłoże polimerowe nie ma żadnego wpływu (Rys. 10, 11).





Rys. 10. Zależność kąta zwilżania i szybkości osadzania od długości czasu trwania cyklu przy częstotliwości 535 Hz impulsu i 0.7 mbar  $C_2H_2$  (błąd standardowy kąta zwilżania <  $\pm$  3° i szybkości wzrostu < 0.3 nm s<sup>-1</sup>)



Rys. 11. Zależność szybkości wzrostu i kąta zwilżania na ciśnienie C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Błąd standartowy kąta zwilżania < ± 3° szybkości wzrostu < ± 0.3 nm s-1



Główny wpływ na właściwości zwilżania zależy od składu chemicznego polimerów plazmy. Ten wniosek został udowodniony za pomocą analizy przy wykorzystaniu spektroskopii Ramana (Rys. 12). Niższe częstotliwości, wyższe tzw. cykle zajęte i wyższe przepływy gazu, prowadzą do obniżenia intensywności współczynników węgla D to G ( $I_D/I_G$ ) w spektrach Ramana.



Rys. 12. Analiza przy użyciu spektroskopu Ramana powłok osadzanych metoda polimeryzacji plazmowej w 0.7 mbar  $C_2H_2$  (482 i 535 Hz) i 1.6 mbar  $C_2H_2$  (535 Hz), zawierające obliczone współczynniki  $I_D/I_G$ .

Zwykle, wszystkie węgle wykazują dominujące właściwości w zakresie spektralnym ~800 do 2000 cm<sup>-1</sup>: tzw. miejsce D (nieuporządkowanie "disorder"), występuje ~1360 cm<sup>-1</sup>, G (węgiel "graphite") w ~1560 cm<sup>-1</sup> i T występuje ~1600 cm<sup>-1</sup> [*Ferrari AC. 2004*]. Nasze analizy przy zastosowaniu spektroskopii Ramana (Rys. 13) doprowadziły nas do wniosku, że sieciowanie proporcjonalnie wzrasta ze wzrostem intensywności plazmy, przepływu gazu i częstotliwości impulsu. Możliwe



jest wystąpienie gradientów w poziomie składu chemicznego i polimeryzacji. Zjawisko to związane jest z tym, że powłoki polimeryzowane plazmowo posiadają różne segmenty monomerowe powiązane ze sobą heterogenicznie, co jest przeciwne do "normalnej", uporządkowanej makromolekularnej struktury polimeru.

### Analiza DIC (Differential Interference Contrast) i AFM (Atomic Force Microscopy):

Podłożem, na które nanoszono warstwy były płaskie dyski polimerowe. Na ich powierzchni znajdowały się nieregularnie rozłożone liniowe wypukłości. Pomiar chropowatości powierzchni wyjściowej analizowano przy wykorzystaniu mikroskopu sił atomowych. Średnia chropowatość dysków wynosiła R<sub>a</sub>=21 nm. Pomiar ten wykonano na podstawie profilu o długości 25 mm.

Analizowano następujące materiały warstwowe Tablica 1:

Materiał			
PCV- materiał wyjściowy			
Powłoka TiO <sub>2</sub>			
Powłoka Ti(C,N)			
Powłoka Si + DLC			
Powłoka DLC			

Tablica 1. Wykaz analizowanych materiałów

Wszystkie powłoki w porównywalnym stopniu pokryte były defektami na powierzchni. Rozmiary nierówności nie przekraczały kilku mikrometrów (Tablica 2). W późniejszych analizach hemozgodności nie zaobserwowano istotnego wpływu zdefektowania powierzchniowego na adhezję płytek krwi i leukocytów. Analizę powierzchni wykonano przy zastosowaniu mikroskopu sił atomowych i laserowego mikroskopu skaningowego- kontrast DIC (Rys. 13a-e, 14).





Rys. 13a. Podłoże polichlorek winylu – obraz DIC

Rys. 13a. Podłoże polichlorek winylu – AFM



Rys. 13b. Powłoka Ti(C,N) na podłożu poliuretanowym – obraz DIC



Rys. 13b. Powłoka Ti(C,N) na podłożu poliuretanowym – obraz AFM





Rys. 13c. Powłoka TiO<sub>2</sub> na podłożu poliuretanowym - obraz DIC; widoczna regularna nanostruktura na powłoce



Rys. 13d. Powłoka DLC dotowana krzemem – obraz DIC i AFM

Rys. 13c. Powłoka TiO<sub>2</sub> na podłożu poliuretanowym - obraz AFM ; widoczna regularna nanostruktura na powłoce



Rys. 13d. Powłoka DLC dotowana krzemem – obraz DIC i AFM



Rys. 13e. Powłoka DLC – obraz DIC

Rys. 13e. Powłoka DLC – obraz AFM

Rys. 13. Analiza powierzchni przy zastosowaniu mikroskopu sił atomowych i laserowego mikroskopu skaningowego- kontrast DIC



Rys. 14. Trójwymiarowe projekcje topografii powłok TiO<sub>2</sub> (a), Ti(C,N) (b), Si + DLC (c), DLC (d), prezentowany obszar jest rzędu wielkości pojedynczych komórek krwi



Tablica.2.	Średnia	chropowatość	i wysokość	nierówności	powierzchni	badanych	powłok:
------------	---------	--------------	------------	-------------	-------------	----------	---------

Powłoka	średnia chropowatość R₄ [nm]	średnia wysokość nierówności [nm]	
PU	21	70	
TiO <sub>2</sub>	116	289	
Ti(C,N)	219	600	
Si + DLC	188	455	
DLC	136	355	

Poniżej zaprezentowano histogram wysokości dla analizowanych powłok (Rys. 15). Widać stosunkowo płaskie podłoże oraz podobny charakter rozkładów nierówności na powierzchniach powłok.



Rys. 15. Histogram topografii analizowanych powłok oraz poliuretanowego podłoża

#### Wyniki testu zarysowania

#### Badane materiały:

- Powłoka DLC
- Powłoka Si-DLC
- Powłoka TiO<sub>2</sub>
- Powłoka Ti

## Parametry badań dla standardowego wgłębnika Rockwell C o promieniu zaokrąglenia R=200µm

Długość zarysowania ustalono na 5mm a obciążenie maksymalne 20N. Zestawienie wartości obciążenia krytycznego L<sub>c1</sub> powodującego powstawanie pęknięć o charakterze kohezyjnym zawiera tabela1. Nie jest możliwe wyznaczenie dla tych systemów obciążenia krytycznego L<sub>c2</sub> powodującego zniszczenie połączenia adhezyjnego powłoki z podłożem. Powodowane jest to tym, że zanim obciążenie wzrośnie na tyle by zniszczyć to połączenie następuje niszczenie podłoża krzemowego poprzez znaczne pękanie i odłupywanie krzemu. W tablicy 3 jako L<sub>c2</sub> oznaczono obciążenia powodujące zniszczenie systemu na skutek pękania podłoża krzemowego. Pęknięcia kohezyjne przedstawiono na pierwszych obrazach dla kolejnych powłok (Rys. 16-18). jedynie dla powłoki TiO<sub>2</sub> obserwowano przecieranie powłoki i jej łuszczenie przy obciążeniu 14N. Testów nie przeprowadzono dla powłoki Ti ze względu na stan powłoki, która łuszczy się i odpada samorzutnie od podłoża.

Powłoka	L <sub>c1</sub> [N]	h <sub>c1</sub> [μm]	L <sub>c2</sub> [N]	h <sub>c2</sub> [μm]
DLC	10	15.9	23.4	26.8
Si-DLC	10.2	14.1	23.7	24.6
TiO <sub>2</sub>	10.7	16.3	23.4	26.2

Tablica 3. Wyniki badań dla standardowego wgłębnika Rockwell C





Rys. 16a. DLC- obciążenie 10N



Rys. 16b. DLC- obciążenie 23N



Rys. 17a. Si-DLC- obciążenie 10N



Rys. 17b. Si-DLC- obciążenie 24N



Rys.18a. TiO2- ociążenie 11N

Rys.18b. TiO2 - ociążenie 24N

Wykorzystując ten sam wgłębnik przeprowadzono testy dla powłok nałożonych na podłożach polimerowych PU. Dla każdej z powłok stwierdzono ich bardzo dobrą adhezję do podłoża - nie obserwowano ich odwarstwiania i utraty adhezji nawet przy stosowanym obciążeniu 5N. Natomiast przy obciążeniu około 0.2N obserwowano powstawanie pęknięć o charakterze kohezyjnym. Wzrost obciążenia prowadzi do intensyfikacji tego procesu. Typową siatkę pęknięć w torze zarysowania przedstawiają zdjęcia na rys. 19-22. Powstające pęknięcia przy obciążeniu 4N prowadzą do wykruszania niewielkich obszarów powłoki. Należy jednak podkreślić, że powstawanie takich pęknięć dla twardej powłoki nałożonej na polimerowym podłożu jest nieuniknione ze względu na bardzo duże deformacje układu podczas testu. Dla obciążenia 1N odpowiadające deformacje wynoszą 200µm co wielokrotnie przewyższa grubość nałożonej powłoki.



Rys. 19. DLC na PU

Rys. 20. Si-DLC na PU



Rys. 21. TiO<sub>2</sub> na PU

Rys. 22. Ti na PU



Testy wykazały, że powłoki te kontakcie z diamentowym wgłębnikiem charakteryzują się niskim współczynnikiem tarcia, których przebiegi przedstawiają schematy (Rys. 23 i 24) odpowiednio dla powłok na krzemie i PU.



Rys. 23. Przebieg współczynnika tarcia przy teście zarysowania dla powłok nałożónych na krzemie



Rys. 24. Przebieg współczynnika tarcia przy teście zarysowania dla powłok nałożónych na PU



### Parametry badań dla standardowego wgłębnika Rockwell C o promieniu zaokrąglenia R=20µm

Ponieważ nie można było określić różnic wartości obciążenia krytycznego dla badanych powłok przy wgłębniku o promieniu 200µm wykonano testy zarysowania wgłębnikiem o mniejszym promieniu 20µm. Wgłębnik o mniejszym promieniu wprowadza do systemu znacznie większe naprężenia przy mniejszych obciązeniach. Stąd naprężenia styczne odpowiedzialenie za zrywanie połączenia z podłożem są znacząco większe i można przekroczyć wytrzymałość zanim dojdzie do pękania podłoża, które następuje przy obciążeniu około 1.2-1.4N Wyniki testów przy wgłebniku 20µm zestawiono w tablicy 4 oraz rys. 25- 27. Jako L<sub>c1</sub> przyjęto wykruszanie i usuwanie powłoki z podłoża.

Dla powłoki DLC pierwsze pęknięcia pojawiają się przy obciążeniu 0.2N. Natomiast pierwsze przetarcia powłoki następują pod obciążeniem 0.4N. wprowadzenie atomów krzemu do powłoki węglowej skutkuje pogorszeniem jej adhezji. Widoczne jest to na testach zarysowania jako łuszczenie powłoki już przy 0.1N. Najlepszą z pośród powłok okazała się powłoka TiO<sub>2</sub> dla której nie obserwowano zniszczeń adhezyjnych. Przy obciążeniu 0.22N pojawiały się pierwsze pęknięcia. Wzrost obciążenia do ok. 1.3N powodował dla wszystkich systemów pękanie i duże wykruszenia krzemowego podłoża.

powłoka	L <sub>c1</sub> [N]	h <sub>c1</sub> [μm]	L <sub>c2</sub> [N]	h <sub>c2</sub> [μm]
DLC	0.2	0.6	0.4	1.5
Si-DLC	Х	Х	0.1	0.4
TiO <sub>2</sub>	0.22	0.7	0.7	4.0

Tablica 4. Wyniki testów przy wgłebniku 20µm



Rys.25a. DLC na krzemie 0.2N

Rys.25b. DLC na krzemie ?N



Rys.26a. Si-DLC na krzemie 0.1N

Rys.26b. Si-DLC na krzemie 0.5N



Rys.27a. Ti $O_2$  na krzemie 0.22N

Rys.27b. TiO₂ na krzemie ?N

#### Testy indentacyjne

Pomiary wykonywano wykorzystując diament o geometrii Vickersa przy obciążeniach 20mN do 1N. Analizowano krzywe w celu wyznaczenia obciążenia prowadzącego do pękania powłok. Na rys. 28-30 przedstawiono obrazy powierzchni powłok po testach przy obciążeniu 100mN.

Dla powłoki Si-DLC wyraźnie widoczna jest delaminacja powłoki w obszarze odcisku i odsłanianie podłoża. Pękanie następuje przy obciążeniu średnio 10mN co jest widoczne na krzywej indentacyjnej jako nagły wzrost głębokości penetracji (Rys. 31). Takiego efektu nie wykazują powłoki DLC i TiO<sub>2</sub>. Mniejsza wytrzymałość powłoki Si-DLC jest także widoczna porównując maksymalne głębokości penetracji dla wszystkich systemów (Rys. 32). Dla tej powłoki wynosi ona 735nm, a dla DLC i TiO<sub>2</sub> odpowiednio 677 i 696 nm.



Rys. 28. DLC- 100mN

Rys. 29. Si-DLC – 100mN



Rys. 30. TiO<sub>2</sub>-DLC – 100mN



Rys. 31. Krzywe indentacyjne uzyskane z testów wgłębnikiem Vickersa i obciązeniu 100mN

Rys. 32. Maksymalne głębokości penetracji

#### Zadanie 2- Kinetyka adhezji komórek

Test hemozgodności materiałów ma na celu wykrycie niekorzystnych interakcji między sztuczną powierzchnią (która może aktywować lub zniszczyć składniki krwi) i krwią [*Sanak M. 2010*] . W warunkach przepływu tętniczego, ze względu na duże naprężenia ścinające, płytka jest komórką mająca znaczenie dla hemozgodności. Klasyczna aparatura do badania dynamicznego hemozgodności obejmuje komorę przepływową z powierzchnią styku płytki pomiędzy krwią i testowanym materiałem. W opisywanym badaniu analizowano uproszczony model wywoływania naprężenia ścinającego na krew w oparciu o stożek wiskozymetru rotacyjnego. W badaniach zastosowano test symulujący warunki przepływu naczyniowego. Celem badań była symulacja dynamicznej interakcji między krwią i biomateriałem. Test dynamiczny różni się od statycznej interakcji poprzez wprowadzenie sił ścinających aktywujących komórki krwi. Ścinanie, które jest mierzona w jednostkach ciśnienia, wyrażone jest jako prędkość ścinania, która zmienia się liniowo z naprężeniem, zapewniając stałą lepkość krwi. Krew, stosowane w tych badaniach posiada związane koagulatory



(np. Ca) najczęściej za pomocą cytrynianu sodu lub heparyny, aby zapobiec krzepnięciu. W celu uniknięcia artefaktów, testy dynamiczne dla hemozgodności korzystnie przeprowadzane są za pomocą jednej linii krwi i czas ich trwania wynosi zwykle od 2 do 5 minut. Badanie opiera się o analizator stożek-płyta- urządzenie zatwierdzony do stosowania klinicznego w ocenie chorób zakrzepowych.

Próbki krwi po teście ścinania były analizowane przy użyciu cytometru przepływu EPICS XL (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA, USA). Ekspresję markerów aktywacji płytek krwi mierzono CD61 zależnych obiektów za pomocą przeciwciał PAC-1 na zmiany konformacyjne glikoproteiny IIb / IIIa, a przy użyciu CD62P dla P-selektyny.

Wyniki badań przedstawiono na rys 33-36.



Rys. 33. Zależność procentowej wartości płytek od materiału powłoki, zmierzonej po teście Impact R



Rys. 34. Udział płytek zaktywowanych w porównaniu z procentowym udziałem płytek wyjściowych



Rys. 35. Procentowy udział agregatów w porównaniu z udziałem płytek zaktywowanych





Rys. 36. Procentowy udział agregatów w porównaniu z udziałem płytek w krwi po teście Impact R

Liczba obiektów zadherowana na powierzchni analizowanych krążków analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego LSM 5 Exciter. Jedną z technik analizy mikroskopowej elementów morfotycznych krwi jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych koniugowanych fluochromami. Do analizy zastosowano przeciwciała anty CD 45 (analiza leukocytów) i anty CD 62 P (analiza zaktywowanych płytek). Ilość obiektów o różnych rozmiarach znajdujących się na powierzchniach materiałów po teście Impact-R oraz całkowity powierzchniowy udział procentowy analizowano stosując program AxioVision 4.8 z pakietem oprogramowania "Auto Measure" i "Auto Measure Plus" (Rys. 37- 40). Przedstawione wyniki uzyskano z trzech próbek, dla których przeanalizowano 8.64 mm<sup>2</sup> wzdłuż średnicy, z wyłączeniem obszaru znajdującego się w centrum. Jako błąd przyjęto błąd standardowy.





Rys. 37. Liczba płytek krwi na powierzchni.

Rys. 38. Liczba mniejszych agregatów znajdujących się na powierzchni




Rys. 39. Liczba dużych agregatów znajdujących się na powierzchni



#### Kinetyka adhezji komórek na elementach rurowych

Materiał do badań stanowiły fragmenty polimeru o zmodyfikowanych powierzchniach. Szczególnie w przypadku długoterminowego stosowania bioprotez sercowych krew eksponowana jest na działanie wielu czynników niefizjologicznych. W takich przypadkach w wyniku kontaktu krwi ze zmodyfikowaną powierzchnią materiałów syntetycznych możliwa jest aktywacja układu płytkowego, której skutkiem może być z jednej strony bezpośrednia adhezja płytek krwi do zmodyfikowanej powierzchni a z drugiej strony aktywacja płytek krwi i tworzenie kompleksów płytkowo-leukocytarnych. W związku, z czym wydaje się istotną ocena aktywacji układu płytkowo-leukocytarnego.

W ocenie aktywacji układu płytkowego badano właściwości adhezyjne modyfikowanych powierzchni, stopień agregacji płytek lub kompleksów płytkowo – leukocytarnych do ich powierzchni. Badano także aktywację płytek w wyniku kontaktu ze zmodyfikowaną powierzchnią poprzez oznaczanie ilości płytek krwi wykazujących ekspresją receptora aktywacji CD62 P oraz poprzez oznaczania ilościowe

i jakościowe możliwości tworzenia agregatów leukocytarno płytkowch CD62/ CD45.

W badaniach przyjęto 4 możliwe schematy interakcji krwi z modyfikowaną powierzchnią materiałów, co schematycznie zostało przedstawione na rys. 41.

37



Rys. 41. Możliwy scenariusz interakcji krew-biomateriał: A – materiał biozgodny niewywołujący aktywacji układu płytkowego, B – aktywacja układu płytkowego i jego adhezja na powierzchni biomateriału, C – aktywacja układu płytkowego z brakiem adhezji i tworzenie ognisk embolizacji, D – powierzchnia silnie trombogenna, ale jednocześnie deponowany materiał jest szybko usuwany w wyniku mikroembolizacji i lizy

Badania prowadzono z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej w celu oceny ilościowej aktywnych płytek krwi oraz kompleksów leukocytarnopłytkowych w kontakcie krwi z modyfikowaną powierzchnią polimerów. Poniżej przedstawiono przykładowe obrazy cytometryczne dla analizy aktywacji układu płytkowego (Rys. 42, 43).



Rys. 42. Przykładowa cytometryczna analiza aktywacji płytek krwi dodatnich względem receptora CD62P oraz tworzeni kompleksów płytkowo – leukocytarnego pod wpływem oddziaływania ze zmodyfikowaną powierzchnią tkanek. A – bramka wyznaczająca granicę obszaru w którym znajduje się analizowana grupa komórek



Rys. 43. Przykładowa cytometryczna analiza aktywacji płytek krwi, dodatnich względem receptora CD62P oraz tworzenie kompleksów płytkowo – leukocytarnego pod wpływem oddziaływania ze zmodyfikowaną powierzchnią tkanek zastawki aortalnej.**D1** – komórki leukocytarne pozytywne względem receptora CD 45, **D2** – agregaty leukocytarno płytkowe wykazujące podwójną fluorescencję CD45/CD62P, **D3** - aktywne płytki krwi pozytywne względem receptora CD 62P, **D4** – komórki wykazujące ujemną reakcję względem receptorów CD45 oraz CD62P

W przypadku badanych materiałów polimerowych odsetek komórek pozytywnych względem receptora CD62P oraz agregatów leukocytarno-płytkowych nie przekraczał 2%, i wartości te były porównywalne z wartościami obserwowanymi dla tkanek natywnych które stanowiły materiał referencyjny (Rys. 44- 47).



Rys. 44. Wykres przedstawiający wartości średnie aktywacji układu płytkowego i tworzenie agregatów leukocytarno - płytkowych w kontakcie krwi z modyfikowaną powierzchnią materiałów polimerowych



Rys. 45. Wykres przedstawiający wartości średnie aktywnych płytek krwi CD62P w kontakcie krwi z modyfikowaną powierzchnią materiałów polimerowych



Rys. 46. Wykres przedstawiający wartości średnie komórek CD45 pozytywnych w kontakcie krwi z modyfikowaną powierzchnią materiałów polimerowych



Rys. 47. Wykres przedstawiający wartości średnie agregatów leukocytarno-płytkowych w kontakcie krwi z modyfikowaną powierzchnią materiałów polimerowych

W badaniach wykorzystano również technikę mikroskopii fluorescencyjnej w celu oceny stopnia adhezji komórek na modyfikowanych materiałach. Fragmenty materiału polimerowego po przeprowadzonym teście płukano w roztworze soli



buforowanej PBS w celu usunięcia rezydujących krwinek czerwonych lub też innych niezwiązanych elementów morfotycznych krwi. Po przepłukaniu materiału barwiono przy użyciu przeciwciał pierwszorzędowych anty CD45 – koniugowanych z PE oraz anty CD62 P koniugowanego z FITC. Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez okres 30 min. Po tym czasie badane fragmenty polimeru płukano ponownie w PBS i obserwowano przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu odwróconego (Rys. 48).



Rys. 48. Obraz mikroskopowy badanych materiałów parylenowych poddanych kontaktowi z krwią. Widoczne nieliczne wykazujące czerwoną fluorescencję zadherowane płytki krwi pozytywne względem receptora CD62P ( zielona fluorescencja), komórki CD 45 pozytywne (czerwona fluorescencja), agregaty leukocytarno-płytkowe ( wykazujące podwójną fluorescencję)

Ponadto oprócz badań adhezji elementów morfotycznych krwi oceniano również kinetykę adhezji komórek wzorcowych w kontakcie z badaną powierzchnią polimerów, wykorzystując w tym celu krótkoterminowy test ścinania. Następnie w celu oceny morfologicznej i ilościowej komórki obserwowano z użyciem techniki mikroskopii fluorescencyjnej oraz kontrastu fazowego (Rys. 49- 52).





Rys. 49. Obraz mikroskopowy badanych materiałów polimerowych. (DC 008 – 5) poddanych krótkotrwałemu kontaktowi z komórkami wzorcowymi. Barwienie przy zastosowaniu barwnika DAPI barwiącego jądra komórkowe (niebieska fluorescencja) oraz obraz morfologii zadherowanych komórek obserwowanych z zastosowaniem kontrastu fazowego







Rys. 50. Obraz mikroskopowy badanych materiałów polimerowych. (DC 008 – 4) poddanych krótkotrwałemu kontaktowi z komórkami wzorcowymi. Barwienie przy zastosowaniu barwnika DAPI barwiącego jądra komórkowe (niebieska fluorescencja) oraz obraz morfologii zadherowanych komórek obserwowanych z zastosowaniem kontrastu fazowego



Rys. 51. Obraz mikroskopowy badanych materiałów polimerowych. (DC 008 – 6) poddanych krótkotrwałemu kontaktowi z komórkami wzorcowymi. Barwienie przy zastosowaniu barwnika DAPI barwiącego jądra komórkowe (niebieska fluorescencja) oraz obraz morfologii zadherowanych komórek obserwowanych z zastosowaniem kontrastu fazowego

W przypadku badanych materiałów obserwowano szybką adhezję komórek wzorcowych do badanych materiałów, obserwowano liczne komórki w polu widzenia właściwie zadherowane i wykazujące prawidłową morfologię co może stanowić wskaźnik predykcyjny dla biolizowania badanych powierzchni.

#### Literatura pomocnicza

- [*Biederman H. 1992*] Biederman H, Osada Y. Plasma polymerization processes. Amsterdam: Elsevier, 1992
- [*Ferrari AC 2004*] Ferrari AC, Robertson J. Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond–like carbon, and nanodiamond. Phil Trans R Soc Lond A 2004;362:2477-2512
- [Konuma M. 1992] Konuma M. Film deposition by plasma techniques. Berlin: Springer, 1992
- [*Morosoff N. 1990*] Morosoff N. An introduction to plasma polarisation. In: d'Agostino R, editor. Plasma deposition, treatment and etching of polymers. San Diego: Academic Press, 1990
- [*Rother B. 1992*] Rother B, Vetter J. Plasmabeschichtungsverfahren und Hartstoffschichten. Leipzig: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1992
- [Sanak M. 2010] M. Sanak , B. Jakiela, and W. Wegrzyn; Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests; BULLETIN of the POLISH ACADEMY of SCIENCES TECHNICAL SCIENCES Volume 58, Issue 2, p. 317-322, June 2010
- [*Stoykov S. 2001*] Stoykov S, Eggs C, Kortshagen U. Plasma chemistry and growth of nanosized particles in a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> RF discharge. J Phys D 2001;34:2160-2173



#### Pakiet 3 – Inżynieria biomedyczna

Cel: Rozwiązywanie nieprzewidywalnych procesów akceptacji implantu, które mogą wystąpić w zastosowaniu klinicznym.

#### Zadanie 1- Reakcje limfocytów T i B na zmodyfikowane powierzchnie biomateriałów

Pierwszym etapem realizowanych prac było poznanie dokładnej mikrostruktury powłoki, stanowiącą modyfikację powierzchni biomateriału. Wpływ mikrostruktury, budowy krystalicznej powłoki ma istotne znaczenie w wywoływaniu reakcji immunologicznych. Analiza mikrostrukturalna została przeprowadzona przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) TECNAI G<sup>2</sup> F20 (200 kV FEG). Cienkie folie- preparaty do analizy mikroskopowej, przygotowano techniką zogniskowanej wiązki jonowej tzw. "focused ion beam (FIB)". Analizy TEM prowadzono z przekroju poprzecznego powłoki (Rys. 52).



Rys. 52. Analiza TEM- jasne pole mikrostruktury powłoki Ti(C,N) na przekroju poprzecznym

Stwierdzono występowanie silnego zdefektowania. Zaobserwowanie rozwarstwienie powłoki, a na większych powiększeniach widoczna jest struktura wielowarstwowa powstała w monowarstwie. Jest to najprawdopodobniej efekt rozseparowania plazmy (Rys. 53).





Rys. 53 a.) Jasne pole TEM mikrostruktury powłoki Ti(C,N)- przekrój poprzeczny b.)struktura wielowarstwowa

Stwierdzono budowę nanokrystaliczą powłoki. Wyniki zaprezentowano w ciemnym polu (Rys. 54). Analizę fazową przeprowadzono za pomocą dyfrakcji elektronowej. (electron diffraction pattern).



Rys. 54. Mikrostruktura TEM powłoki Ti(C,N)- przekrój poprzeczny a). jasne pole; b). ciemne pole; c). dyfrakcja elektronowa (analiza fazowa)

Analiza fazowa została potwierdzona za pomocą wysokorozdzielczej mikroskopii elektronowej HREM (Rys. 55).



Rys. 55. Wysokorozdzielcza mikroskopia elektronowa- analiza struktury powłoki Ti(C,N)

Analiza jakościowa i ilościowa została przeprowadzona przy wykorzystaniu detektora EDS "energy dispersive spectroscopy detektor". Analiza liniowa wzdłuż powłoki prezentuje zawartość wyszczególnionych pierwiastków (Rys. 56).



Rys. 56. EDS- jakościowa analiza chemiczna. Analiza liniowa

Wyniki analizy jakościowej EDS (analiza składu chemicznego) są przedstawione w tablicy 5



Tablica 5 Wyniki analizy jakościowej EDS

Pierwiastek	Udział	Błąd	Udział	Błąd
	masowy %	standartowy	atomowy %	standartowy
		%		%
С	19.4	2.2	34.8	2.0
Ν	26.6	3.2	40.8	2.6
Ti	53.9	2.2	24.2	1.5

Liczne defekty i problem z uzyskaniem odpowiednio dobrej jakości materiałów powłokowych związany jest z podłożem. Z założenia na podłożach z polichlorku winylu, nakładanie powłok metodami fizycznymi jest bardzo trudne. Aktualnie trwają prace nad dodatkową modyfikacją powierzchniową polimerów stanowiących podłoże pod nakładanie powłok.

### Biotechnologia- Reakcja limfocytów T i B w odpowiedzi na kontakt z powierzchnią modyfikowanych materiałów.

Długoterminowe stosowanie bioprotez sercowych konstruowanych w oparciu o modyfikowane materiały polimerowe może prowadzić to do stymulacji reakcji zapalnej. W iei przebiegu dochodzi do aktywacji elementów układu odpornościowego, w tym układu dopełniacza, cytokin, neutrofili oraz zmian na poziomie receptorów limfocytów T i B. Reakcja zapalna może prowadzić w konsekwencji do uszkodzenia komórek śródbłonka naczyń i zwiększenia jego przepuszczalności. Tego rodzaju kaskada reakcji immunologicznych może prowadzić do powikłań w miejscu wszczepienia bioprotezy jak i do uogólnionej reakcji zapalnej. W związku z czym istotna jest ocena w jakim stopniu modyfikacja powierzchniowa polimerów na bazie których konstruowane są bioprotezy może przyczyniać się do

50



generowania reakcji ze strony sub-populacji limfocytów T i B. W badaniach jako materiał referencyjny stosowano tkanki biologiczne (Rys. 57, 58).



Rys. 57. Wartości średnie procentowe poszczególnych subpopulacji limfocytów, poddanych kontaktowi ze sztuczną powierzchnią modyfikowanych poliuretanów



Rys.58. Wartości średnie procentowe poszczególnych subpopulacji limfocytów, poddanych kontaktowi z powierzchnią tkanek acellularnych sieciowanych za pomocą flawonoidów

Wstępne wyniki badań, nie wykazały istotnej aktywacji tych komórek w kontakcie z powierzchnią tkanki acellularnej oraz z powierzchnią materiałów polimerowych, z modyfikowaną powierzchnią. Jedynie w przypadku receptora CD 14

dla monocytów obserwowano jego większy odsetek tych komórek w przypadku tkanek acellularnych w porównaniu do materiałów polimerowych.

#### Zadanie 2- Osadzanie komórek śródbłonka na powierzchni biomateriału

Głównym celem prowadzonych prac jest modyfikacja wewnętrznych części protez naczyniowych. Jednym z głównych rozwiązań są materiały- analogi tkankowe. Jest to połączenie rozwiązań klasycznej inżynierii materiałowej z inżynierią biomedyczną. Są to materiały dla protez układu krążenia przeciwdziałające powstawaniu skrzeplin oparte o odtworzenie struktury naczynia krwionośnego. Idea odtworzenia blaszki podstawnej śródbłonka naczyń krwionośnych oparta jest na podstawowych aspektach inżynierii biomedycznej: odpowiedniego trzech rusztowania, zadokowanych komórek tworzących właściwą tkankę i odpowiedniego sygnału porządkującego organizacje tkanki. Koncepcja powłok współpracujących z krwioobiegiem, czyli nie powodujących powstawania zakrzepów lub powodujących wykrzepianie w znikomym zakresie oparta jest o tak zwany dialog międzytkankowy.

Pierwsze rozwiązanie będące podstawą prowadzonych prac w tym zadaniu dotyczy materiałów umożliwiających wpływ na migracje komórkową. Prace na tym etapie miały charakter podstawowy, poznawczy, zachowania komórek w zależności od modyfikacji podłoża. Na połowie grubości powłok, które miały całkowitą grubość do 50 nm wyrzeźbiono kanaliki migracyjne (Rys. 59, 60). Zastosowanie wysoko wyspecjalizowanej techniki było możliwe dzięki współpracy z Instytutem Optoelektroniki Wojskowej Akademii Technicznej.

52



Rys. 59. Zasada ablacji laserowej materiałów



Rys. 60. Kanaliki migracyjne dla komórek o głębokości połowie grubości powłok

Ablacja- pod tym pojęciem rozumie się odparowanie warstwy wierzchniej różnego rodzaju materiałów: metali, ceramik, tworzyw sztucznych i innych [*Marczak J. 2006*]. Proces ablacji występuje w trakcie trwania impulsu laserowego, występuje oddziaływanie promieniowania laserowego (pochłanianie i rozpraszanie) z wyrzucaniem materiału

(w postaci pary i cieczy). W wyniku napromienienia powierzchni materiałów za pomocą impulsu promieniowania laserowego o odpowiedniej gęstości energii w czasie (gęstości mocy), zachodzą takie zjawiska jak: absorpcja promieniowania, zjawiska cieplne lub fotochemiczne. Pożądany jest mały współczynnik odbicia promieniowania, a odpowiednio duże wzbudzenie powierzchni wymaga wiązek laserowych o dużych natężeniach i małej głębokości absorpcji promieniowania laserowego (Rys. 59). Proces ablacji materiału podzielić można na kilka etapów:

- zdeponowana energia (w objętości) osiąga wartość progową procesu ablacji;
- odparowanie warstwy wierzchniej materiału może zachodzić na drodze termicznej (pirolitycznej) lub fotolitycznej (dla promieniowania z obszaru nadfioletu);
- powstały obłok plazmy składa się z: fragmentów cząsteczek materiału elektronów/jonów oraz produktów reakcji;
- obłok plazmy powoduje pochłanianie i rozproszenie padającego impulsu promieniowania laserowego;

53

 wygenerowana fala dźwiękowa (w głąb materiału) po odbiciu od granicy faz może powodować zwiększenie produktów reakcji.

Grubość odparowanej warstwy wierzchniej (głębokość ablacji) zależy od:

- parametrów materiału: optycznych głębokości absorpcji promieniowania lasera; termicznych – współczynnika przewodzenia ciepła, współczynnika dyfuzji temperatury i ciepła parowania;
- parametrów wiązki laserowej: długości fali promieniowania lasera (występuje silna zależność współczynnika absorpcji materiału od długości fali), gęstości energii i czasu trwania impulsu laserowego.

Na powierzchni zmodyfikowanych w postaci kanalików migracyjnych naniesiono komórki śródbłonka HUVEC. Hodowlę prowadzono w warunkach 5% CO<sub>2</sub> 100% wilgotności, 37°C. Komórki po czterech dniach utrwalono w 4% roztworze para formaldehydu i wybarwiono mitochondria, cytoszkielet i jądra komórkowe. Stwierdzono tendencję migracji komórkowej w kierunku kanalików. Wydaje się, że powierzchnie zmodyfikowane metoda ablacji laserowej sprzyjają adhezji. Wyniki przedstawiono na rys. 61 i 62.





Rys. 61. Interakcja komórka- materiał w kanalikach migracyjnych



Rys. 62. Interakcja komórka- materiał w kanalikach migracyjnych- zobrazowanie włókien aktynowych i tworzących się lamelipodiów

Na rys. 63 widoczne włókna aktynowe. Komórka tworzy, charakterystyczne w przypadku migracji, lamelipodia na końcach włókien aktynowych. Rys. 64



przedstawia dwie komórki w różnych miejscach. Jedna na powierzchni niezmodyfikowanej. Ma ona wysunięte lamelipodia w kierunku kanalika. Komórka w kanaliku wydaje się być w stanie spoczynku.



Rys. 63. Komórki w dwóch różnych miejscach; wydłużona z charakterystycznymi wypustkami na podłożu niezmodyfikowanym, komórka o charakterze spoczynkowym w kanaliku

Pytanie; dlaczego obserwowaliśmy takie zjawisko? Co wpłynęło na efekty chemotaksji? Dlaczego obszar modyfikowany plazmowo jest bardziej aprobowany przez komórki niż obszar tzw. nienaruszony?

Interpretacja tych zjawisk dokonana została przy zastosowaniu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) (Rys. 64- 66). Cienkie folie (preparaty do TEM) wykonano nowoczesną technika zogniskowanej wiązki jonowej "focuse ion beam" (FIB) (Rys. 64). Technika ta umożliwiła nam przygotowanie cienkiej folii dokładnie z obszaru nas interesującego.



Rys. 64 a.) Obraz SEM powierzchni z kanalikami migracyjnymi



Rys. 64 b.) Wybór miejsca analizy TEM



Rys. 64 c.) Naniesienie maski Pt i przygotowanie cienkiej folii metodą FIB

Rys. 65 i 66 przedstawiają granice pomiędzy obszarem przetopionym i nienaruszonym. Wskazuje to na to, że podczas ablacji laserowej materiał został odparowany z wyszczególnionych obszarów, ale na ich granicy zaszła wtórna reakcja polegająca na wtórnym osadzaniu ("resputtering effect"). Na podstawie analizy dyfrakcji elektronowej ("selected area electron diffraction pattern" SAED) stwierdzono nanokrystliczny charakter ziaren z obszaru nienaruszonego. Obszar przetopiony charakteryzuje się już znacznie większymi ziarnami. Dlatego już teraz można było stwierdzić, ze wielkość ziarna ma istotne znaczenie na przyleganie komórkowe. Znacznie bardziej korzystne jest ziarno większe. Jaki jest obszar graniczny, czyli jak duże może być ziarno, które komórka będzie jeszcze bardziej "preferować", tego jeszcze nie udało się określić.



Rys. 65. Granice pomiędzy obszarem przetopionym i nienaruszonym



Rys. 66. Analiza TEM granic pomiędzy obszarem przetopionym i nienaruszonym

Kolejne rozwiązania, propozycje przygotowania podłoże pod zasiedlanie komórkowe miały już charakter aplikacyjny. Jednym z rozwiązań będących podstawą prowadzonych prac w tym zadaniu dotyczy materiałów porowatych wykonanych metodą elektroprzędzenia (ang. Electrospinning). Zaznaczamy, że w początkowej fazie analiz, badania prowadzono przy wykorzystaniu płaskich próbek, mat. Aktualnie wykonywane są elementy rurowe z polimerów metodą elektroprzędzenia, czyli rurki porowate. Takie rusztowania mają główne przeznaczenia pod zasiedlanie komórkowe i wytworzenia tkanki.

Dla małogabarytowych protez układu krążenia, takich jak element naczyń, czy pierścienie zastawek, najbardziej obiecującą techniką wykonania rusztowania pod zasiedlanie tkanki jest metoda eletroprzędzenia (ang. Electrospinning) (Rys. 67).



Rys. 67. Schemat układu do produkcji materiałów metodą "electrospinning"

Metoda elektroprzędzenia umożliwia optymalną kontrolę mikrostruktury (płaskie rusztowania z wewnętrzną strukturą 3D) i budowę włókienkową odwzorowującą strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej. Znakomite właściwości mechaniczne włókienek umożliwiają rozwinięcie właściwego fenotypu komórek.

Do materiału porowatego dokowane są białka stanowiące podłoże pod zasiedlanie komórkowe. W przypadku materiałów kontaktujących się z krwią mogą to być białka osocza lub fibronektyna jako podłoże pod komórki śródbłonka. Sterowanie ilością zadokowanych białek prowadzone jest poprzez funkcjonalizację powierzchniową wykonaną metodami PVD (physical vapour deposition)- fizyczne metody nakładania powłok oparte o odparowanie tarczy. Zostało to potwierdzone licznymi próbami laboratoryjnymi. Dodatkowo prowadzona jest <u>obróbka powierzchniowa</u> (fizyczna i chemiczna obróbka powierzchniowa) wykonywana za pomocą technik plazmowych. Obróbka taka umożliwia zmianę właściwości powierzchniowych modyfikowanych polimerów w skali nano-chropowatości. Naszym celem jest analog tkanki. Badania doprowadzić mają do stworzenia środowiska samokontroli narastania tkanki. Proces ten jest opisany w literaturze w innym zastosowaniu [*Leung B. M. 2007*; *Hynes R. O. 1999*] Do tego celu w kolejnych etapach prac zastosujemy komórki tkanki mięśniowej.



Samokontrola komórkowa prowadzona jest w takim układzie dzięki zadokowaniu komórek tkanki mięśniowej po drugiej stronie materiału porowatego. W celu zapewnienia stabilności konstrukcji materiałowo- biologicznej. Jako podłoże pod komórki mięśniowe wprowadzany jest kolagen. Dodatkowo kolagen współtworzy w 1-2% tkankę mięśniową (Rys 68). Odpowiednia hodowla komórkowa i dostarczenie właściwych substancji bioaktywnych – "bioprinting" - doprowadza do samounaczynienia i podjęcia wstępnych czynności życiowych. Ostatecznie powstać powinien implant jako w pełni funkcjonalna struktura tkankowa.



Rys. 68. Docelowa konstrukcja analogu tkankowego z zapewnieniem dialogu tkankowego

Analiza SEM materiału porowatego przygotowanego metodą "elektrospiningu" przedstawiono na rys. 69. Materiały porowate powstały przy współpracy z Center for Biomedical Engineering and Physics; Medical University Viena AKH Austria, jako wkład własny do realizacji projektu.





Rys. 69. Analiza SEM (Scanning Electron Microscopy) materiału porowatego przygotowanego metodą "electrospinning" przez współpracujący ośrodek- Center for Biomedical Engineering and Physics; Medical University Viena AKH Austria

#### Wyniki

Komórki były hodowane w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% powietrze, 100% wilgotności. Komórki śródbłonka HUVEC (human umbilical vascular endothelium cells) były hodowane przy wspomaganiu czynnikami wzrostowymi i lekami przeciwdziałającymi powstawanie odczynów zapalnych i witaminy (Medium EGM-2). Początkowo eksperymenty polegały na nałożeniu komórek śródbłonka o gęstości 50000 cells/cm<sup>2</sup> bez wstępnego uszlachetnienia powierzchni poprzez zadokowanie białek. Zgodnie z instrukcją, taka gęstość komórek powinna być wystarczająca aby pełna konfluencja zaszła w ciągu dwóch dni. Reakcje zachodzące na kontakcie komórka- materiał obserwowano codziennie przez okres 7 dni. Wyniki przedstawiono na rys. 70. W celu wizualizacji komórek zastosowano niskotoksyczny preparat fluorescencyjny (MitoTracker). MitoTracker, pasywnie dyfunduje przez błonę komórkową i akumuluje się w zaktywowanych mitochondriach. Sama idea łączenia się substruktur komórkowych z odczynnikiem fluorescencyjnym eliminuje pomyłkę włączenia do analiz komórki patogeniczne.



Obserwacja 3

Rys. 70. Oddziaływanie komórka- materiał porowaty- obrazy fluorescencyjne

Badania prowadzono przy zastosowaniu szerokopolowego mikroskopu fluorescencyjnego. Technika ta niestety ogranicza pole działania obserwatora. Szerokopolowy mikroskop fluorescencyjny nie eliminuje promieniowania spoza płaszczyzn obserwacji. To co obserwujemy obarczone jest dodatkowym błędem związanym z występowaniem tzw. dysków Airy. W tym przypadku najwłaściwszym wydaje się zastosowanie wysoko wyspecjalizowanej aparatury takiej jak skaningowy mikroskop konfokalny oparty o promieniowanie laserowe.



Nie można było jasno określić czy to, co widzimy to komórki. Było to spowodowane migracją komórek w pory. Nie da się usunąć komórek z porowatego rusztowania w celu ich dalszej analizy. Dlatego, tą samą procedurę barwienia komórek przeprowadzono dla HUVEC nałożonych na szkło. Zaobserwowaliśmy ten sam efekt grupowania komórek tworzących konfluencję (Rys. 71).



Rys. 71. Wzorzec formowania konfluencji komórkowej

Nie ma idealnego materiału dającego kontrolę nad osadzaniem, wzrostem i proliferacją komórek. Dalsze prace związane z modyfikacją powierzchni materiału związane były z zastosowaniem cienkich powłok. Optymalizację powierzchni przeprowadzono wykorzystując metody fizyczne osadzania powłok. Badanie fluorescencyjne migracji i proliferacji komórek pokazano na rys. 72. Innym aspektem dostosowania interakcji komórka-materiał jest adsorpcja białka (Rys. 73).



Obserwacja 1 (początkowa, po naniesieniu)



Obserwacja 2 (końcowa)

Rys. 72. Proliferacja komórkowa na powierzchni materiału warstwowego

Analiza interakcji komórka- materiał wykazała najlepsze właściwości dla powłok Ti (C, N) i Si\_DLC (Rys. 72). Powłoki węgloazotku tytanu i powłoki węglowej modyfikowanej krzemem zostały naniesione na podłoża porowate. Naszym celem było odtworzenie struktury macierzy pozakomórkowej (ECM). W tym przypadku najważniejszą rolę odgrywa fibronektyna. Analiza adsorpcji tego białka została przedstawiona na rys. 73.



Rys. 73. Analiza adsorpcji białka- fibronektyny do powierzchni materiałów porowatych

Drugim białkiem biorącym udział w strukturze blaszki podstawnej naczynia jest kolagen (Rys. 74).





Stwierdzono wyższą adsorpcji kolagenu w porównaniu z fibronektyny. Struktura materiałów porowatych różni się w zależności od powierzchni. To, co zostało podjęte w ramach endotetializacji, po tzw. stronie "luminal ", czyli górna powierzchnia, posiada mniejsze pory. Jest to powierzchnia mająca kontakt z otaczającą atmosferą, nie z matrycą. Druga strona miała bezpośredni kontakt z kolektorem podczas procesu elektroprzędzenia. Powierzchnia ta charakteryzuje się większymi porami. To tłumaczy, dlaczego zaobserwowaliśmy wyższy adsorpcji kolagenu. Przy zastosowaniu powłok z węgloazotku tytanu powierzchnia włókien polimerowych zmienia swoje właściwości biofizyczne. W tym przypadku zaobserwowaliśmy najsilniejsze oddziaływanie na adsorbcję białka.

Dla kolagenu, białko to adsorbowało stosunkowo jednolicie. Jedynie stwierdzono nieznaczny wzrost ilości zaadsorbowanego białka dla powłoki Si DLC naniesionej na włóknach.

Kolejne zadanie polegało na próbie nałożenia komórek na materiały porowate. Powierzchnie włókien polimerowych modyfikowano przy zastosowaniu metod fizycznych ww. powłokami (Ti(C,N) i Si(DLC)). Początkowo nie stosowano wspomaganie białkiem. Wyniki bezpośredniego oddziaływania materiałów porowatych na komórki śródbłonka przedstawiono na rys. 75.

65



Rys.75 a.) Reakcja komórek śródbłonka na powierzchnię materiału powłoki Ti(C,N) i Si DLC osadzone na podłoże poliuretanu



Rys.75 b.) Reakcja komórek śródbłonka na powierzchnię materiału porowatego z powłoką Si DLC



Rys.75 c.) Reakcja komórek śródbłonka na powierzchnię materiału porowatego z powłoką Ti(C,N)

Rys. 75. Oddziaływanie komórka- materiał. Brak wprowadzonej fibronektyny

Stwierdzono interakcję komórek z materiałem porowatym. Komórki weszły w pory. Podczas analizy nie prowadzono eksperymentów polegających na ich ponownym odzyskaniu i analizie. Prowadzono barwienia przeżyciowe barwnikiem łączącym aktywne mitochondria komórkowe- MitoTrucker. Następnie analizowano przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego. Dodatkowe, eksperymenty uzupełniające polegające na analizie zmiany potencjału w czasie wykazały spadek oporności w czasie. Analizy zmiany impedancji w zależności od narastania komórkowego prowadzone były przez innych autorów [Moore E. 2009]. Obserwowali oni w pierwszej fazie eksperymentów obniżenie impedancji spowodowanej wzrostem komórkowym. Po kilku dniach obserwacji stwierdzili wzrost impedancii spowodowanej najprawdopodobniej śmiercią komórek. W naszych próbach obserwowaliśmy jedynie nieznaczny spadek impedancji, podczas, gdy analizy

fluorescencyjne potwierdzały obecność żywych komórek. Wstępna interpretacja wskazuje na silną dyfuzję płynów przez pory, szybszą niż formowanie "*monolayeru*" komórkowego. Wskazuje to na odpowiednie właściwości strukturalne pod budowę rusztowania komórkowego, które umożliwia odpowiednie dostarczanie mediów hodowlanych do komórek. Jest to na razie wstępna obserwacja i struktura materiału porowatego również nie jest ostateczna, jaką chcielibyśmy ostatecznie mieć na implancie naczyniowym. Z dalszych obserwacji fluorescencyjnych wynika, że niestety swobodna migracja komórkowa wewnątrz materiału jest utrudniona. Jest to najprawdopodobniej spowodowane strukturą zamkniętych porów, lub połączeń zbyt małych.

Na podstawie uzyskanych wyników, dalsze analizy prowadzone były w oparciu o zadokowane białka do struktury macierzy porowatej. Przed osadzeniem komórek, do por wprowadzano fibronektynę (FN) o koncentracji 50 µg /mL, główne białko w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej. Po godzinie inkubacji, ciecz była usuwana I wprowadzane komórki. Wyniki analizy fluorescencyjne przy wykorzystaniu barwnika MitoTrucker przedstawiono na rys. 76.



Rys.76 a.) Reakcja komórek śródbłonka na powierzchnię materiału porowatego z powłoką Si DLC i zadokowanym białkiem fibronektyną



Rys.76 b.) Reakcja komórek śródbłonka na powierzchnię materiału porowatego z powłoką Ti(C,N) i zadokowanym białkiem fibronektyną

#### Rys. 76. Oddziaływanie komórka- materiał. Wprowadzona fibronektyna

Zaobserwowaliśmy znacznie lepsze narastanie komórkowe w porównaniu do matryc bez białka. Jest zrozumiałe, że komórki wmigrowały do por, ale wiele komórek pozostało na powierzchni, kotwiczone przez białka. Uważa się, że receptory na powierzchni komórek FN i ich zamocowania do cytoszkieletu przedłużone na cząsteczki FN, uwidoczniły części wiążące. Efekt ten widoczny jest szczególnie mocno dla mat porowatych, gdzie włókna modyfikowano węgloazotkiem tytanu.

Trzecim rozwiązaniem zaproponowanym i rozwijanym w ramach tego pakietu jest tematyka wywodząca się z prac rozpoczętych w ramach programu Polskie Sztuczne Serce. Są to analogi tkankowe wytworzone na powierzchniach materiałów litych, czyli elementach wspomagania serca. Badania dawały obiecujące rezultaty. Z założenia projekt "CardioBioMat" stanowi projekt satelitarny do programu "Polskie

Sztuczne Serce" (PSS), czyli realizuje zagadnienia materiałowe nie rozwijane w PSS, ale jest jego uzupełnieniem. W tej części rozwijano powłoki porowate na podłożach polimerowych będących podstawą projektu CardioBioMat.

Kwas hyaluronowy jest biopolimerem. W przeciwieństwie do innych proteoglikanów, nie tworzy kowalencyjnego wiązania z białkami, dlatego też nie może tworzyć części typowego proteoglikanu. Może jednak być w centrum, tworzącym formy proteoglikanu tzw. "agregat proteoglikanu". W pracach "Layer-bylayer deposition of hyaluronic acid and poly-I-lysine for patterned cell co-cultures" autorstwa Ali Khademhosseini et al. [Khademhosseini A. 2004] oraz Zhiyong Tang et. al. [Wang Z. T., Y. 2006] opisano metode tworzenia wzorów, wykorzystując oporność komórkową kwasu hyaluronowego (HA). Opisano możliwość dołączenia innego polielektrolitu, silnie wpływającego na adhezję komórkową- Poli-L-lisyny i zadokowania białek. Ich doświadczenia wykazały, że adhezja takich białek jak albumina surowicza (BSA), IgG, i fibronektyna (FN) była ograniczona na powłokach kwasu hialuronowego (HA) w porównaniu do podłoża kontrolnego- szalka hodowlana. Inni autorzy wykazali że chemiczne adsorbcja fibronektyny (FN) ma miejsce jedynie na powierzchni układu powłok (PLL/HA)+PLL [Semenov O. V. 2009] Udowodnili, że FN tworzy kompleksy z PLL z niewielką lub żadną penetracją do materiału. Wiązanie kowalencyjne FN do powłoki PLL/HA wpływa na odpowiednie narastanie komórek. Innym materiałem hamującym adsorbcję białek i selektywne poly(L-lysine)-[g]-poly(ethylene kotwiczenie komórkowe to alvcol). Autorzy potwierdzili tzw. niespecyficzne adsorbję białek jak również wysoką biozgodność i niską toksyczność [Wong I.2009]. Do badań przygotowano materiały warstwowe metoda "Layer by Layer". 12 bi-powłoki wykonano wg planu przedstawionego w tablicy 6:

Tablica 6. Plan eksperymentu

Cross link and PEG	Cross link and PEG 2	PEG 1 and cross	PEG 2 and cross link	No PEG and cross link
1	(PLL/HA)x12+cross	link	(PLL/HA)x12+PEG 2	(PLL/HA)x12+PLL+cros
(PLL/HA)x12+cross	link+PEG 2	(PLL/HA)x12+PE	+cross link	s link
link+PEG 1		G 1 +cross link		

Powierzchnie funkcjonalizowano wprowadzając białko (FN), zgodnie z protokołem zamieszczonym w literaturze [*Katalog Roche*] Powierzchni pokrywano białkiem przygotowanym odpowiedniej koncentracji 50µg/ml. Na powierzchnie ostatecznie nałożono (5 µg/cm<sup>2</sup>). Nałożone białka inkubowano przez 45 min w temperaturze +15 to +25°C. Wyniki adsorpcji (FN) przedstawiono na rys. 77.



Rys. 77. Adsorpcja białka fibronektyny po funkcjonalnych powierzchni powłok porowatych

Następnie nałożono komórki śródbłonka "Human Umbilical Vein Endothelial Cells" (HUVEC) i hodowano w odpowiednich warunkach. W celu fluorescencyjnego wyznakownia aktywnych mitochondriów, zastosowano barwnik MitoTracker, który pasywnie dyfunduje przez błonę komórkową i gromadzi się w mitochondriach. Barwnik ten eliminuje błędy związane z możliwością analizy komórek patogenicznych, ponieważ znakuje aktywne mitochondria. Wyniki przedstawiono na rys. 78.

## 



PEG1 cross

PEG2 cross

PLL cross

#### Rys. 78. (Human Umbilical Vein Endothelial Cells- HUVEC)- komórki śródbłonka na powierzchniach powłok porowatych

Analizując materiały dostępne w literaturze i porównując uzyskane wyniki, zachodzi pytanie, czy to co uzyskaliśmy, czy widoczna reakcja komórkowa jest poprawna. Na podstawie danych literaturowych stwierdziliśmy [Khademhosseini A. 2004], że powłoka osadzana metodą "Layer by layer" posiada charakter dyfuzyjny. Głębsze i bardziej szczegółowe informacje można znaleźć w publikacji C. Picart at al. [Picart C. 2002] oraz L. Richert et al. [Richert L. 2004]. Udowodnili proces dyfuzji PLL do i na zewnątrz powłoki porowatej. Grupa Richert et al. zastosowali metodę fotowyświecania "photobleaching- fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)" przy użyciu mikroskopu konfokalnego (CLSM) dla powłok stabilizowanych na przekroju i niestabilizowanych o układzie (PLL/HA) PLL-FITC (FITC- zielony barwnik). Dla powłok niestabilizowanych zaobserwowano częściowy powrót fluorescencji obszaru wyświeconego, podczas gdy dla powłok ustabilizowanych, powrotu fluorescencji nie zaobserwowano. Jest to dowód braku dyfuzji do powłoki porowatej po jej ustabilizowaniu. Podobne analizy zostały przedstawione przez grupę Pickart et al. i zaprezentowane w cytowanej publikacji [Picart C. 2002]. W tym

artykule, udowodnili istnienie procesu dyfuzji PLL do wnętrza powłoki przy użyciu znakowanego fluorescencyjnie PLL. Podkreślili, że eksponencjalny charakter wzrostu powłoki wynika z podobieństw procesu dyfuzji do i na zewnątrz.

W naszych eksperymentach warstwa po warstwie wzrost film został przeanalizowany za pomocą mikrowagi kwarcowej (ang. akronim QCM lub rzadziej QMB ozn. Quartz Crystal Microbalance). Jednym z naszych celów było zaadsorbowanie PLL-PEG. Analiza QCM polega na pomiarze zmian w częstotliwości rezonansowej rezonatora kwarcowego  $\Delta f$ . Spadek  $\Delta f$  wizualizuje związanie powłoki do powierzchni kwarcu. Wyniki QCM pokazano na rys. 79.



Rys. 79. Analiza za pomoca mikrowagi kwarcowej (Quartz crystal microbalance- QCM) a.) brak wprowadzenia HA na końcu procesu b.) próba wprowadzenia HA na końcu procesu

Stwierdziliśmy, że wprowadzenie PLL-PEG, w nieznacznym stopniu wpłynęło na zmianę częstotliwości (Rys. 79 a). Przypuszczalnie trudności z wprowadzeniem PLL-PEG do struktury porowatej związane jest z procesem dyfuzji leżącego pod nim układu PLL/HA. Zdecydowaliśmy się powtórzyć eksperyment i jako ostateczną powłokę nanieść kwas hialuronowy (Rys. 79 b). Jako powłokę przedostatnią
próbowano znów nałożyć PLL PEG. Nie zaobserwowano zmiany częstotliwości. Świadczy to o niewłaściwym łączeniu PLL-PEG do wcześniej przygotowanej struktury. Układ powłok wielowarstwowych PLL/ HA- usieciowane, a następnie nałożenie kolejnej PLL jako warstwa wierzchnia, miał doprowadzić do wykonania odpowiedniego rusztowania pod zasiedlanie komórkowe. Pozostaje pytanie, dlaczego nie zaobserwowaliśmy zmniejszenie ilości zaadsorbowanych białek, gdy po została przeprowadzona próba nałożenia usieciowaniu PLL-PEG, charakteryzującego się niespecyficzną adsorpcją białka. Wyniki przedstawione na rys. 78 dowodzą jedynie częściowo o poprawnym działaniu PLL-PEG. Widać, że w przypadku nałożenia PLL-PEG po usieciowaniu, zachodzi redukcja w ilości zadsorbowanych komórek. Do dalszych eksperymentów zdecydowaliśmy się zmienić koncepcie przygotowanie polielektrolitu przed nałożeniem. W procesach chemicznych nawet, wydawałoby sie, trywialny element w protokole, może stanowić o końcowym rezultacie. Zgodnie z sugestią autorów [Germanier Y. 2006] PLL-g-PEG polimery powinny zostać rozpuszczone do stężenia 1 mg / ml w 10 mM PBS, pH 7.4. Przed użyciem, roztwory polimerów należy rozmrozić przez trzy minuty 37°C wodnej i ustabilizować w temperaturze w łaźni W warunkach eksperymentalnych (22°C) przez dwie minuty.

Inną problematyką rozwijaną w ramach realizacji zadania była funkcjonalizacja powierzchni za pomocą powłok porowatych i "monolayeru" komórek śródbłonka. Taki układ zaproponowano jako imitujący strukturę naczynia krwionośnego i zapobiegający procesom wykrzepiania. Jednak rozwiązanie takie ma sens i szanse powodzenia w przypadku zaistnienia pełnej, poprawnej konfluencji. Zostało to zobrazowane za pomocą konfokalnego mikroskopu laserowego Carl Zeiss LSM Exciter 5 (Rys. 80).

73



Rys. 80. "Monolayer" komórek śródbłonka naniesiony na powłoki porowate Dodatkowo zostały zaobserwowane połączenia międzykomórkowe, co może świadczyć o formowaniu tkanki (Rys. 81, 82).



Rys. 81. "Monolayer" komórek śródbłonka naniesiony na powłoki porowate



Rys. 82. "Monolayer" komórek śródbłonka naniesiony na powłoki porowate z widocznymi połączeniami międzykomórkowymi



### Aplikacja

<u>Bioprotezy zastawek</u> poliuretanowych pokrywanych warstwą polielektrolitów przed nahodowaniem na nie komórek płukano dokładnie w PBS ( Phosphate Buffer Saline). Następnie metodą sedymentacji nanoszono komórki. Zastawki z nahodowanymi komórkami umieszczano w naczyniu hodowlanym i umieszczano w inkubatorze z 5% przepływem, CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C. Po 24h hodowli oceniano efektywność zasiedlania komórkowego, morfologię komórek przyszyciu techniki mikroskopii fluorescencyjnej oraz kontrastu fazowego. Zastosowano barwienie przy użyciu DAPI dla identyfikacji jąder komórkowych oraz barwienia przy użyciu falloidyny w celu oceny elementów cytoszkieletu. Badanie wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axio Observer (Zeiss), do analizy danych wykorzystano program Axio Vision 4.6 ( Zeiss) (Rys. 83, 84).







Rys. 83. Fragment bioprotezy zastawki poliuretanowej modyfikowanej przy użyciu polielektrolitów, z nahodowanymi komórkami. Komórki barwiono przy użyciu barwnika DAPI (A), który barwi jądra komórkowe i wykazuje niebieską fluorescencję, morfologię komórek obserwowano przy użyciu kontrastu fazowego (B,C)





Rys. 84. Fragment bioprotezy zastawki poliuretanowej modyfikowanej przy użyciu polielektrolitów, z nahodowanymi komórkami. Komórki barwiono przy użyciu barwnika DAPI, który barwi jądra komórkowe i wykazuje niebieską fluorescencję, dodatkowo barwiono cytoszkielet komórkowy przy zastosowaniu falloidyny (fluorescencja zielona)

Modyfikacja powierzchni poliuretanowych bioprotez zastawkowych przy użyciu polielektrolitów wydaje się promować adhezję komórek do modyfikowanych powierzchni, już po upływie 24h komórki tworzą jednolitą monowarstwę. Zadherowane komórki wykazują prawidłową morfologię, oraz budowę cytoszkieletu.

#### Zadanie 3- Zagadnienia powikłania- badania bakteriologiczne

Pierwszym etapem analizy powikłania wprowadzanego materiału jest zawsze analiza adsorpcji białka (Rys. 85). W realizacji tego zadania zastosowano surowicę krwi zawierającą koktaji białkowy. Analiza ta pozwoliła na otrzymanie ogólnej informacji interakcji materiału z środowiskiem tkanek.



Rys. 85. (Bovine serum albumin-BSA)- analiza adsorbcji białka do materiałów porowatych i powłokowych

Białko surowicy zostało zoptymalizowane z albuminą surowicy bydlęcej. Nie było zaskoczeniem, że największą ilość białka zaadsorbowała na materiałach porowatych. W tym przypadku mamy do czynienia z otwarciem powierzchni poprzez włókna. Jednym z najciekawszych wniosków wypływających z opisanego eksperymentu jest to, że prawdopodobnie jesteśmy w stanie mieć dodatkowy wpływ na adsorpcję białka do porowatych materiałów przez zastosowanie cienkich warstw na włóknach materiałów porowatych.

#### Literatura pomocnicza

- [*Germanier Y. 2006*] Yves Germanier, Samuele Tosatti, Nina Broggini, Marcus Textor, Daniel Buser Enhanced Bone Apposition Around Biofunctionalized Sand-blasted and Acid-etched Titanium Implant Surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs; Clinical Oral Implants Research Volume 17, Issue 3, pages 251–257, June 2006
- [*Hynes R. O. 1999*] Richard O.Hynes; The dynamic dialogue between cells and matrices: Implications of fibronectin's elasticity; Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 2588–2590,March (1999)
- [*Khademhosseini A. 2004*] Ali Khademhosseini , Kahp Y. Suh, Jen M. Yang, George Eng, Judy Yeh, Shulamit Levenberg , Robert Langer ; Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-l-lysine for patterned cell co-cultures; Biomaterials 25 (2004) 3583–3592



- [Leung B. M. 2007] B. M. Leung and M. V. Sefton; A Modular Tissue Engineering Construct Containing Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells; Annals of Biomedical Engineering, Vol. 35, No. 12, December (2007) pp. 2039–2049
- [*Marczak J. 2006*] T. Burakowski, J. Marczak, W. Napadłek; Istota ablacyjnego czyszczenia laserowego materiałów PRACE INSTYTUTU ELEKTROTECHNIKI, zeszyt 228, 2006
- [*Moore E. 2009*] Eric Moore, Orla Rawley, Terri Wood, Paul Galvin; Monitoring of cell growth in vitro using biochips packaged with indium tin oxide sensors Sensors and Actuators B: Chemical Volume 139, Issue 1, 20 May (2009), Pages 187-193
- [Picart C. 2002] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.C. Voegel, and P. Lavalle Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers; PNAS October 1, (2002) vol. 99 no. 20 p 12531–12535
- [Richert L. 2004] Ludovic Richert, Fouzia Boulmedais, Philippe Lavalle, Jerome Mutterer, Emmanuelle Ferreux, Gero Decher, Pierre Schaaf, Jean-Claude Voegel and Catherine Picart; Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking; Biomacromolecules (2004), 5,284-294
- [Roche] Fibronectin (pure) Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim Germany
- [Semenov O. V. 2009] Oleg V. Semenov, Antoine Malek, Anne Greet Bittermann, Janos Voros and Andreas H. Zisch, Engineered Polyelectrolyte Multilayer Substrates for Adhesion, Proliferation, and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells TISSUE ENGINEERING: Part A Volume 15, Number 10, (2009)
- [*Wang Z. T.,Y. 2006*] Zhiyong Tang,Ying Wang,Paul Podsiadlo and Nicholas A. Kotov; Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering; Adv. Mater.(2006), 18, 3203–3224
- [*Wong I.2009*] leong Wong, Chih-Ming Ho Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices Microfluid Nanofluid (2009) Review DOI 10.1007/s10404-009-0443-4



### Pakiet 4 – Sztuczny pacjent

**Cel:** Testowanie elementów protez naczyniowych poprzez interdyscyplinarne badania biofizyczne w warunkach symulujących zastosowanie kliniczne

### Zadanie 1- Konstrukcja układu do symulacji oddziaływania sztuczny materiał krew – sztuczny pacjent

Zadanie to ma na celu wykonanie serii urządzeń przeznaczonych do analizy stopnia wykrzepiania. W ramach realizacji tych prac zostały wykonane:

- komora promieniowego przepływu w ramach realizacji projektu CardioBioMat została zmodyfikowana i rozbudowana (Rys. 86)

- symulacja przepływu aortalnego do analizy stopnia wykrzepiania materiałów
w kształcie rurowym- na podstawie założeń testu Impact-R [*Dardik R. 2002; Germanier Y. 2006; Shenkman B. 2003; Wang X. 2002*], wykonano oryginalne
stanowisko do analizy jakości krwinek i aktywacji układu krzepnięcia (Rys. 87).

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej i Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii utworzyły wspólne laboratorium do realizacji części prac.



Rys. 86. Komora promieniowego przepływu



Rys. 87 a.) Ogólny widok testu do symulacji przepływu aortalnego



Rys. 87 b.) Silnik wolnoobrotowy, zapewniający pełne omywanie badanego elementu rury



Rys. 87 c.) Elementy układu: holder, wirnik- umożliwia analizę wykrzepiania w warunkach fizjologicznych, stempel- sterowanie objetością



Rys. 87 d.) Holder



Rys. 87 g.) Stempel



Rys. 87 e.) Wirnik



Rys. 87 h.) Stempel



Rys. 87 f.) Wirnik



Rys. 87 i.) Elementy układu podczas pracy

Rys. 87. Test symulacji przepływu aortalnego dla materiałów w kształcie rurowym- analiza procesu wykrzepiania na ścianach elementów rurowych w warunkach fizjologicznych

### Duże modele konstrukcji układu "Sztuczny Pacjent"

Pracownia Sztucznego Serca Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii wykonała prace związane z realizacją zadania Sztuczny Pacjent, w zakresie konstrukcji układu do symulacji oddziaływania sztuczny materiał – krew w tzw. dużym modelu analitycznym. Opracowano projekt układu, umożliwiającego testowanie elementów protez naczyniowych poprzez interdyscyplinarne badania biofizyczne w warunkach symulujących zastosowanie kliniczne. Planowany zakres badań obejmuje analizę wytrzymałości mechanicznej powłoki naniesionej na powierzchnię wewnętrzną protezy naczyniowej w warunkach dynamicznego przepływu oraz analizę oddziaływania krew-biomateriał w warunkach dynamicznego przepływu krwi.

### Analiza wytrzymałości mechanicznej powłoki naniesionej na powierzchnie wewnętrzną protez naczyniowych w warunkach dynamicznego przepływu

Opracowano protokół badań z wykorzystaniem opracowanego stanowiska pomiarowego, symulującego warunki hydrodynamiczne panujące w układzie krwionośnym człowieka. Symulacje uwzględniają dwa warianty przepływu medium przez układ:

- przepływ pulsacyjny (pompa pulsacyjna),
- przepływ ciągły (pompa Medtronic).

Do wykonania badania proponuje się trzy warianty medium operacyjnego:

- płyn polimerowy o reologii zbliżonej do krwi,
- 33% roztwór gliceryny o lepkości zbliżonej do krwi,
- SBF (Simulated Body Fluid) płyn o składzie jonowym osocza krwi.

Ciecz w układzie krążyć będzie z przepływem 5l/min, ciśnieniem 100mmHg oraz w temperaturze 37°C. Czas trwania doświadczenia będzie wynosił 24h.

Układ o ciągłym/pulsacyjnym przepływie medium jest złożony z następujących elementów:

- pompy wirowej /pompy pulsacyjnej
- jednostki sterującej pracą pompy
- badanej protezy naczyniowej (kaniul)
- rezerwuaru medium badawczego



- łączników
- łaźni wodnej
- sondy przepływomierza
- sondy ciśnienia
- oporu ciśnienia na drenie klem

### Analiza oddziaływania krew-biomateriał w warunkach dynamicznego przepływu krwi.

Dla potrzeb realizacji badania oddziaływania powierzchni biomateriału z krwią opracowano układ o przepływie ciągłym/pulsacyjnym medium, który jest złożony z następujących elementów:

- pompy wirowej /pompy pulsacyjnej
- jednostki sterującej pracą pompy
- badanej protezy naczyniowej (kaniul)
- rezerwuaru medium badawczego
- łączników
- łaźni wodnej
- sondy przepływomierza
- sondy ciśnienia
- oporu ciśnienia na drenie klem

Jako medium proponuje się krew wieprzową, antykoagulowaną heparyną. Krew w układzie krążyć będzie z przepływem 5 L/min, pod ciśnieniem 100mmHg i w temperaturze 37°C. Czas trwania eksperymentu wynosi 5-6 godzin. W czasie doświadczenia zostaną pozyskane próbki krwi w celu oznaczeń:

- ACT zmiany krzepliwości krwi w czasie eksperymentu,
- morfologii zmiany liczby elementów morfotycznych w czasie doświadczenia,
- stężenia wolnej hemoglobiny w osoczu poziom hemolizy erytrocytów w wyniku oddziaływań mechanicznych i chemicznych,

- aktywacji płytek krwi cytometria przepływowa CD 62P –PE, agregometr impedancyjny – ADP TEST, ASPI TEST,
- aktywacji elementów układu leukocytarnego cytometria przepływowa CD45 – FITC .

W celu wykluczenia wpływu stosowanej pompy na krew, w eksperymencie zaplanowano wykonanie badań referencyjnych w układzie sztucznego krążenia z drenami (kaniulami) referencyjnymi. Po zakończonym badaniu powierzchnie drenów kontaktujących się z krwią zostaną utrwalone w celu przekazania do badań szczegółowych.

Schematy ideowe układów sztucznego krążenia o przepływie ciągłym i pulsacyjnym przedstawiono na rys. 88 i 89.

W ramach realizacji zadania pn. "Konstrukcja układu do stymulacji oddziaływania sztuczny materiał krew – sztuczny pacjent" zaprojektowano układy stanowisk laboratoryjnych dla przeprowadzenia badań wytrzymałości mechanicznej powłok naniesionych na powierzchnie wewnętrzne kaniul oraz ich oceny biologicznej kontaktu z krwią w warunkach przepływu dynamicznego. Zaproponowano sposób przeprowadzenia badań oraz dokonano zakupów obejmujących elementy stanowisk badawczych (bio-pompy, dreny, worki perfuzyjne, łączniki, czujniki ciśnienia, składniki mediów roboczych).





Rys.88. Schemat układu badawczego z pulsacyjnym przepływem medium



Rys.89. Schemat układu badawczego z ciągłym przepływem medium

#### Zadanie 2- Selekcja materiału na bazie scenerii oddziaływania krew-biomateriał

Aktualnie prowadzone są wstępne analizy przygotowawcze do realizacji tego zadania. Na podstawie testów przeprowadzonych przy użyciu własnych i komercyjnych stanowisk badawczych wytypowano powłoki węglowe nakładane metodą wyładowania jarzeniowego. Z powłok polimerowych wytypowano powłoki z polielektrolitów. Dotychczasowe analizy wyeliminowały powłoki parylenowe.

#### Literatura pomocnicza

- [*Dardik R. 2002*] Rima Dardik, Naphtali Savion, Nurit Gal, David Varon; Flow Conditions Modulate Homocysteine Induced Changes in the Expression of Endothelial Cell Genes Associated with Cell-Cell Interaction and Cytoskeletal Rearrangement; Thromb Haemost 2002; 88: 1047– 53
- [*Germanier Y. 2006*] Yves Germanier, Samuele Tosatti, Nina Broggini, Marcus Textor, Daniel Buser Enhanced Bone Apposition Around Biofunctionalized Sand-blasted and Acid-etched Titanium Implant Surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs; Clinical Oral Implants Research Volume 17, Issue 3, pages 251–257, June 2006
- [Shenkman B. 2003] Boris Shenkman, Aida Inbal, Illa Tamarin, Aharon Lubetsky, Naphtali Savion2 and David Varon; Diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura based on modulation by patient plasma of normal platelet adhesion under flow condition British Journal of Haematology, 2003, 120, 597–604
- [Wang X. 2002], Robert T. Dorsam, Adam Lauver, Hugh Wang, Frank A. Barbera, Sandra Gibbs, David Varon, Naphtali Savion, Steven M. Friedman, and Giora Z. Feuerstein; Comparative Analysis of Various Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists on Shear-Induced Platelet Activation and Adhesion; THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS Vol. 303, No. 3 Copyright © 2002 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 38513/1026547 JPET 303:1114–1120, 2002

### Pakiet 5 – Zarządzanie projektem

**Cel:** Zarządzanie finansami projektu oraz administracja, sprawozdawczość, organizacja corocznych naukowych spotkań, promocja wyników

W ramach realizacji tego pakietu prowadzone jest zarządzanie projektem i kontakt z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju. Przygotowywane są zmiany i aneksy konieczne do efektywnej realizacji projektu.

Organizowane są spotkania mające na celu weryfikację poszczególnych zadań wykonywanych przez uczestników projektu. Dotychczas odbyły się 3 spotkania:

- 18.01.2010 roku w Krakowie,
- 18 19.06.2010 w Krakowie,
- 15.10.2010 w Krakowie,
- 15.12.2010 w Krakowie,
- 16.12.2010 w Zabrzu (po zakończeniu konferencji organizowanej przez Fundacją Rozwoju Kardiochirurgii).

Z każdego spotkania został sporządzony protokół - Załącznik I.

Została stworzona strona internetowa www.CardioBioMat.imim.pl, na której znajdują się m.in. informacje o programie MNT Era-Net, opis projektu CardioBioMat oraz jednostek będących jego wykonawcami. Strona projektu jest prowadzona w dwóch językach - polskim i angielskim. Za pomocą e-Biuletynu prezentowane są najważniejsze rezultaty prac wykonywanych w ramach projektu. Niedawno w ramach działalności "Transfer Knowledge" uruchomiono of również platforme e-Learningową. Na platformie tej zamieszczone są wykłady w zakresie inżynierii materiałowej, biologii i medycyny przygotowane przez specjalistów z każdej z trzech wymienionych dziedzin. W najbliższej przyszłości wprowadzona zostanie również możliwość kontaktu z każdym z wykładowców oraz weryfikacji wiedzy w postaci modułu tzw. uczącego testu. W celu sprawnej realizacji projektu planuje się także stworzenie platformy dyskusyjnej z możliwością telekonferencji.

16.12.2010 została zorganizowana przez Fundację Rozwoju Kardiochirurgii **konferencja** dotycząca tematyki realizowanej w ramach projektu CardioBioMat - "Nanostructural materials for implants and cardiovascular biomedical devices".



W konferencji wzięli udział specjaliści z kraju i zza granicy. Referaty prezentowane przez uczestników konferencji zostały zawarte w Biuletynie projektu (**Załącznik II**) oraz w e-Biuletynie znajdującym się na stronie internetowej projektu. Dodatkowo, udział w konferencji brała lokalna telewizja Zabrze. Przeprowadzone przez nią wywiady z koordynatorem projektu oraz z głównym organizatorem zostały umieszczone na stronie internetowej projektu.

Problematyka projektu jest tematem przewodnim **doktoratu** mgr Katarzyny Maksymow, będącej studentką Środowiskowego Studium Doktoranckiego Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie i Uniwersytetu Jagiellońskiego (Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej oraz Wydziału Chemii) z zakresu Inżynierii Materiałowej.



Wykaz aparatury naukowo – badawczej zakupionej w wyniku realizacji projektu.

### 1. Zakupy dokonane przez Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN (IMIM PAN)

Inkubator (Rys. 90) i system rejestracji i przetwarzania obrazów fluorescencyjnych (Rys. 91) stanowią doposażenie toru pomiarowego do fluorescencyjnej analizy adhezji komórek. Elementy toru pomiarowego stanowią integralną część z obecnie posiadaną aparaturą IMIM PAN.

Inkubator jest przeznaczony do prowadzenia badań materiałów w atmosferze gazu CO<sub>2</sub>. Zastosowana w nim technologia opatentowanego płaszcza grzejnego z wymuszonym obiegiem powietrza (komora robocza bez wentylatora) pozwala na osiąganie stabilnych i powtarzalnych warunków wzrostu tkanek. Urządzenie posiada wszelkie zabezpieczenia przed kontaminacją. Inkubator jest wyposażony w 3 kanałowy mikroprocesorowy kontroler temperatury oraz stężenia CO<sub>2</sub> z wyświetlaczem LCD, z elektroniczną autodiagnozą, detektorem stężenia CO<sub>2</sub> na podczerwień oraz głowicę mieszającą tworzącą jednorodną atmosferę gazową wewnątrz komory. Zaletą systemu jest także program autosterylizacji w 185°C. Opatentowany system PERMADRY gwarantuje osiągnięcie wilgotności do 98% i zapobiega kondensacji pary wodnej (suche ściany wewnątrz inkubatora), termostat z kolei zabezpiecza przed przegrzaniem.





Rys. 90. Inkubator do hodowli komórkowej pracujący w IMIM-PAN zakupiony ze środków projektu "CardioBioMat"



Rys. 91. Inkubator do hodowli komórkowej pracujący w IMIM PAN zakupiony ze środków projektu "CardioBioMat"

Dla instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej zakupiono także system rejestracji i przetwarzania obrazów fluorescencyjnych do mikroskopu konfokalnego, pozwalający na jego rozbudowę o komorę inkubacyjną (projekt własny) (Rys. 92).





Rys. 92. Konfokalny Mikroskop Laserowy Carl Zeiss LSM 5 Exciter, pracujący w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej doposażony o stację dokującą i komorę inkubacyjną

### 2. Zakupy dokonane przez Fundację Rozwoju Kardiochirurgii (FRK)

Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii dokonała zakupu oprogramowania do automatycznej analizy obrazu AxioVision seria 4.8 z opcjami:

- AxioVision 4 z modułem AutoMeasure
- AxioVision 4 z modułem AutoMeasure Plus



W ramach realizacji projektu konieczne było przeprowadzenie testów analizy przyczepności komórek do podłoża i prób modyfikacji powierzchni w celu immobilizacji komórek śródbłonka. W związku z tym IMIM PAN musiał skorzystać z konsultacji merytorycznej Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique Institute National Polytechnique de Grenoble MINATEC. W tym celu złożono wniosek o przyznanie projektu wymiany PAN- CNRS z Francją - Polonium. Wniosek ten został zaakceptowany i jest z powodzeniem realizowany. Raport z realizacji projektu Polonium zawiera **Załącznik III**.