KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 66 **2017**
Numer 4 **(317)**
Strony **677–689**

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA[1], ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA[2]

[1]*Katedra Fizjoterapii*
Akademia Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha
Al. Jana Pawła II 78, 31-571 Kraków
[2]*Zakład Immunologii Ewolucyjnej*
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
E-mail: scis@poczta.onet.pl

JAK CHRONIĆ BIOMATERIAŁY PRZED UKŁADEM ODPORNOŚCIOWYM?

WSTĘP

W okresie ostatnich trzech stuleci kilkukrotnie wzrosła spodziewana długość życia osób mieszkających w krajach wysoko rozwiniętych (SIKORA 2014). Zjawisko to z kolei spowodowało, że na szeroką skalę zaczęły rozwijać się choroby cywilizacyjne oraz choroby i urazy związane z postępującym wiekiem. Należą do nich choroby wywołane pogarszającym się stanem tkanek, np. tkanki kostnej (osteoporoza, zwyrodnienia tkanki kostnej), zwyrodnienia tkanki chrzęstnej, zmiany zwyrodnieniowe w naczyniach krwionośnych (miażdżyca), zmiany w oku (zaćma). Osoby dotknięte tymi schorzeniami, z powodu chorobowych zmian i ubytków tkanek, często nie są w stanie samodzielnie funkcjonować, co zdecydowanie obniża komfort ich życia. Z tego też powodu istnieje coraz większe zapotrzebowanie na materiały implantacyjne, które mogłyby zastąpić, przywrócić lub podtrzymać funkcje chorych/uszkodzonych tkanek, a także wspomagać procesy naprawy i gojenia tkanek (LANGER i VACANTI 1993, SIPE 2002).

Jednym z elementów, który szczególnie często ulega uszkodzeniu w organizmie, i to zarówno u osób starszych, jak i młodszych, jest kręgosłup. Jego sprawność decyduje o prawidłowym funkcjonowaniu człowieka. Obecnie istnieje wiele biomateriałów, które stosuje się jako stabilizatory/implanty w leczeniu schorzeń kręgosłupa; przykładowo są to protezy trzonów kręgosłupa, sztuczne dyski czy też śruby łączące elementy kręgów (SCHATZKER 1996). Z kolei w przypadku chirurgii urazowej i plastycznej stosuje się protezy, które pełnią rolę substytutów całych stawów (np. stawu kolanowego, stawów ręki). Czasami wszczepia się tylko niektóre elementy połączeń ruchomych, zastępując jedynie ich zniszczone fragmenty, takie jak panewka stawu biodrowego ulegająca zniszczeniu na skutek tarcia (SCHATZKER 1996). W chirurgii urazowej często wykorzystuje się również sztuczne ścięgna i więzadła, a także biomateriały w postaci płytek, śrub, drutów czy też gwoździ, które sprzyjają osteosyntezie, czyli zespalaniu uszkodzonych elementów kostnych (SCHATZKER 1996). Z kolei cementy kostne pozwalają na dowolne formowanie oraz dostosowywanie uzupełnienia cementowego do kształtu i wielkości ubytków kostnych, a także służą do mocowania protez bądź ich elementów. Biomateriały wykorzystuje się również w chirurgii twarzowo-szczękowej (np. protezy kości czaszki), laryngologii (np. sztuczne tchawice) i urologii (np. cewniki). Stosowanie biomateriałów w stomatologii do uzupełniania ubytków zębowych oraz w postaci implantów, mostków i koron stwarza duże możliwości odbudowy uszkodzonych części zębów i układu kostnego (WALSH i współaut. 2004). Biomateriały wykorzystywane są również w kardiochirurgii i chirurgii naczyń krwionośnych do tworzenia sztucznych protez naczyniowych

*****Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu 2014/15/B/NZ6/02519 (Opus 8).

Słowa kluczowe: biokompatybilność, biomateriały, leukocyty, reakcja zapalna, ubytki kostne, zapalenie

(stentów), zastawek serca oraz w okulistyce, do tworzenia implantów wewnątrzgałkowych, np. soczewek. Wszystkie przetoczone powyżej przykłady wskazują na konieczność tworzenia coraz to nowych i udoskonalonych biomateriałów, które po pierwsze będą spełniać swoje funkcje w organizmie człowieka, a po drugie, nie będą odrzucane/atakowane przez układ odpornościowy. Właściwe uniknięcie aktywacji układu odpornościowego w przypadku inżynierii tkankowej i implantacyjnej jest dużym wyzwaniem.

DLACZEGO UKŁAD ODPORNOŚCIOWY MIAŁBY NISZCZYĆ BIOMATERIAŁ?

Komórki układu odpornościowego zaangażowane w odpowiedź wrodzoną (fagocyty) posiadają zdolność rozpoznawania struktur obcych poprzez selektywne receptory (LEIFER i MEDVEDEV 2016). Wyznacznikiem „obcości" jakiegoś elementu, w tym biomateriału, jest obecność na jego powierzchni struktur niewystępujących w naszym organizmie (PTAK i współaut. 2003). Szczegółowo zjawisko to zostało opisane w pracy CICHOŃ i KOŁACZKOWSKIEJ zamieszczonej w tym zeszycie KOSMOSU. Reakcją na takie rozpoznanie jest stan zapalny, podstawowa reakcja odpowiedzi wrodzonej (KOŁACZKOWSKA 2007) (Ryc. 1). Kluczowe dla jej zapoczątkowania są osiadłe leukocyty tkankowe, takie jak mastocyty i makrofagi tkankowe, które znajdują się w tkankach narażonych na bezpośredni kontakt z patogenem/ciałem obcym, takich jak np. skóra. Komórki te wydzielają substancje (cytokiny i chemokiny), które umożliwiają następnie napływ leukocytów zapalnych do tkanki objętej zapaleniem. Pierwsze do ogniska zapalnego docierają neutrofile, a w drugiej fali, zapalne makrofagi (KOŁACZKOWSKA i KUBES 2013). Przy przedłużającej się reakcji, gdy fagocytom nie uda się wyeliminować przyczyny zapalenia (usunąć ciała obcego/patogenu lub zagoić rany), zaangażowana zostaje odpowiedź nabyta z udziałem limfocytów (KOŁACZKOWSKA 2007).

LEUKOCYTY ZAANGAŻOWANE W ODPOWIEDŹ NA CIAŁA OBCE

Spośród leukocytów osiadłych, mastocyty występujące w tkankach, posiadają szereg ziarnistości, które zawierają różnorodne mediatory takie jak: aminy biogenne, chemokiny, cytokiny czy też czynniki wzrostu (MORITA i współaut. 2016). Efektem ich aktywacji i degranulacji (wydzielenia białek zawartych w ziarnistościach) jest przede wszystkim zwiększenie przepuszczalności lokalnych naczyń krwionośnych w początkowej fazie reakcji zapalnej. Dodatkowo, działają one chemotaktycznie na inne leukocyty, uwalniając chemokiny. Z kolei osiadłe makrofagi zasiedlają prawie każdą tkankę, a ich aktywacja ma kluczowe znaczenie dla rozwoju reakcji w odpowiedzi na implant (THOMSEN i GRETZER 2001). Wśród makrofagów wyróżniamy komórki osiadłe oraz tzw. komórki napływowe (zapalne), które docierają do tkanek dopiero po ich stymulacji/aktywacji przez czynniki zapalne. Po aktywacji, makrofagi wykazują zdolność do fagocytozy oraz eliminacji patogenu, wykorzystując dwa mechanizmy zabijania: drogę zależną od tlenu, albo niezależną od tlenu. W procesie zależnym od tlenu powstają toksyczne dla patogenów, powstające w wyniku redukcji tlenu cząsteczkowego, reaktywne rodniki tlenowe (ang. reactive oxygen species, ROS) oraz reaktywne formy azotu (ang. reactive nitrogen species, RNS), w tym tlenek azotu (ang. nitric oxide, NO) (THOMSEN i GRETZER 2001, MAJNO i JORIS 2004). Ponadto, zaktywowane makrofagi produkują cytokiny sprzyjające rozwojowi zapalenia, w tym: interleukiny (IL-1β, IL-6, IL-12p70), czynnik martwicy nowotworów TNF-α (ang. tumor necrosis factor), interferon γ (IFN-γ) oraz chemokiny takie jak: białko chemotaktyczne monocytów (ang. monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1/CCL2,) i CXCL8/IL-8, enzymy proteolityczne, w tym metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) (THOMSEN i GRETZER 2001, MAJNO i JORIS 2004). Spośród MMP szczególnie ważne są żelatynazy: MMP-2 i MMP-9. Ta pierwsza jest konstytutywnie (stale) produkowana, nie tylko przez makrofagi, ale także limfocyty i fibroblasty (OPDENAKKER i współaut. 2001). Jej stała produkcja jest związana z procesami fizjologicznej przebudowy tkanek (np. degradacją kolagenu), ale także uczestniczy w rozwoju chorób nowotworowych, np. przyczyniając się do angiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza. Natomiast MMP-9 jest produkowana przez liczne komórki, ale tylko po ich aktywacji. Wyjątkiem są neutrofile, które przechowują wcześniej wyprodukowany enzym w ziarnistościach. Enzym ten także uczestniczy w degradacji i rearanżacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej, w czasie zapalenia i procesów patologicznych (OPDENAKKER i współaut. 2001, KOŁACZKOWSKA i współaut. 2006, MALLA i współaut. 2008).

Biomateriały mogą aktywować makrofagi, z tego powodu są to komórki, które stanowią bardzo dobry model do badań biozgodności materiałów. Zwiększona aktywność makrofagów, objawiająca się wzrostem produkcji opisanych powyżej czynników, może wskazywać na obecność niepożądanych substancji w składzie badanego biomateriału (SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2012 a,

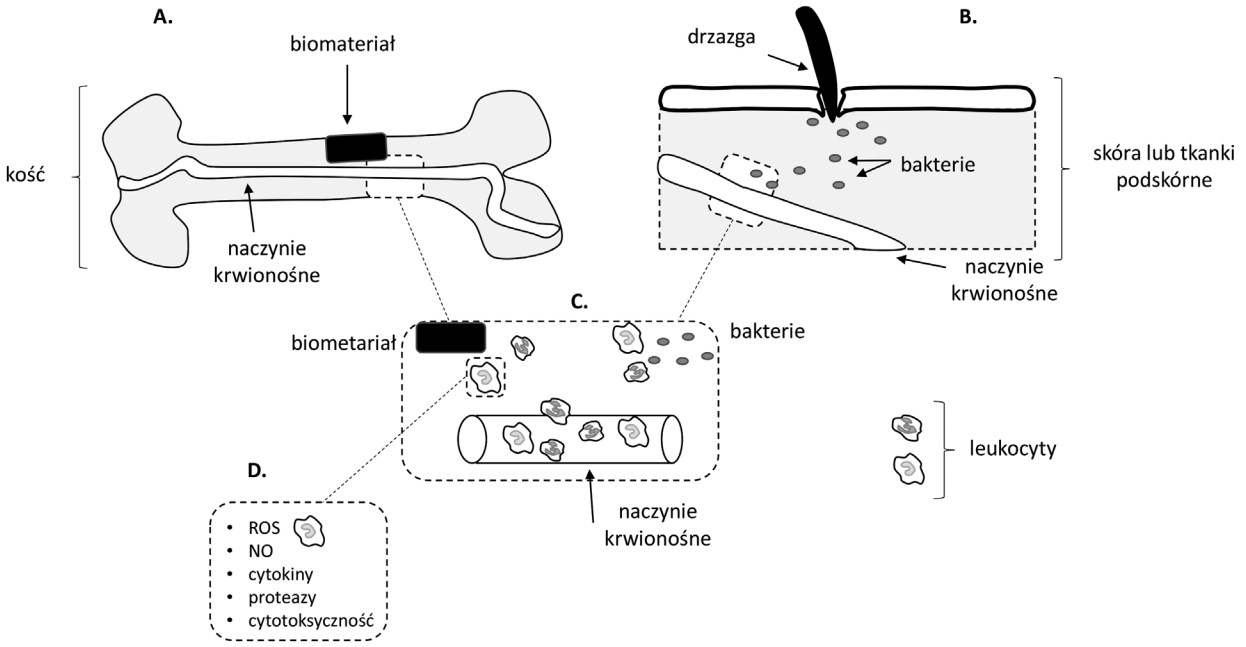
b). Makrofagi mają zdolność eliminowania mniejszych cząsteczek, w tym biomateriału, w procesie fagocytozy. W przypadku cząsteczek zbyt dużych do sfagocytowania, których nie można wyeliminować, ale które ciągle stymulują makrofagi, komórki te ulegają fuzji i tworzą tzw. wielojądrowe komórki olbrzymie (ang. *giant cells*). Proces ten jest konsekwencją przewlekłej stymulacji cytokinami i świadczyć może o niepożądanej degradacji biomateriału (ANDERSON i współaut. 1999). W końcowym etapie odczynu zapalnego, makrofagi produkują również czynniki przeciwzapalne, w tym IL-10.

Neutrofile są komórkami, które opuszczają krew migrując do tkanek tylko w stanach patologicznych (tylko w nielicznych przypadkach występują w tkankach w stanie fizjologicznym) (KOŁACZKOWSKA i KUBES 2013). W neutrofilach można wyróżnić 4 rodzaje ziarnistości, w których magazynowane są zarówno białka enzymatyczne (np. lizozym, elastaza neutrofilowa), jak i nieenzymatyczne (np. defensyny), które uczestniczą w niezależnym od obecności tlenu zabijaniu patogenów. Dodatkowo, podobnie jak makrofagi, neutrofile mogą przeprowadzać wybuch tlenowy. Mają także zdolność do wyrzutu NET (ang. neutrophil extracellular traps) (Patrz także prace PIJANOWSKI i współaut. oraz SANTOCKI i KOŁACZKOWSKA zamieszczone w tym zeszycie KOSMOSU). Po wyeliminowaniu ciała obcego neutrofile giną śmiercią apoptotyczną i są fagocytowane przez makrofagi (KOLACZKOWSKA i współaut. 2009).

Tak jak wspomniano, limfocyty są komórkami, które są angażowane w odpowiedź zapalną tylko wtedy, jeżeli fagocyty nie wyeliminują skutecznie ciał obcych/patogenów. Spośród różnych typów limfocytów, populacja limfocytów T zaangażowana jest w reakcje cytotoksyczne (limfocyty Tc) lub funkcje pomocnicze (limfocyty Th), ułatwiając aktywację limfocytów B, które po aktywacji przekształcają się w plazmocyty i wydzielają przeciwciała. Przeciwciała mogą na różne sposoby angażować się w odpowiedź immunologiczną, m.in. poprzez neutralizację ciał obcych lub aktywację komórek cytotoksycznych (GOŁĄB i współaut. 2014).

ODCZYN ZAPALNY

W reakcji na uszkodzenie tkanek, wniknięcie mikroorganizmów chorobotwórczych lub wszczepienie biomateriału, rozwija się zapalenie. Reakcja ta składa się z kilku eta-



Ryc. 1. Odpowiedź układu odpornościowego na wszczepienie biomateriału (**A**) i wniknięcie patogenów (**B**) jest bardzo podobna (**C, D**), ale w przypadku biomateriału jej intensywność zależy od stopnia biozgodności materiału z komórkami organizmu.

Pojawienie się jakiegokolwiek ciała obcego powoduje bowiem aktywację układu odpornościowego (A lub B). Dochodzi do napływu do miejsca implantacji biomateriału i/lub wniknięcia bakterii lub innych mikroorganizmów, leukocytów – komórek układu odpornościowego (C). Leukocyty napływają z lokalnie położonych naczyń krwionośnych. Komórki te ulegają aktywacji i rozpoczynają produkcję i wydzielanie cytokin i proteaz, a także przeprowadzają wybuch tlenowy generujący reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (NO, tlenek azotu) (D). Nadmierna aktywacja leukocytów może prowadzić do reakcji cytotoksycznych prowadzących do uszkodzenia także tkanek własnych (efekt uboczny).

pów, z których pierwszy to rozpoznanie antygenu/ciała obcego (KOŁACZKOWSKA 2007, KOTAS i MEDZHITOV 2015). Następnym etapem jest wzrost przepuszczalności naczyniowej, który prowadzi do wycieku osocza krwi poza naczynia (KOLACZKOWSKA 2002). W osoczu znajdują się m.in. czynniki chemotaktyczne, przyciągające leukocyty do miejsca zapalenia. Migracja leukocytów z krwi do miejsca zapalenia jest zapoczątkowana przez proces diapedezy, w którym ważną rolę odgrywają cząsteczki adhezyjne takie jak selektyny i integryny, które powodują kolejno: zahamowanie przepływu leukocytów z krwią (jest to tzw. „toczenie się" po ścianach naczyń krwionośnych), całkowite zatrzymanie się leukocytów i ich ścisłe przyleganie do śródbłonka, a ostatecznie transmigrację pomiędzy komórkami śródbłonka do przestrzeni pozanaczyniowej (KOŁACZKOWSKA 2007, KOLACZKOWSKA i KUBES 2013). W ostatnim etapie diapedezy i migracji leukocytów do miejsca zapalenia ważną rolę odgrywa wspomniana już MMP-9, która rozkłada składniki błony komórkowej i macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM). Podobnie działa elastaza neutrofilowa (KOŁACZKOWSKA i KUBES 2013). Poza naczyniami, leukocyty podążają w kierunku wzrastającego gradientu chemotaktycznego w procesie chemotaksji, a po dotarciu do miejsca zapalenia następuje eliminacja ciała obcego. Takie same etapy zapalenia będą zachodzić, gdy do organizmu dostaną się patogeny (np. bakterie chorobotwórcze), jak i wtedy, gdy zostanie do niego wprowadzone ciało obce (np. biomateriał, implant) (Ryc. 1).

JAK ZMINIMALIZOWAĆ AKTYWACJĘ UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO PRZEZ BIOMATERIAŁ

Nie da się stworzyć biomateriału „niewidocznego" dla układu odpornościowego, ale można stworzyć taki, który będzie go aktywował minimalnie, indukując tylko przejściową aktywację i tylko odpowiedzi wrodzonej. W tym celu należy syntetyzować lub udoskonalać istniejące już materiały tak, aby osiągnąć powyższy cel. Alternatywnym działaniem byłoby podawanie leków immunosupresyjnych, tak jak jest to stosowane przy przeszczepach. Jednak taka strategia nie jest brana pod uwagę, bo wiąże się ona z narażeniem pacjenta na infekcje wynikające z farmakologicznego obniżenia odporności.

Tworząc nowe biomateriały lub modyfikując już istniejące, należy zwracać szczególną uwagę na to, jakie będzie przeznaczenie danego materiału, i co z tym związane, jaka będzie skuteczność jego działania. Równie ważne jest to, aby nie wywoływał on reakcji zapalnej ze strony układu odpornościowego. Czym więc powinien się charakteryzować biomateriał, aby odpowiedź na niego ze strony układu odpornościowego była jak najsłabsza?

„Idealny" biomateriał powinien jak najbardziej przypominać naturalną tkankę, którą ma regenerować, oraz cechować się wysoką biozgodnością. Ten ostatni termin oznacza, że materiał nie może być cytotoksyczny czy też kancerogenny w stosunku do komórek organizmu oraz może wywoływać jedynie niewielką i przejściową reakcję zapalną (WILLIAMS 2008). Tworząc nowe, biozgodne materiały powinno się mieć na uwadze przede wszystkim polepszenie właściwości biomateriałów związanych z ich składem chemicznym. Większość biomateriałów polimerowych syntetyzowana jest metodą klasyczną, czyli z użyciem np. związków cyny, których całkowita eliminacja z implantu nie jest możliwa. Związki te, przenikając do okolicznych tkanek, mogą prowadzić do wystąpienia niepożądanych reakcji w miejscu wszczepu, w tym odczynu zapalnego. Dlatego też ważne jest, aby do inicjacji procesów wytwarzania biomateriałów poszukiwać i stosować związki, które same w sobie nie będą toksyczne, a także nie będą powodować powstawania substancji toksycznych podczas procesu wytwarzania materiału. Poprawę biozgodności można również uzyskiwać poprzez polepszenie właściwości fizycznych takich jak: stabilność i wytrzymałość, mikro lub nanostruktura, stopień porowatości, czyli parametry istotne i właściwe dla tkanek, do których będzie wprowadzany (BŁAŻEWICZ i STOCH 2003, ANDERSON 2006). Poprawę biozgodności uzyskuje się również poprzez modyfikację warstwy wierzchniej biomateriału, która pozwala na otrzymanie materiału o nowych, korzystniejszych właściwościach fizyko-chemicznych. Dzięki temu modyfikowany materiał jest bardziej „przyjazny" i „ukryty" przed układem odpornościowym. Modyfikację powierzchni biomateriałów przeprowadza się w różny sposób, m.in. pokrywając ją substancjami biologicznymi „przyjaznymi" dla komórek lub używając związków chemicznych. Zmianę właściwości powierzchni można osiągnąć dzięki różnym technikom: azotowania, utleniania, wodorowania, nawęglania (lub ich kombinacji), a także nakładając warstwy o odpowiednim składzie chemicznym lub dodając nanocząsteczki podczas tworzenia nanokompozytów. Zagadnienia te szerzej zostaną omówione w dalszej części artykułu, podamy także przykłady, jak konkretne, zmodyfikowane biomateriały udaje się lepiej „ukryć" przed układem odpornościowym.

RÓŻNORODNOŚĆ BIOMATERIAŁÓW

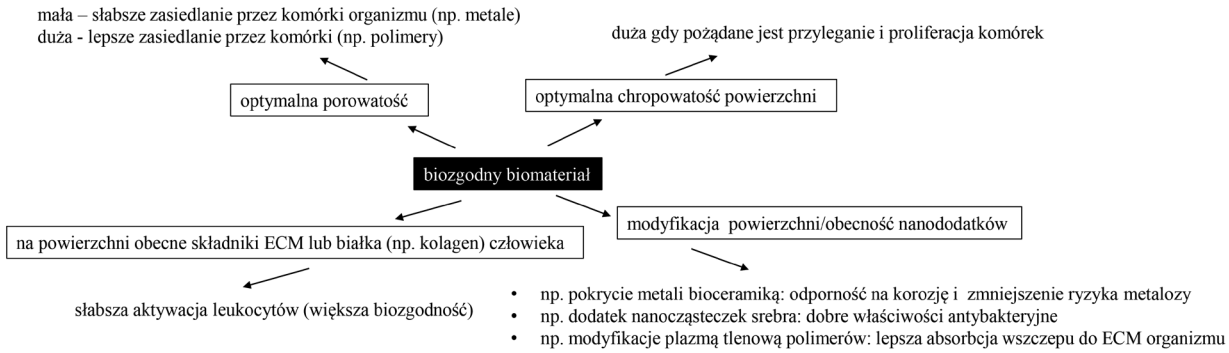
Jeden z podstawowych sposobów klasyfikacji biomateriałów jest oparty na pocho-

dzeniu materiału, z którego został wykonany wszczep. Na tej podstawie wyróżnia się materiały polimerowe, metale i ich stopy, materiały ceramiczne, węglowe oraz materiały kompozytowe (GARY i współaut. 2006).

Pierwsza grupa biomateriałów, najpowszechniej stosowana, to materiały polimerowe, które dzielimy na naturalne (np. kolagen, celulozę, chitozan, kwas hialuronowy), syntetyczne niedegradowane (biostabilne) i bioresorbowalne. Polimery niedegradowane nie ulegają rozkładowi w organizmie człowieka pod wpływem płynów ustrojowych, czyli są niewrażliwe na działanie środowiska biologicznego. Do tej grupy zaliczamy między innymi: polietylen, polipropylen, poliamidy, poliuretany, silikon czy polimery akrylowe (BŁAŻEWICZ i STOCH 2003, GARY i współaut. 2006). Z kolei polimery bioresorbowalne ulegają rozkładowi w środowisku biologicznym do nieszkodliwych produktów ubocznych, które w organizmie występują jako produkty przemiany materii bądź są składnikami budującymi tkanki (LIU i MA 2004). Proces całkowitej degradacji (biodegradacji) powinien odbywać się w sposób kontrolowany. Zbyt szybki rozkład polimeru może doprowadzić zarówno do utraty właściwości mechanicznych wszczepu, jak i do nagromadzenia w zbyt krótkim czasie produktów jego rozkładu w ilości niemożliwej do usunięcia przez organizm. To z kolei może skutkować rozwojem odczynu zapalnego. Najczęściej stosowane polimery bioresorbowalne to: poliestry kwasu mlekowego – polilaktydy (PLA), kwasu glikolowego – glikolid (PGA) oraz ich kopolimery (PAMULA i współaut. 2004, SABIR i współaut. 2009, SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2013). Użyteczność polimerów wynika z różnorodności ich właściwości fizyko-chemicznych oraz materiałowych, np. łatwości uzyskiwania powtarzalnej jakości materiałów, czy łatwości ich formowania. Początkowo polimery służyły jedynie do wytwarzania produktów jednorazowego użytku, natomiast obecnie są szeroko stosowane do wyrobu różnego rodzaju implantów podtrzymujących funkcje ustroju (GOGOLEWSKI 2003, GOŁĘBIEWSKI i współaut. 2008). Znajdują zastosowanie w chirurgii naczyniowej i kardiochirurgii (sztuczne naczynia krwionośne, zastawki serca, izolacje przewodów do rozruszników serca), w chirurgii szczękowo-twarzowej do wypełniania ubytków kostnych żuchwy, szczęk, rekonstrukcji kości twarzy czy też w korekcji kosmetycznej np. nosa, podbródka. Polimery znalazły także zastosowanie w chirurgii urazowej oraz ortopedii, np. do wyrobu panewek stawu biodrowego czy elementów protez kolana i stawu łokciowego, a także do wyrobu ścięgien i więzadeł (GOGOLEWSKI 2003, GOŁĘBIEWSKI i współaut. 2008). Stosuje się je również jako zespolenia kostne (płytki, śruby, gwoździe krótkiego użycia), które nie muszą być usuwane na drodze ponownej ingerencji chirurgicznej po uzyskaniu prawidłowego zrostu kostnego, a także jako nici chirurgiczne oraz kleje do celów medycznych (tutaj zastosowanie mają głównie polimery naturalne). Szczególnie szeroko polimery znalazły zastosowanie do tworzenia trójwymiarowych rusztowań, mających wspomagać proliferację oraz różnicowanie komórek macierzystych, a w efekcie regenerację uszkodzonej tkanki (GOGOLEWSKI 2003, GOŁĘBIEWSKI i współaut. 2008).

Metale, z których najczęściej wykonywane są implanty to stal kwasoodporna, stal nierdzewna, stopy na osnowie kobaltu, a także tytan i jego stopy (GARY i współaut. 2006). Biomateriały metaliczne charakteryzują się (i) wysoką stabilnością, gdyż nie ulegają rozkładowi/degradacji w organizmie, (ii) korzystnym zestawem właściwości mechanicznych, np. wysoką wytrzymałością zmęczeniową, (iii) wysokim modułem sprężystości, czyli wysoką wytrzymałością na zginanie oraz rozciąganie (MARCINIAK 2003). Dzięki temu metale i ich stopy znalazły zastosowanie głównie w ortopedii i chirurgii. Stosuje się je do produkcji endoprotez stawowych i jako stabilizatory uszkodzonych kości. W postaci śrub, gwoździ, płytek stabilizujących służą również jako elementy do zespalania złamanych kości. Materiały metaliczne znalazły również zastosowanie w kardiochirurgii i kardiologii zabiegowej. Wykorzystywane są do tworzenia pierścieni i koszyczków w zastawkach kulkowych, czy też do tworzenia sprężystego rusztowania stentu, wszczepianego w miejsce krytycznie zwężonego naczynia krwionośnego w celu poszerzenia jego światła (MARCINIAK 2003). Niewątpliwą wadą implantów metalicznych jest jednak ich korodowanie w wyniku kontaktu z płynami ustrojowymi, a w konsekwencji wystąpienie metaloz, czyli uwalniania wskutek korozji, składników metalu do otaczających tkanek. Stanowi to przyczynę wystąpienia wielu stanów patologicznych, między innymi alergii czy też odczynu zapalnego (SCHARNWEBER i współaut. 2002). Metaloza bardzo często powoduje również konieczność powtórnego zabiegu chirurgicznego w celu usunięcia implantu.

Do biomateriałów zaliczamy również materiały ceramiczne – bioceramikę (ŚLÓSARCZYK 2003). Wśród nowoczesnych materiałów implantacyjnych szczególne miejsce zajmują materiały oparte na fosforanach wapnia (HAp-hydroksyapatycie i TCP-trifosforanie wapnia). Bioceramika hydroksyapatytowa ma identyczny skład chemiczny i podobną strukturę jak kość ludzka, zbudowana w więk-



Ryc. 2. Stopień biozgodności wszczepianego materiału determinuje jego przyjęcie przez organizm oraz minimalizuje aktywację układu odpornościowego.

Na schemacie przestawiono cechy biomateriału, które zwiększają jego biozgodność czyli brak lub minimalną cytotoksyczność w stosunku do tkanek własnych, oraz niewielką i przejściową reakcję zapalną. ECM – substancja pozakomórkowa.

szości z substancji nieorganicznej (HENCH 1991, VALLET-REFI i GONZALES-CALBET 2004). To powoduje, że materiały ceramiczne mogą być efektywniejsze jako wszczepy, w porównaniu z metalami i polimerami (Ryc. 2). Materiały ceramiczne w porównaniu z innymi biomateriałami charakteryzują się również dobrymi właściwościami fizycznymi: porowatością umożliwiającą wrastanie tkanek, dużą wytrzymałością na ściskanie, wysoką odpornością na korozję w środowisku organizmu, kruchością, odpornością na ścieranie, a także możliwością sterylizacji bez zmiany właściwości materiału (ŚLÓSARCZYK 2003). Biomateriały ceramiczne nie są jednak pozbawione wad, gdyż posiadają niską wytrzymałość mechaniczną oraz są nieodporne na duże obciążenia, zginanie i odkształcanie. Najszersze zastosowanie materiały ceramiczne mają w ortopedii i stomatologii. Stosowane są do uzupełnianiu ubytków kostnych i zębowych (cementy) oraz do wytwarzania pokryć na implantach dentystycznych i ortopedycznych. Stosuje się je również w otolaryngologii jako implanty ucha środkowego oraz w inżynierii tkankowej jako podłoża do hodowli tkanek (ŚLÓSARCZYK 2003).

Pozycja materiałów węglowych jest zdecydowanie mniej znacząca, w porównaniu z innymi grupami biomateriałów. Najważniejszą ich zaletą jest to, że ich cechy, zarówno fizyczne, jak i chemiczne, mogą być zmieniane w trakcie procesu technologicznego bez użycia dodatków modyfikujących, jak to się odbywa w przypadku materiałów polimerowych i metalicznych. Z punktu widzenia medycyny istotne cechy węgla związane są przede wszystkim z jego fizyczną strukturą, czyli porowatością oraz wielkością i kształtem porów, które decydują o przyleganiu penetrujących go komórek (BŁAŻEWICZ i współaut. 2003). Wadą materiałów węglowych jest ich niska wytrzymałość mechaniczna oraz wywoływanie przewlekłego stanu zapalnego w miejscu wszczepu. Inertne (chemicznie obojętne) materiały węglowe znajdują zastosowanie głównie w ortopedii, w postaci biozgodnych oraz odpornych na ścieranie warstw i pokryć, które są nanoszone na powierzchnię implantów polimerowych i metalicznych poprawiając ich właściwości biologiczne. Również włókniste materiały węglowe wykorzystywane są w medycynie, jednakże w znacznie mniejszym stopniu. Służą one do wyrobu nici do szycia tkanek miękkich oraz do produkcji łączników, płyt i śrub wykorzystywanych w osteosyntezie. Włókna w postaci plecionek stosowane są z kolei do wyrobu ścięgien i więzadeł w rekonstrukcjach okołostawowych (BŁAŻEWICZ i współaut. 2003).

NA DRODZE DO BIOZGODNOŚCI: KOMPOZYTY I MODYFIKACJE POWIERZCHNI

Biorąc pod uwagę wady i zalety opisanych powyżej grup materiałów, ciekawym rozwiązaniem wydaje się być łączenie różnych typów materiałów w taki sposób, aby wykorzystać jak najwięcej ich zalet i jednocześnie wyeliminować wady (Ryc. 2). Z tego powodu coraz większą uwagę poświęca się materiałom kompozytowym oraz modyfikacji powierzchni biomateriałów. Materiały kompozytowe składają się z co najmniej dwóch różnych materiałów wyjściowych: matrycy (osnowy) i napełniacza (dodatku). Jednak właściwości kompozytu nie są składową wszystkich cech materiałów, z których zostały wykonane (EVANS i GREGSON 1998). Dzięki łączeniu ze sobą różnych materiałów powstają kompozyty o nowych, z reguły lepszych właściwościach mechanicznych, fizycznych i chemicznych niż materiały wyjściowe. Obecnie ogromna rolę odgrywają nanokompozyty – struktury, w których jeden

z wymiarów zawiera się w granicach 1-100 nm (DZIADEK i współaut. 2017, VAN RIJT i HABIBOVIC 2017). Wśród nanododatków stosowanych do tworzenia kompozytów można wymienić: srebro, tlenek tytanu, związki ceramiczne, bioszkła i nanorurki węglowe. Dzięki swoim unikatowym właściwościom, nanokompozyty stosowane są w wielu dziedzinach. Srebro, ze względu na posiadanie właściwości antybakteryjnych, jest wykorzystywane do tworzenia nanokompozytów przeznaczonych do regeneracji skóry (LIN i współaut. 2013). Tlenek tytanu znalazł zastosowanie między innymi jako nanododatek do materiałów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej (FARZIN i współaut. 2013). Z kolei nanododatki ceramiczne są szeroko stosowane w stomatologii, chirurgii szczękowo-twarzowej, w ortopedii oraz do wytwarzaniu podłoży do hodowli komórek (YUNUS BASHA i współaut. 2015, DZIADEK i współaut. 2017). Natomiast nanorurki węglowe, w połączeniu z polimerami, znajdują zastosowanie głównie do tworzenia rusztowań dla komórek (BŁAŻEWICZ i współaut. 2003).

W użyciu klinicznym znajduje się wiele dobrze przebadanych biomateriałów, jednak obecnie zauważa się ich niedoskonałości, wynikające z wieloletniego stosowania i funkcjonowania w organizmie pacjentów. Dlatego też, choć materiały te przechodzą pomyślnie testy odnoście ich parametrów fizyko-chemicznych, wciąż istnieje potrzeba ich modyfikacji i ulepszania.

Jednymi z częściej modyfikowanych biomateriałów są polimery. Materiały te powinny być biologicznie aktywne, poprzez specyficzne oddziaływania molekularne ligand-receptor, podobne do tych jakie występują w rodzimej tkance (KIRKPATRICK i współaut. 1997). Ponieważ polimery nie posiadają na swojej powierzchni ligandów dla receptorów komórkowych, dlatego w celu nadania im korzystniejszych właściwości biologicznych poddaje się ich powierzchnie chemicznej lub biologicznej modyfikacji. Podczas chemicznej modyfikacji, np. zasadą sodową lub za pomocą plazmy tlenowej, na powierzchni polimerów powstają odpowiednie grupy funkcyjne, które mają na celu poprawę warunków dla adsorpcji na powierzchni materiałów białek substancji międzykomórkowej ECM, które łączą się z odpowiednimi receptorami na komórkach organizmu (YAMAGUCHI i współaut. 2004). W wyniku tej modyfikacji obserwuje się, w większości badanych przypadków, poprawę morfologii, przylegania, proliferacji i żywotności komórek hodowanych w kontakcie z tymi materiałami (PAMULA i współaut. 2006; SZMIGIEL i współaut. 2006, 2008). Sugeruje to, że cechy te będą również korzystne po wszczepieniu do organizmu człowieka. W celu modyfikacji biologicznej powierzchni polimeru stosuje się między innymi kolagen. Jest on jednym z podstawowych białek strukturalnych występujących w istocie międzykomórkowej tkanki łącznej (w kościach, chrząstce, ścięgnach), zaangażowanym w wiele procesów fizjologicznych w organizmie. Bierze udział w procesach gojenia się ran, tworzenia blizn czy regeneracji kości. Niezwykle istotną rolą kolagenu w modyfikacji powierzchni polimerów jest to, że wykazuje on zdolność specyficznego wiązania się z receptorami błonowymi, odgrywając w ten sposób istotną rolę w polepszeniu procesów przylegania, migracji, wzrostu i różnicowania komórek, a tym samym, w polepszeniu biozgodności badanego materiału/polimeru (HEINO 2007, KADLER i współaut. 2007, ADAMCZAK i współaut. 2011).

Obecnie podejmuje się również wiele wysiłków, aby poprawić biozgodność metali i ich stopów tak, aby były one przyjazne dla komórek (sprzyjały ich właściwej aktywności) i nie wywoływały metaloz. Również wśród metod mających na celu poprawę biozgodności metali wyróżniamy modyfikację ich powierzchni. Zmianę właściwości powierzchni można osiągnąć np. dzięki technikom nawęglania lub pokrywania warstwą bioceramiki. Węglem pokrywa się praktycznie wszystkie grupy materiałowe, co ma zasadniczy wpływ na ich właściwości użytkowe (BŁAŻEWICZ i współaut. 2003). W odniesieniu do zastosowań medycznych, szczególne znaczenie mają implanty pokryte węglem pirolitycznym, który charakteryzuje się nietrombogennością (brakiem miejsc wiązania płytek krwi), co oznacza, że nie sprzyjają one procesowi powstawania zakrzepów. Modyfikacje powierzchni metali węglem zmniejszają również zużycie materiału poprzez ścieranie oraz obniżają tarcie powierzchni ślizgowych, co ma szczególne znaczenie w przypadku implantów metalicznych stosowanych w ortopedii (BŁAŻEWICZ i współaut. 2003). Przykładem modyfikacji powierzchni poprzez nakładanie warstw ceramicznych o odpowiednim składzie chemicznym może być osadzanie warstw hydroksyapatytu, fosforanu wapnia czy bioszkła na powierzchni metalu. Ma to polepszyć właściwości metali w kontakcie z komórkami kostnymi. Zaobserwowano, że modyfikacje warstwami ceramicznymi poprawiają przyleganie osteoblastów, a także stymulują właściwości osteoinduktywne komórek kostnych (MRÓZ i współaut. 2008, 2010; SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2008).

BADANIE BIOZGODNOŚCI IMPLANTÓW

Jeżeli ważnym jest, aby biomateriał był biozgodny, niecytotoksyczny, niemutagenny i aby wywoływał jedynie słabą i przejścio-

wą reakcję ze strony układu odpornościowego, każdy nowopowstały materiał należy poddać odpowiednim testom z zastosowaniem żywych komórek. Za podstawowe badanie biozgodności uważa się weryfikację jego wpływu cytotoksycznego na komórki pochodzące z tkanek, do których biomateriał ma być docelowo wprowadzony. Bardzo ważna jest zarówno ocena jakościowa, jak i ilościowa komórek hodowanych w kontakcie z biomateriałem. W ocenie jakościowej należy wziąć pod uwagę morfologię komórek, natomiast w ocenie ilościowej komórek bada się ich przyleganie, proliferację, żywotność i aktywność wydzielniczą. Obserwacja mikroskopowa komórek, to pierwszy i najbardziej podstawowy etap oznaczania cytotoksyczności biomateriałów (SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2012a, b, 2013). Wygląd komórek: ich kształt, obecność lub brak wypustek, wakuolizacja cytoplazmy, kształt jądra, to ważne aspekty brane pod uwagę przy ocenie prawidłowej/niezmienionej pod wpływem biomateriału budowy komórek. Ocenę morfologii komórek przeprowadza się przy użyciu różnego typu mikroskopów świetlnych i elektronowych. Przyleganie komórek do powierzchni biomateriału jest jednym z podstawowych testów oceny cytotoksyczności biomateriałów. Jest ona najczęściej badana za pomocą testu wchłaniania fioletu krystalicznego przez komórki, które uległy adhezji do powierzchni materiału. Metoda ta polega na ekstrakcji fioletu krystalicznego, wchłoniętego uprzednio przez komórki. Zmierzona absorbancja jest proporcjonalna do liczby komórek przylegających do biomateriału (SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2012b, 2013). Z kolei do oznaczenia wpływu na proliferację komórek używa się przeciwciał wykrywających marker komórkowej proliferacji, antygen Ki-67, zazwyczaj przy użyciu metody immunocytochemicznej, lub 2-bromo-5deoksyurydynę (BrdU). BrdU to analog pirymidyny, który zostaje włączony do DNA, zamiast tymidyny, podczas proliferacji komórek. Następnie obecność BrdU wykrywa się przy pomocy monoklonalnych przeciwciał anty-BrdU, sprzężonych z enzymem lub barwnikiem fluorescencyjnym) (PŁYTYCZ i CHADZIŃSKA 2016). Testem najczęściej stosowanym do oznaczania żywotności komórek jest test MTT, czyli test redukcji soli tetrazolowej (ang. tetrazolium reduction assay), co jest miarą aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych. Test ten oznacza aktywność mitochondrialną a zatem pośrednio żywotność komórek (PŁYTYCZ i CHADZIŃSKA 2016). Obecnie coraz częściej do badań biologicznych biomateriałów wykorzystuje się cytometrię przepływową. Przykładowo, komórki wybarwia się jodkiem propydyny (barwnikiem wiążącym się z DNA), który wnika tylko do komórek martwych, oraz Aneksyną V, która wiąże fosfatydyloserynę obecną po zewnętrznej stronie błony komórkowej, ale tylko komórek apoptotycznych. Takie barwienia umożliwiają identyfikację komórek żywych, nekrotycznych i apoptotycznych (PŁYTYCZ i CHADZIŃSKA 2016). W celu określenia, czy dochodzi do aktywacji komórek układu odpornościowego podczas kontaktu z badanymi biomateriałami, można sprawdzać ich zdolność do indukcji wybuchu tlenowego, bądź też badać czynniki wydzielane przez pobudzone komórki, w tym poziom cytokin prozapalnych (np. TNF-α, IL-1β), przeciwzapalnych (np. IL-10), chemokin (np. IL-8, MCP-1) oraz enzymów proteolitycznych (np. MMP-9, elastazy neutrofilowej). Produkcję wolnych rodników tlenowych można badać przy pomocy testu kolorymetrycznego redukcji błękitu nitrotetrazolowego (NBT) (PŁYTYCZ i CHADZIŃSKA 2016). Powstające reaktywne formy tlenu powodują przejście żółtej soli tetrazolowej do niebieskiego formazanu. Intensywność niebieskiego zabarwienia oznaczana spektrofotometrycznie świadczy o nasileniu wybuchu tlenowego. Z kolei poziom tlenku azotu można zmierzyć metodą Griessa (SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2012b, 2013). Istotą tego testu jest pomiar poziomu metabolitów tlenku azotu: azotynów i azotanów. Zmierzona spektrofotometrycznie absorbancja jest proporcjonalna do stężenia tlenku azotu w badanej próbce. Poziom cytokin wydzielanych przez leukocyty, w wyniku ich kontaktu z biomateriałem, można badać wykorzystując m.in. testy immunoadsorbcyjne ELISA (PŁYTYCZ i CHADZIŃSKA 2016). Pozwalają one wykryć określone białka w płynie znad hodowli komórek z biomateriałem, z użyciem przeciwciał rozpoznających to (i tylko to) białko, sprzężonych z odpowiednim enzymem. Najpierw przeciwciałami nie sprzężonymi z enzymem opłaszcza się dno płytki analitycznej i dodaje do niej próbkę do analizy. Po związaniu się danego białka z rozpoznającym je przeciwciałem, dodaje się przeciwciało o tej samej specyficzności (wykrywające to samo białko), ale związane z określonym enzymem (powstają zatem kompleksy: nagie przeciwciało-białko-znakowane przeciwciało). Po dodaniu substratu, zachodzi reakcja enzymatyczna. Zazwyczaj stosuje się takie substraty, które w wyniku reakcji z enzymem przechodzą w barwny produkt, którego ilość można oznaczać spektrofotometrycznie. Istnieje jednak wiele odmian tego testu, np. ELISA „kanapkowa" (ang. sandwich ELISA) (gdy używa się dwóch różnych przeciwciał, pierwszego wiążącego wykrywane białko i drugiego wykrywającego obecność przeciwciała pierwszorzędowego), czy kompe-

tycyjny test ELISA (ang. competitive ELISA) (gdy do analizowanego materiału zawierającego interesujące nas białko, dodaje się także wyznakowane białko, które konkuruje z białkiem zawartym w badanym materiale; w tym przypadku barwny sygnał jest odwrotnie proporcjonalny do poziomu białka w próbce). Z kolei metaloproteinazy można wykrywać za pomocą zymografii, która jest zmodyfikowaną techniką elektroforetyczną służącą do pomiaru aktywności proteolitycznej enzymów, których substrat można inkorporować w żelu (KOLACZKOWSKA i współaut. 2006).

BIOZGODNOŚĆ A AKTYWACJA KOMÓREK ODPORNOŚCIOWYCH

Badania biologiczne *in vitro*, czyli poza organizmem, są pierwszym etapem testowania biomateriałów zanim zostaną one dopuszczone do użytku medycznego. Badania te są kluczowe, gdyż tylko materiał, który pozytywnie przejdzie badania *in vitro*, może być następnie dopuszczony do testowania *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych, a następnie wykorzystany do ewentualnych badań klinicznych.

Poniżej przedstawimy przykładowe wyniki pokazujące jak testowane są główne komórki immunokompetentne: neutrofile, makrofagi i limfocyty, pod kątem ich aktywacji przez różne grupy biomateriałów.

NEUTROFILE: Badania na neutrofilach są stosunkowo rzadkie, dlatego grupa Daniela G. Andersona z Boston Children's Hospital w USA przetestowała wpływ na te komórki mikrokapsułek zbudowanych z 5 różnych biomateriałów (JHUNJHUNWALA i współaut. 2015). Były to mikrokapsułki polimerowe: alginianu, polistyrenu, metylometakrylu (PMMA), kopolimeru glikolidu z L-laktydem (PGLA) oraz szklane. Co ważne, badania te przeprowadzono w układzie *in vivo*, wprowadzając badane mikrokapsułki do jamy otrzewnej myszy laboratoryjnych. Testowano ich wpływ na różne aspekty aktywności neutrofili: napływ komórek do miejsca implantacji biomateriałów, fagocytozę, produkcję cytokin i chemokin, wydzielanie elastazy neutrofilowej oraz tworzenie NET. U myszy kontrolnych, którym nie podawano mikrokapsułek, w płynie pobranym z jamy otrzewnej stwierdzono obecność makrofagów, komórek dendrytycznych, limfocytów B i limfocytów T. Stwierdzono, że w przypadku wszczepienia wszystkich biomateriałów obserwuje się napływ do otrzewnej neutrofili, a najwyższy w przypadku mikrokapsuł alginianu. Komórkami, których liczba w ogóle nie uległa zmianie po wszczepieniu każdego typu mikrokapsułek były limfocyty B i T. Co ważne, okazało się, że intensywność napływu neutrofili zależała nie tylko od rodzaju wszczepionego materiału, ale również od postaci w jakiej był podawany. Alginian w formie mikrożelu powodował wzrost liczby neutrofili, podczas gdy podany w formie roztworu nie wywoływał takiego efektu. Ważnym czynnikiem wpływającym na napływ komórek immunokompetentnych do miejsca implantacji okazała się również zdolność do degradacji materiału, co wykazano na przykładzie mikrokapsuł zawierających polimery, gdzie silniejszy napływ neutrofili obserwowano po podaniu PGLA, który nie ulega degradacji pod wpływem płynów ustrojowych, niż w obecności PGLA ulegającego takiej degradacji. Z kolei w przypadku wprowadzenia mikrokapsułek szklanych, wzrost liczby neutrofili nie był zależny od rodzaju ich powierzchni. Zaobserwowano także korelację między liczbą neutrofili a ilością wprowadzanych mikrokapsułek. Wyniki badań potwierdziły także zdolności fagocytarne neutrofili pozyskanych z jamy otrzewnej z wszczepionymi mikrokapsułkami polistyrenu oraz wzrost produkcji cytokin (IL-6, IL-12p40) i chemokin (MCP-1/CCL2, MIP-2/CXCL2, RANTES/CCL5, KC/CXCL1) po dootrzewnowym podaniu mikrokapsułek alginianu. Zaobserwowano również, że na skutek aktywacji mikrokapsułkami polistyrenu, PMMA i alginianu neutrofile wyrzucały zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (NET). Reasumując, badania te wykazały znaczenie dla aktywacji neutrofili postaci pod jaką podaje się materiał i jego biodegradowalności oraz wskazały, że alginian zbyt mocno aktywuje neutrofile, zatem jego biokompatybilność jest wątpliwa.

MAKROFAGI: Są to leukocyty najczęściej badane w kontekście testowania biozgodności materiałów implantacyjnych. Komórki te do wzrostu i proliferacji wymagają kontaktu z podłożem, dlatego pomiar ich zdolności do przylegania do podłoża wskazuje również na ich żywotność (martwe komórki odrywają się od podłoża). Dlatego przyleganie do podłoża jest jednym z ważniejszych parametrów wskazujących, czy dany materiał stanowi dobre podłoże dla komórek. Makrofagi ulegają aktywacji dopiero po stymulacji przez ciała obce, zatem zwiększona aktywność tych komórek, przejawiająca się wzrostem produkcji czynników prozapalnych, może wskazywać na obecność niekorzystnych substancji w składzie użytego biomateriału (SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2012a, b).

Wiele przeprowadzonych badań na tytanie dowodzi, że materiał ten jest wystarczająco biozgodny i jest szeroko stosowany jako materiał na implanty. Istnieją jednak prace, które wskazują, że tytan i jego stopy nie mogą być stosowane w medycynie bez ograniczeń. Związane to jest przede wszystkim z odczynem zapalnym na skutek metalozy.

Dlatego też ciągle podejmowane są próby modyfikacji/ulepszania tego materiału i jego stopów. Przykładowo, w badaniach naszego zespołu weryfikowaliśmy, czy modyfikacja powierzchni tytanu poprzez naniesienie bioaktywnych warstw ceramicznych w postaci: hydroksyapatytu (HA), bioszkła (BG) i krzemianu wapnia (CS), poprawi jego biokompatybilność. (SCISLOWSKA-CZARNECKA i współaut. 2012a). Modyfikacja powierzchni tytanu poprzez naniesienie warstwy CS, wykazała spadek przylegania oraz zmianę morfologii hodowanych na nim makrofagów. Co więcej, komórki były zaktywowane i produkowały więcej białka, cytokin prozapalnych (IL-6, IL-12, IFN-γ, TNF-α) oraz chemokiny MCP-1/CCL2. Z kolei naniesienie warstwy HA wprawdzie obniżyło przyleganie makrofagów do powierzchni materiału, ale nie spowodowało aktywacji komórek. W tym przypadku wzrost produkcji i wydzielania cytokin prozapalnych, IL-6 i IFN-γ, był niewielki i jedynie przejściowy. Materiałem o najlepszych właściwościach modyfikujących okazało się być bioszkło. Przyleganie komórek do tytanu pokrytego BG było najlepsze, a morfologia komórek prawidłowa. Co więcej, bioszkło nie spowodowało aktywacji makrofagów, a produkcja białka, MMP-9 oraz cytokin (TNF-α, IFN-γ) i chemokiny MCP-1/CCL2 była znacząco niższa niż w przypadku komórek hodowanych na czystym, kontrolnym tytanie. Badania te pokazały zatem, że pokrycie metalu (tytanu) materiałami bioceramicznymi zwiększa jego biozgodność, a bioszkło w najwyższym stopniu poprawia ten parametr.

LIMFOCYTY: Spośród biomateriałów, wszczepy metali najdłużej znajdują się w organizmie, nie ulegają biodegradacji i mają gwarantować funkcje związane z wzmocnieniem, korektą lub zastąpieniem elementów szkieletu. To powoduje, że mogą aktywować nie tylko odpowiedź wrodzoną, ale także odpowiedź nabytą, która może prowadzić do długotrwałej, przewlekłej reakcji zapalnej (GIBON i współaut. 2016). Z drugiej strony, limfocyty są stosunkowo rzadko testowanymi komórkami w kontekście badań nad biomateriałami. Przykładowo, grupa badaczy z Uniwersytetu Akdeniz w Turcji testowała wpływ kilku stężeń nonocząsteczek tlenku tytanu IV (TiO_2), tlenku cyrkonu (ZrO_2) lub tlenku glinu (Al_2O_3) na limfocyty izolowane z krwi obwodowej ochotników (DEMIR i współaut. 2013). Okazało się, że nanocząsteczki te dodane do hodowli limfocytów nie spowodowały spadku ich żywotności, chociaż TiO2 spowodował wzrost uszkodzeń DNA. Natomiast genotoksycznego wpływu nie obserwowano w przypadku nanocząsteczek ZrO2 i Al2O3. Należy podkreślić, że po rozpoznaniu antygenów i aktywacji, limfocyty ulegają intensywnej proliferacji. Jeżeli w czasie tego procesu dochodzi do uszkodzeń DNA, to albo komórki wchodzą na drogę apoptotyczną, co eliminuje je z organizmu, albo mogą powstać potencjalnie autoreaktywne limfocyty potomne (UYANIK i współaut. 2017). Żaden z tych scenariuszy nie jest korzystny. Inne badania, przeprowadzono *in vivo* na szczurach, którym podskórnie wszczepiono materiał modyfikowany nanowłóknami jedwabiu. Wykazały one wzrost napływu limfocytów do miejsca wszczepu, a w miarę upływu czasu liczba ta spadała. Można więc wyciągnąć wniosek, że materiał ten wykazał jedynie przejściową/krótkotrwałą aktywację limfocytów, która nie powinna mieć wpływu na biomateriał i otaczające tkanki w dłuższej perspektywie czasowej (GHOLIPOURMALEKABADI i współaut. 2015). Podobne zjawisko, jedynie przejściowego wzrostu liczby limfocytów w miejscu implantacji, stwierdzono u szczurów, którym podskórnie wprowadzono chitozan modyfikowany dodatkiem nanorurek węglowych (NAWROTEK i współaut. 2016). Co więcej, badania histologiczne tkanek pobranych z miejsc otaczających wszczepiony biomateriał nie wykazywały objawów ostrego zapalenia, a wręcz zaobserwowano oznaki prawidłowego procesu gojenia się tkanek. Jeżeli reakcja na wszczep ze strony organizmu jest prawidłowa, wokół implantu obserwuje się otoczkę złożoną ze zbitej tkanki łącznej. Ta reakcja organizmu zapewnia izolację wszczepionego materiału oraz wskazuje na biotolerancję użytego biomateriału (BŁAŻEWICZ i STOCH 2003). W obu badaniach przeprowadzonych na szczurach nie zaobserwowano proliferacji limfocytów, która byłaby wskaźnikiem rozpoznania antygenów przez te komórki i oznaczała możliwość rozwoju cytotoksyczności, zatem uznano, że spełniają one wymogi biozgodności.

DALSZE PERSPEKTYWY

Rynek biomateriałów jest ciągle w fazie rozwoju. Wiele z dostępnych biomateriałów nie jest doskonałych, a zbliżenie ich funkcjonalności do naturalnej tkanki ludzkiej jest dużym i trudnym wyzwaniem. Poza właściwościami fizyko-chemicznymi biomateriałów, równie ważny jest ich wpływ na układ odpornościowy. Dlatego wprowadza się biologiczne, lub zbliżone do biologicznych, składowe do nowo tworzonych biomateriałów po to, aby „ukryć" biomateriał przed układem immunologicznym. Biorąc pod uwagę rosnące zapotrzebowanie na biomateriały oraz wyzwania związane z medycyną regeneracyjną, należy się spodziewać, że badania łączące inżynierię materiałową, z inżynierią tkankową, immunologią, chirurgią i ortopedią będą

dynamicznie rozwijającą się gałęzią interdyscyplinarną.

Sreszczenie

Wprowadzając do organizmu człowieka biomateriał, musimy mieć pewność, że jest on biozgodny (nie cytotoksyczny czy karcynogenny) i że ryzyko aktywacji układu odpornościowego jest niewielkie. Grupa biomateriałów dopuszczonych do użytku medycznego jest obszerna, jednak wiele z nich nie spełnia jednocześnie wszystkich wymagań w zakresie biozgodności. Dlatego materiały przeznaczone do użytku medycznego są wciąż udoskonalane/modyfikowane w celu poprawy ich parametrów, a co za tym idzie, w celu ich jak najskuteczniejszego „ukrycia" przed układem odpornościowym. Jedną z najczęstszych, niepożądanych reakcji organizmu na biomateriał/implant jest odczyn zapalny. Dlatego wiele badań koncentruje się na wpływie implantów na komórki układu odpornościowego. Wykazano, że najczęściej obecnie stosowane modyfikacje biomateriałów, pokrycie ich powierzchni materiałem biologicznym, zmiana porowatości czy też dodatek nanocząsteczek, istotnie poprawiają ich właściwości, w tym osłabiają aktywację leukocytów. W obecnym opracowaniu opisujemy typy biomateriałów, sposoby ich modyfikacji oraz wpływ na komórki immunokompetentne z naciskiem na strategie, które pozwalają na uniknięcie aktywacji układu odpornościowego.

LITERATURA

ADAMCZAK M., ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA A., GENET M. J., DUPONT-GILLAIN C. C., PAMULA E., 2011. *Surface characterization, collagen adsorption and cell behaviour on poly(L-lactide-co-glycolide).* Acta Bioeng. Biomech. 13, 63-75.

ANDERSON J. M., 2006. *The future of biomedical materials.* J. Mater. Sci. Mater. Med. 17, 1025-1028.

ANDERSON J. M., DEFIFE K., MCNALLY A., COLLIER T., JENNY C., 1999. *Monocyte, macrophage and foreign body giant cell interactions with molecularly engineered surfaces.* J. Mater. Sci. Mater. Med. 10, 579-588.

BŁAŻEWICZ S., STOCH L., 2003. *Biomateriały. Tom 4.* PAN, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT., Warszawa.

BŁAŻEWICZ S., CHŁOPEK J., BŁAŻEWICZ M., PAMUŁA E., 2003. *Biomateriały węglowe i kompozytowe.* [W:] *Biomateriały. Tom 4.* BŁAŻEWICZ S., STOCH L. (red). PAN, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT., Warszawa, 99-256.

DEMIR E., BURGUCU D., TURNA F., AKSAKAL S., KAYA B., 2013. *Determination of TiO2, ZrO2, and Al2O3 nanoparticles on genotoxic responses in human peripheral blood lymphocytes and cultured embyronic kidney cells.* J. Toxicol. Environ. Health. A. 76, 90-102.

DZIADEK M., STODOLAK-ZYCH E., CHOLEWA-KOWALSKA K., 2017. *Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review.* Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 71, 1175-1191.

EVANS S. L., GREGSON P. J., 1998. *Composite technology In load-bearing orthopaedic implants.* Biomaterials 19, 1329-1342.

FARZIN A., AHMADIAN M., FATHI M. H., 2013. *Comparative evaluation of biocompatibility of dense nanostructured and microstructured Hydroxyapatite/Titania composites.* Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 33, 2251-2257.

GARY B., BILAL M. S., CARLS M. M., 2006. *Biomaterials: A primer for surgeons.* Semin. Pediatr. Surg. 15, 276-283.

GHOLIPOURMALEKABADI M., MOZAFARI M., BANDEHPOUR M., SALEHI M., SAMENI M., CAICEDO H. H., MEHDIPOUR A., HAMIDABADI H. G., SAMADIKUCHAKSARAEI A., GHANBARIAN H., 2015. *Optimization of nanofibrous silk fibroin scaffold as a delivery system for bone marrow adherent cells: in vitro and in vivo studies.* Biotechnol. Appl. Biochem. 62, 785-794.

GIBON E., AMANATULLAH D. F., LOI F., PAJARINEN J., NABESHIMA A., YAO Z., HAMADOUCHE M., GOODMAN S. B., 2016. *The biological response to orthopaedic implants for joint replacement: Part I: Metals.* J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. doi: 10.1002/jbm.b.33734.

GOGOLEWSKI S., 2003. *Biomateriały polimerowe.* [W:] *Biomateriały. Tom 4.* BŁAŻEWICZ S., STOCH L. (red). PAN, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT., Warszawa, 257-330.

GOŁĄB J., JAKÓBISIAK M., LASEK W., STOKŁOSA T., 2014. *Immunologia.* PWN, Warszawa.

GOŁĘBIEWSKI J., GIBAS E., MALINOWSKI R., 2008. *Wybrane polimery biodegradowalne-otrzymywanie, właściwości, zastosowanie.* Polimery 53, 11-12.

HEINO J., 2007. *The collagen family members as cell adhesion proteins.* Bioessays 29, 1001-1010.

HENCH L. L., 1991. *Bioceramics: from concept to clinics.* J. Am. Ceram. Soc. 74, 1487-1510.

JHUNJHUNWALA S., ARESTA-DASILVA S., TANG K., ALVAREZ D., WEBBER M. J., TANG B. C., LAVIN D. M., VEISEH O., DOLOFF J. C., BOSE S., VEGAS A., MA M., SAHAY G., CHIU A., BADER A., LANGAN E., SIEBERT S., LI J., GREINER D. L., NEWBURGER P. E., VON ANDRIAN U. H., LANGER R., ANDERSON D. G., 2015. *Neutrophil responses to sterile implant materials.* PLoS One. 10 doi: 10.1371.

KADLER K. E., BALDOCK C., BELLA J., BOOT-HANDFORT R. P., 2007. *Collagenes at a glance.* J. Cell Sci. 120, 1955-1958.

KIRKPATRICK C. J., WAGNER M., KOHLER H., BITTINGER F., OTTO M., KLEIN C. L., 1997. *The cell and molecular biological approach to biomaterial research: a perspective.* J. Mater. Sci. Mater. Med. 8, 131-141.

KOLACZKOWSKA E., 2002. *Shedding light on vascular permeability during peritonitis: role of mast cell histamine versus macrophage cysteinyl leukotrienes.* Inflamm. Res. 51, 519-521.

KOLACZKOWSKA E., CHADZINSKA M., SCISLOWSKA-CZARNECKA A., PLYTYCZ B., OPDENAKKER G., ARNOLD B., 2006. *Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis.* Immunobiol. 211, 137-148.

KOLACZKOWSKA E., KOZIOL A., PLYTYCZ B., ARNOLD B., OPDENAKKER G., 2009. *Altered apoptosis of inflammatory neutrophils in MMP-9-deficient mice is due to lower expression and activity of caspase-3.* Immunol. Lett. 22, 73-82.

KOŁACZKOWSKA E., 2007. *Zapalenie (ostre) jako reakcja korzystna dla organizmu – historia badań a najnowsze osiągnięcia.* Kosmos 1-2, 27-38.

KOŁACZKOWSKA E., KUBES P., 2013. *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.* Nat. Rev. Immunol. 13, 159-175.

KOTAS M. E., MEDZHITOV R., 2015. *Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility.* Cell 160, 816-827.

LANGER R., VACANTI J. P., 1993. *Tissue engineering.* Science 260, 920-926.

LEIFER C. A, MEDVEDEV A. E., 2016. *Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling.* J. Leukoc. Biol. 100, 927-941.

LIN J. J., LIN W. C., LI S. D., LIN C. Y., HSU S. H., 2013. *Evaluation of the antibacterial activity and biocompatibility for silver nanoparticles immobilized on nano silicate platelets.* ACS Appl. Mater. Interfaces 5, 433-443.

LIU X., MA P. X., 2004. *Polymeric scaffolds for bone tissue engineering.* Ann. Biomed. Eng. 32, 477-486.

MAJNO G., JORIS I., 2004 *Cells, tissue and disease.* Blackwell Science, Oxford, London.

MALLA N., SJOLI S., WEINBERG J. O., HADLER-OLSEN E., UHLIN-HANSEN L., 2008. *Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes.* Connect. Tissue. Res. 49, 180-184.

MARCINIAK J., 2003. *Biomateriały metaliczne.* [W:] *Biomateriały. Tom 4.* BŁAŻEWICZ S., STOCH L. (red). PAN, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa, 5-98.

MORITA H., SAITO H., MATSUMOTO K., NAKAE S., 2016. *Regulatory roles of mast cells in immune responses.* Semin. Immunopathol. 38, 623-629.

MRÓZ W., JEDYŃSKI M., BURDYŃSKA S., PROKOPIUK A., ŚLÓSARCZYK A., MENASZEK E., ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA A., ŁĄCZKA M., CHOLEWA-KOWALSKA K., NIEDZIELSKA A., 2008. *Comparative study of hydroxyapatite and hydroxyapatite mixed with bioglass coatings of metallic implants, deposited by PLD method.* Eng. Biomat. 81-84, 121-123.

MRÓZ W., BOMBALSKA A., BUDNER B., BURDYŃSKA S., JEDYŃSKI M., PROKOPIUK A., MENASZEK E., ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA A., NIEDZIELSKA A., NIEDZIELSKI K., 2010. *Comparative study of hydroxyapatite and octacalcium phosphate coatings deposited on metallic implants by PLD method.* Appl Phys A Mater Sci. Proc. 101, 13-16.

NAWROTEK K., TYLMAN M., DECHERCHI P., MARQUESTE T., RUDNICKA K., GATKOWSKA J., WIECZOREK M., 2016. *Assessment of degradation and biocompatibility of electrodeposited chitosan and chitosan-carbon nanotube tubular implants.* J. Biomed. Mater. Res. A 104, 2701-2711.

OPDENAKKER G., VAN DEN STEEN P. E., DUBOIS B., NELISSEN I., VAN COILLIE E., MASURE S., PROOST P., VAN DAMME J., 2001. *Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology.* J. Leukoc. Biol. 69, 851-859.

PAMULA E., DOBRZYNSKI P., BERO M., PALUSZKIEWICZ C., 2004. *How microstructural factors influence in vitro and in vivo degradation of poly(glycolide-co-L-lactide).* Eng. Biomat. 38-43, 22-27.

PAMULA E., SCISLOWSKA-CZARNECKA A., SZLEK A., CHADZINSKA M., DOBRZYNSKI P., PLYTYCZ B., 2006. *Chemical modification of poly(glycolide-caprolactone) and its impact on adhesion and viability of fibroblast in vitro.* Eng. Biomat. 58-60, 24-28.

PŁYTYCZ B., CHADZIŃSKA M., 2016. *Hodowla tkanek w immunologii* [W:] *Hodowla komórek i tkanek.* STOKŁOSOWA S. (red). Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 187-216.

PTAK W., PTAK M., PŁYTYCZ B., 2003. *Co rozpoznaje układ immunologiczny? Na drodze do nowego paradygmatu.* Kosmos 52, 149-156.

SABIR M., XU X., LI L., 2009. *A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications.* J. Mater. Sci. Mater. Med. 44, 5713-5724.

SCHARNWEBER D., BEUTNER R., ROSSLER S., WORCH H., 2002. *Electrochemical behavior of titanium-based materials are there relations to biocompatibility.* J. Mater. Sci. Mater. Med. 13, 1215-1220.

SCHATZKER J., 1996. *Osteosynthesis in trauma.* Int. J. Orthop. Sci 20, 244-252.

SCISLOWSKA-CZARNECKA A., MENASZEK E., KOLACZKOWSKA E., JANUS M., STYPUŁA B., 2008. *The effect of titanium alloy modified with a-C:N:H and a-SiCxNy(H) coatings on adhesion and immune response of human osteoblast-like MG-63 cells.* Eng. Biomat. 81-84, 126-128.

SCISLOWSKA-CZARNECKA A., MENASZEK E., SZARANIEC B., KOLACZKOWSKA E., 2012a. *Ceramic modifications of porous titanium: effects on macrophage activation.* Tissue Cell 44, 391-400.

SCISLOWSKA-CZARNECKA A., PAMULA E., TLALKA A., KOLACZKOWSKA E., 2012b. *Effects of aliphatic polyesters on activation of the immune system: studies on macrophages.* J. Biomat. Sci. Polym. E. 23, 715-738.

SCISLOWSKA-CZARNECKA A., PAMULA E., KOLACZKOWSKA E., 2013. *Biocompatibility evaluation of glycolide-containing polyesters in contact with osteoblasts and fibroblasts.* J. App. Polym. Sci. 127, 3256-3268.

SIKORA E., 2014. *Starzenie i długowieczność.* Post. Biochem. 60, 125-137.

SIPE J. D., 2002. *Tissue engineering and reparative medicine.* Ann. NY Acad. Sci. 961, 1-9.

SZMIGIEL D., DOMANSKI K., PROKARYN P., GRABIEC P., PAMULA E., SCISLOWSKA-CZARNECKA A., PLYTYCZ B., 2006. *Plasma treated polysiloxane coating for medical implants.* Eng. Biomat. 58-60, 206-209.

SZMIGIEL D., HIBERT C., BERTSH A., PAMUŁA E., DOMAŃSKI K., GRABIEC P., PROKARYN P., ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA A., PŁYTYCZ B., 2008. *Fluorine-based plasma treatment of biocompatible silicone elastomer: the effect of temperature on etch rate and surface properties.* Plasma Process Polym. 5, 246-255.

ŚLÓSARCZYK A., 2003. *Biomateriały ceramiczne.* [W:] *Biomateriały. Tom 4.* BŁAŻEWICZ S., STOCH L. (red). PAN, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT., Warszawa, 99-256.

THOMSEN P., GRETZER C., 2001. *Macrophage interactions with modified material surfaces.* Curr. Opin. Solid. St. M. 5, 163-176.

UYANIK B., GRIGORASH B. B., GOLOUDINA A. R., DEMIDOV O. N., 2017. *DNA damage-induced phosphatase Wip1 in regulation of hematopoiesis, immune system and inflammation.* Cell Death Discov. 3, doi:10.1038/cddiscovery.2017.18

VALLET-REFI M., GONZALES-CALBET J. M., 2004. *Calcium phosphates as substitution of bone tissues.* Progr. Solid State Chem. 32, 1-31.

VAN RIJT S., HABIBOVIC P., 2017. *Enhancing regenerative approaches with nanoparticles.* J. R. Soc. Interface. doi: 10.1098/rsif.2017.0093.

WALSH W. R., SVEHLA M. J., RUSSEL J., SAITO M., NAKASHIMA T., GILLIES R. M., BRUCE W., HORI R., 2004. *Cemented fixation with PMMA or bis-GMA resin hydroxyapatite cement: effect of implant surface roughness.* Biomaterials 25, 4929-4934.

WILLIAMS D. F., 2008. *On the mechanisms of biocompatibility.* Biomaterials 29, 2941-2953.

YAMAGUCHI M., TOSHIRO S., KANAMORI T., WANG P., NIWA M., KAWAKAMI H., NAGAOKA S., HIRAKAWA K., KAMIYA M., 2004. *Surface modification of poly(l-lactic acid) affects initial cell attachment,*

cell morphology, and cell growth. J. Artif. Organs 7, 187-193.
YUNUS BASHA R., SAMPATH KUMAR T.S., DOBLE M., 2015. *Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration.* Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 57, 452-463.

KOSMOS Vol. 66, 4, 677–689, 2017

ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA[1], ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA[2]

[1]Department of Physiotherapy, University of Physical Education in Krakow, al. Jana Pawła II 78, 31-571 Kraków, [2]Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Kraków, E-mail: scis@poczta.onet.pl

HOW TO PROTECT BIOMATERIALS FROM THE IMMUNE SYSTEM?

Summary

Biocompatibility verification is required prior to implantation of any biomaterial into human body. This involves verification of its cytotoxic and carcinogenic effects, and confirmation of (only) weak activation of the immune system. A substantial number of biomaterials is currently used in medical procedures, however, many of them do not fulfill all biocompatibility requirements. Therefore nowadays materials aimed for medical application are being modified to improve their characteristics, and thus "hide" them more efficiently from the immune system. One of the most common, yet undesirable, responses to biomaterial/implant is inflammation. Because of this, numerous studies focus on immune cells and strategies to modify biomaterials in such ways that they induce only weak or mild, and short-lasting, activation of leukocytes. It has been documented that three approaches in particular are efficient in this regard – surface modification by its covering with biological substances/proteins, modification of surface porosity and addition of nanoparticles. Herein we described types of biomaterials, strategies of their modification and biomaterial impact on leukocytes. In particular, we focus on strategies used to minimize activation of the immune response.

Key words: biocompatibility, biomaterials, bone defects, inflammation, immune response, leukocytes