

POD REDAKCJĄ

Joanny Wessely-Szponder

Dominiki Osmęckiej

Aleksandry Domańskiej

Biomateriały nadzieją przyszłości

Tom I



Biomateriały nadzieją przyszłości

Tom I

Pod redakcją
Joanny Wessely-Szponder
Dominiki Osmęckiej
Aleksandry Domańskiej



Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Lublin 2024

Recenzent
dr hab. inż. Ewa Stodolak-Zych, prof. AGH

Opracowanie redakcyjne
Agnieszka Brach

Projekt graficzny, skład i łamanie
Małgorzata Grzesiak

Projekt okładki
Anna Sz wajgier

©Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie – Wydawnictwo, Lublin 2024

ISBN 978-83-7259-422-8 on-line
<https://doi.org/10.24326/mon.2024.2>



Ten utwór jest dostępny na licencji
Creative Commons Uznanie autorstwa – Na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowe

Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
<https://up.lublin.pl/nauka/wydawnictwo>
Ark. wyd. 5,1

Wykaz użytych skrótów

ACS, ang. autologous conditioned serum, autologiczna kondycjonowana surowica

ADAMT, ang. a disintegrin and metalloproteinase, motywy trombospondynopodobne

AMP, ang. antimicrobial peptides, peptydy przeciwdrobnoustrojowe

APS, ang. autologous protein, autologiczny roztwór białka

BMAP, ang. bovine myeloid antimicrobial peptide, bydlęcy mieloidalny peptyd przeciwdrobnoustrojowy

ChZS, choroba zwyrodnieniowa stawów

CNT, ang. carbon nanotubes, nanorurki węglowe

DAMP, ang. damage-associated molecular patterns, wzorce molekularne związane z uszkodzeniami

DMEM, ang. Dulbecco's modified eagle medium, płyn hodowlany

ECM, ang. extracellular matrix, macierz pozakomórkowa

EGF, ang. epidermal growth factor, naskórkowy czynnik wzrostowy

FBR, ang. foreign body response, reakcja na ciało obce

HA, ang. hyaluronic acid, kwas hialuronowy

HDP, ang. host defense peptides, peptydy odpornościowe

IFN, interferon

IGF, ang. insulin like growth factor, insulinopochodny czynnik wzrostowy

IL, interleukina

L-PRP, ang. leukocyte and platelet-rich plasma, bogate w leukocyty PRP

MDR, ang. multidrug-resistant, wielolekooporne

MMP, ang. matrix metalloproteinases, metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej

mRNA, ang. messenger ribonucleic acid, informacyjny kwas rybonukleinowy

MSC, ang. mesenchymal stem cells, mezenchymalne komórki macierzyste

NGF, ang. nerve growth factor, czynnik wzrostu nerwów

NO, ang. nitric oxide, tlenek azotu

OA, łac. osteoarthritis, zwyrodnieniowa choroba stawów

OUN, ośrodkowy układ nerwowy

PDGF, ang. platelet derived growth factor, płytkopochodny czynnik wzrostowy

PEG, ang. polyethylene glycol, glikol polietylenowy

PF, ang. proline-phenylalanine-rich prophenin, profenina

PGA, ang. polyglycolide, poliglikolid

PG, ang. cysteine-rich protegrin, protegryna

PHB, poli-3-hydroksybutyren

PHEMA, poli(2-hydroksyetylo metakrylan)

PL, ang. platelet lysate, lizat płytek

PLA, polilaktyd

PLGA, ang. poly lactic-co-glycolic acid, kopolimer laktydu z glikolidem

PPP, ang. platelet-poor plasma, osocze ubogopłytkowe

PR-39, ang. proline-arginine-rich peptide 39, PR-39

PRP, ang. platelet-rich plasma, osocze bogatopłytkowe

PRR, ang. pattern recognition receptors, receptory rozpoznawania wzorców

PTOA, ang. posttraumatic osteoarthritis, pourazowa choroba zwyrodnieniowa stawów

PURE-PRP, ubogie w leukocyty PRP

qPCR, ang. quantitative polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

RAGE, ang. receptor for advanced glycation endproducts, receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji

ROS, ang. reactive oxygen species, reaktywne formy tlenu

TGF- β 1, ang. transforming growth factor β 1, transformujący czynnik wzrostowy β 1

TLR, ang. toll-like receptors, receptory toll-like

TNF- α , ang. tumor necrosis factor α , czynnik martwicy nowotworu α

VEGF, ang. vascular endothelial growth factor, czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

Spis treści

Przysłość produktów krwiopochodnych w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów	7
<i>Joanna Wessely-Szponder</i>	
Wpływ hydroksyapatytu na aktywność neutrofili izolowanych z krwi ludzkiej	18
<i>Beata Drzewiecka, Dominika Osmęcka, Joanna Wessely-Szponder, Tomasz Szponder, Dominika Nguyen Ngoc</i>	
Wpływ produktów krwiopochodnych na odpowiedź makrofagów na implant z powłoką Si-DLC na modelu owczym	23
<i>Bartłomiej Szymczak, Dominika Nguyen Ngoc, Joanna Wessely-Szponder, Tomasz Szponder, Beata Drzewiecka</i>	
Biomateriały stosowane w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów	29
<i>Aleksandra Domańska, Agata Bukala, Joanna Wessely-Szponder, Tomasz Szponder, Dominika Nguyen Ngoc, Beata Drzewiecka, Aleksandra Kozera, Katarzyna Krać</i>	
Korozja biomateriałów metalicznych	35
<i>Sandra Podwysocka, Wiktoria Rudczyk, Joanna Wessely-Szponder, Tomasz Szponder, Dominika Nguyen Ngoc, Beata Drzewiecka</i>	
Biomateriały stosowane w regeneracji nerwów obwodowych	40
<i>Natalia Gosiewska, Paulina Gajewska</i>	
Zastosowanie hydrożeli w farmacji i medycynie	46
<i>Karolina Pniaczek, Małgorzata Kowalczyk, Joanna Wessely-Szponder, Tomasz Szponder, Beata Drzewiecka, Dominika Nguyen Ngoc</i>	
Badanie biogodności biomateriałów	50
<i>Wiktoria Pochwała, Joanna Wessely-Szponder, Tomasz Szponder, Dominika Nguyen Ngoc, Beata Drzewiecka</i>	
Zagrożenia dla organizmu wywołane biofilmem bakteryjnym na biomateriałach	56
<i>Antonina Krawczyk, Dominika Nguyen Ngoc</i>	

Aktywność neutrofili izolowanych z krwi świń po stymulacji hydroksyapatytem oraz ekstraktem neutrofilowym	64
<i>Aleksandra Kozera, Katarzyna Krać, Joanna Wessely-Szponder, Tomasz Szponder, Beata Drzewiecka, Dominika Nguyen Ngoc</i>	
The future of orthopedics in the hands of biomaterial	68
<i>Julia Matczyszyn</i>	
Biokompozyt FlexiOss® przyszłością medycyny regeneracyjnej kości	72
<i>Wiktoria Muszak, Aleksandra Pyzerska, Dominika Nguyen Ngoc, Joanna Wessely-Szponder, Beata Drzewiecka, Bartłomiej Szymczak</i>	
Porcine neutrophil cathelicidins: promising molecules against bacterial resistance	77
<i>Eric Fernández-De La Cruz, Joanna Wessely-Szponder, Paula Espinal, Ester Fusté, Miquel Viñas</i>	

Przyszłość produktów krwiopochodnych w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów

Joanna Wessely-Szponder 

Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
e-mail: joanna.wessely@up.lublin.pl

Streszczenie

Choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS) jest przewlekłą, postępującą, wieloczynnikową chorobą powodującą postępującą utratę struktury i funkcji chrząstki stawowej, która najczęściej występuje u pacjentów w średnim i starszym wieku. Choroba ta, zwłaszcza w zaawansowanych stadiach, wiąże się z utratą macierzy pozakomórkowej, chrząstki i ze zmniejszeniem liczby komórek w obrębie macierzy. Zarówno humoralne, jak i komórkowe mediatory odpowiedzi immunologicznej przyczyniają się do destrukcji chrząstki, nieprawidłowej przebudowy kości, zapalenia błony maziowej i wysięku stawowego. Tradycyjne metody leczenia ChZS ograniczają się do zmniejszenia objawów choroby i poprawiania jakości życia pacjenta, ale żadna z nich nie może odwrócić uszkodzenia stawu, a ich stosowanie wiąże się z dużą częstością występowania działań niepożądanych. Różne produkty krwiopochodne stały się nowymi i atrakcyjnymi terapeutykami ze względu na wysoką zawartość produktów przyspieszających gojenie tkanek. Istotne znaczenie mają stosowane już dostawowo koncentraty płytkopochodne. Należą do nich osocze bogatopłytkowe (PRP), lizat płytek (PL), autologiczna kondycjonowana surowica (ACS), autologiczny roztwór białka (APS) oraz hiperostra surowica HAS. Spośród produktów krwiopochodnych PRP jest najbardziej znanym i stosowanym od dawna preparatem o najszerszym zastosowaniu. W niniejszej pracy omówiono egzosomy pochodzące z różnych komórek jako obiecujące narzędzie zarówno diagnostyczne, jak i terapeutyczne w ChZS.

Opracowanie zawiera zestawienie podstawowych informacji o występowaniu i przyczynach powstawania choroby zwyrodnieniowej stawów u ludzi i zwierząt, elementy patogenezы tego zaburzenia, a także opis wybranych metod leczniczych opartych na preparatach krwiopochodnych, które mogą stanowić uzupełnienie dotychczas stosowanych metod.

Wstęp

Choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS), nazywana również osteoarthritis, jest przewlekłą, postępującą chorobą o złożonej, wieloczynnikowej etiologii. Powoduje postępującą utratę struktury i funkcji chrząstki stawowej, zwłaszcza u pacjentów w średnim i starszym wieku. Jest ona uważana za jedną z najczęstszych chorób narządu ruchu, dotyczącą stawów kolanowych, biodrowych czy nadgarstka, oraz jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności. Na to zaburzenie stawowe cierpią miliony ludzi na całym świecie [Manoto i in. 2018]. Choroba zwyrodnieniowa stawów jest wynikiem postępującego i ciągłego niszczenia chrząstki stawowej z różnych przyczyn: pierwotnych i wtórnych. Głównymi objawami klinicznymi są przewlekły ból, niestabilność stawów, sztywność i zwężenie szpar stawowych potwierdzone badaniem radiologicznym. Chociaż ChZS dotyczy głównie osób starszych, urazy związane ze sportem mogą prowadzić do pourazowej choroby zwyrodnieniowej stawów (PTOA) niezależnie od wieku. Wykazano, że pomimo starannej opieki pooperacyjnej PTOA występuje u 20–50% pacjentów [Chen i in. 2017, Chaney i in. 2022, Szponder i in. 2022].

Choroba zwyrodnieniowa stawów jest również poważnym problemem w medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza u koni i psów, występującym w postaci zmian zwyrodnieniowych stawu biodrowego [Alves i in. 2021]. Z danych literaturowych wynika, że aż 20% psów powyżej pierwszego roku życia wykazuje pewien stopień zwyrodnienia stawów. Choroba dotyczy też znaczącej populacji koni, zwłaszcza osobników w starszym wieku [Alves i in. 2021, McIlwraith i in. 2012, McIlwraith i in. 2018, Lieberthal i in. 2015, Munday i in. 2017].

Zmiany w kości podchrzęstnej i błonie maziowej są integralnymi składnikami zespołu klinicznego ChZS. Zmiany w obrębie chrząstki stawowej korespondują ze zmianą wskaźników biochemicznych i wiążą się z utratą macierzy zewnątrzkomórkowej, utratą chrząstki oraz zmniejszeniem liczby komórek w macierzy, zwłaszcza w dalszych stadiach choroby [Clegg i in. 2003, de Souza i in. 2016, Feng i in. 2020]. Pomimo że wyodrębniono liczne czynniki ryzyka związane z ChZS – w tym predyspozycje genetyczne, starzenie się i otyłość – patogenezę tej choroby pozostaje w dużej mierze niejasna. Postępujące zmiany w obrębie tkanki doprowadzają do niszczenia chrząstki stawowej i kości podchrzęstnej, co prowadzi do postępującej niepełnosprawności ruchowej i wystąpienia objawów bólowych [Clegg i in. 2003, de Souza i in. 2016, Feng i in. 2020, Calvo i in. 2021].

Obecnie konwencjonalne leczenie ChZS polega głównie na łagodzeniu bólu, zmniejszaniu sztywności stawów, utrzymaniu sprawności funkcjonalnej oraz poprawie jakości życia [Xia i in. 2014]. Pomimo dużego wpływu socjoekonomicznego ChZS dostępne opcje terapeutyczne są minimalne. Na tę chwilę nie ma skutecznego leczenia regenerującego tkanki stawowe, a terapia ChZS ogranicza się do łagodzenia objawów do czasu chirurgicznej wymiany stawu [Calvo i in. 2021]. Dlatego włożono ogromny wysiłek we wprowadzenie skuteczniejszych strategii

opartych na osiągnięciach medycyny regeneracyjnej, stanowiącej dynamicznie rozwijającą się gałąź zarówno medycyny, jak i weterynarii.

Patomechanizm choroby zwyrodnieniowej stawów

W warunkach fizjologicznych takie elementy, jak łąkotka, chrząstka stawowa, kość podchrzęstna i błona maziowa, zapewniają wystarczające wsparcie dla zdrowego stawu. Łąkotka zapewnia kilka funkcji, w tym przenoszenie obciążenia i amortyzację. Struktura ta składa się głównie z wody i składników macierzy pozakomórkowej (ECM), takich jak kolagen i proteoglikany. Chrząstka stawowa zapewnia powierzchnię ruchomą stawu maziowego, złożoną głównie z proteoglikanów i kolagenu typu II. Głównym składnikiem kości podchrzęstnej jest natomiast zmineralizowany kolagen typu I. Błona maziowa (maziówka) wytwarza płyn maziowy złożony z lubrycyny i kwasu hialuronowego (HA), który smaruje staw i odżywia chrząstkę stawową. Błona maziowa składa się z dwóch rodzajów synowiotów: aktywowanych makrofagów i fibroblastów, które wytwarzają składniki mazi stawowej [Kuyinu i in. 2016, Szponder i in. 2022].

Stwierdzono, że pewne nieprawidłowości w funkcjonowaniu tych składników nasilają ChZS [Kuyinu i in. 2016]. Stan ten charakteryzuje się zmianami w chrząstce, kości, błonie maziowej, płynie maziowym, więzadłach, ścięgnach i torebce stawowej [Little i Smith 2008, Cohen-Solal i in. 2013]. We wczesnych stadiach choroby powierzchnia chrząstki pozostaje nienaruszona z powodu nasilonych mechanizmów kompensacyjnych [Chaney i in. 2022]. Jednak podczas progresji choroby najpierw zmienia się skład chemiczny i organizacja ECM, następnie powtarzające się mechaniczne otarcia prowadzą do zmian zwyrodnieniowych łąkotki z utratą zarówno kolagenu typu I, jak i – co jest znacznie poważniejsze – kolagenu typu II, podczas gdy cytokiny prozapalne zaburzają homeostazę macierzy chrząstki. Tym samym potwierdzono znaczenie mechanizmu zapalnego w początkowych stadiach choroby [Kuyinu i in. 2016].

Układ odpornościowy odgrywa kluczową rolę w patomechanizmie rozwoju ChZS. Zarówno humoralne, jak i komórkowe mediatory przyczyniają się do destrukcji chrząstki, nieprawidłowej przebudowy kości, zapalenia błony maziowej i wysięku stawowego. Istotne znaczenie w tym procesie ma wrodzony układ odpornościowy aktywowany przez endogenne cząsteczki nazwane wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniami (DAMP). Są to produkty uszkodzenia ECM, alarminy, wolne kwasy tłuszczowe i szczątki martwych komórek. DAMP aktywują wrodzony układ odpornościowy poprzez interakcję z receptorami rozpoznawania wzorców (PRR), takimi jak receptory toll-like (TLR), zwłaszcza TLR2 i TLR4, pośredniczące w reakcjach katabolicznych, oraz receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE) obecny na powierzchni

komórki układu odpornościowego. Ponadto we wczesnych stadiach ChZS zaangażowany jest układ dopełniacza. Uwolnione wówczas produkty indukują apoptozę chondrocytów lub powodują wytwarzanie przez nich enzymów degradujących macierz, mediatory prozapalne i dalsze efekторы dopełniacza, które sprzyjają uszkodzeniu stawów [Hached i in. 2017, Szponder i in. 2022].

Ocena uwalniania cytokin i chemokin zaangażowanych w progresję ChZS ujawniła zwiększoną ekspresję interleukin IL-1, IL-6 i IL-8. Mediatory te działają zarówno autokrynnie, jak i parakrynnie. Pobudzają makrofagi i chondrocyty do uwalniania proteaz i eikozanoidów, takich jak prostaglandyny i leukotrieny, a także do wytwarzania NO. Ponadto działanie to w chrząstce indukuje procesy kataboliczne, hamuje syntezę macierzy i zwiększa apoptozę [Abramson i Attur 2009, Szponder i in. 2022].

W prawidłowej dojrzałej chrząstce chondrocyty bardzo powoli syntetyzują składniki macierzy. Podczas choroby zwyrodnieniowej stawów przerostowe chondrocyty tracą zdolność tworzenia nowej macierzy chrząstki. W rezultacie kość podchrzęstna ulega nieprawidłowej przebudowie na styku między kością a zwapniałą chrząstką. Uwolnione metaloproteinazy (MMP) degradują macierz, a tym samym chrząstkę stawową. Prowadzi to do powstawania torbieli podchrzęstnych i osteofitów, które korygują niestabilność stawów spowodowaną chorobą. Stwardnienie podchrzęstne jest kolejnym skutkiem tej nieprawidłowej przebudowy kości, która może wystąpić na późnym etapie procesu chorobowego lub powodować zmiany zwyrodnieniowe [Yunus i in. 2020].

Uwalnianie niektórych produktów, m.in. cytokin, takich jak IL-1, IL-4, IL-9, IL-13 i TNF- α , enzymów degradujących, takich jak dezintegryna, motywy trombospondynopodobne (ADAMT) i MMP, przez chondrocyty, osteoblasty i synowocyty wyzwała te procesy [Kuyinu i in. 2016]. Wytwarzanie IL-1 przez stymulowane chondrocyty indukuje syntezę metaloproteinaz MMP-1, MMP-3 oraz MMP-13 i jednocześnie hamuje syntezę kluczowych składników ECM, takich jak proteoglikany, agrekan i kolagen typu II. Towarzyszy temu nasilenie uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), IL-6 i IL-8, co zwiększa efekty rozpadu macierzy chrząstki w kaskadzie katabolicznej, dodatkowo stymulując niszczenie chondrocytów stawowych [Yunus i in. 2020].

Wcześniej opisywano ChZS jako proces związany z miejscową reakcją zapalną. Ostatnie badania wskazują jednak na to, że procesy zapalne w stawach znajdują odzwierciedlenie w osoczu i krążących neutrofilach, potwierdzając ogólnoustrojowy proces zapalny u pacjentów z ChZS oraz w modelu z chorobą zwyrodnieniową u królików. Dlatego ChZS należy uznać za układową chorobę układu mięśniowo-szkieletowego [Malemud 2015, Berenbaum i in. 2013, Englund i in. 2016, Wessely-Szponder i in. 2020].

Wykazano, że również monocyty biorą udział w aktywacji kości podchrzęstnej i błony maziowej w patogenezie ChZS. Cytokiny i chemokiny uwalniane przez

monocyty występują w zwiększonym stężeniu w płynie maziowym stawów objętych chorobą. W modelach zwierzęcych ograniczenie liczebności w błonie maziowej makrofagów pochodzących z monocytów zmniejsza tworzenie się osteofitów i niszczenie chrząstki. Dane te sugerują, że monocyty, osteoklasty pochodzące z monocytów i makrofagi błony maziowej współuczestniczą w patogenezie ChZS. Zatem zmniejszenie aktywacji monocytów i ich migracji do stawów może być korzystne w terapii przyczynowej [Loukov i in. 2018, Szponder i in. 2022].

Osteoklasty pochodzące z rekrutowanych monocytów w odpowiednim mikrośrodkowisku mogą przyczyniać się do degradacji chrząstki stawowej. Komórki te uwalniają czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), TNF- α , IL-1b, IL-6 i chemokiny, stymulując unaczynienie błony maziowej i rekrutację krążących leukocytów. Migrujące monocyty, które różnicują się w makrofagi maziowe, są odpowiedzialne za pogrubienie błony maziowej. Składniki płynu maziowego mogą dodatkowo aktywować kość podchrzęstną poprzez zmiany kostno-chrzęstne [Loukov i in. 2018, Szponder i in. 2022].

Przerost chondrocytów opisano w ChZS zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Zmiany te odgrywają kluczową rolę w rozwoju choroby, zwłaszcza w niszczeniu chrząstki za pośrednictwem proteaz. Ponadto te zmiany funkcji chondrocytów i towarzysząca im degradacja chrząstki są zaangażowane w mechanizm błędnego koła wzmagający chorobę [van der Kraan i van den Berg 2012]. Największy jednak wpływ na degradację chrząstki mają neutrofile obecne w płynach maziowych pacjentów cierpiących na choroby reumatyczne. W zapaleniu stawów neutrofile atakują przestrzeń stawową i uwalniają różne produkty uszkodzające chrząstkę, takie jak reaktywne formy tlenu (ROS) i uwalniane enzymy proteolityczne [Schiller i in. 2000]. Ponadto niektóre produkty neutrofilii znacząco przyczyniają się do rozwoju zapalenia stawów, bólu i neuropatii obwodowej, co sugeruje ich potencjał, gdy są traktowane jako cele terapeutyczne [Muley i in. 2017, Wessely-Szponder i in. 2020, Zdziennicka i in. 2021a].

Makrofagi są uznawane za kluczowe komórki w chorobach stawów związanych z zapaleniem. W zależności od fenotypu makrofagi M1 lub M2 mogą działać jako komórki pro- bądź przeciwzapalne. W obecności interferonu (IFN) makrofagi ulegają polaryzacji w kierunku fenotypu prozapalnego M1 z uwalnianiem TNF- α i IL-1b. Działanie to prowadzi do zaostrzenia procesu zapalnego i zniszczenia chrząstki. Podczas wczesnych procesów zapalnych zaobserwowano progresję ChZS, co doprowadziło do opracowania nowych strategii terapeutycznych opartych na stymulacji prawidłowej przeciwzapalnej odpowiedzi komórkowej w celu zapobiegania destrukcji chrząstki [Hached i in. 2017]. Ostatnio przeprowadzono badania nad możliwością modyfikacji makrofagów *in vitro* po stymulacji produktami krwiopochodnymi, takimi jak AMP, PRP i mikropecherzyki. Uzyskane wyniki są obiecujące i możliwe do ekstrapolacji na zastosowanie kliniczne po badaniach klinicznych [Zdziennicka i in. 2021a, Zdziennicka i in. 2021b, Wessely-Szponder i in. 2022].

Aktualnie stosowane terapie regeneracyjne oparte na produktach krwiopochodnych

Tradycyjne metody leczenia ChZS ograniczają się do zmniejszenia objawów choroby i poprawiania jakości życia pacjenta, ale żadna z nich nie może odwrócić uszkodzenia stawu, a ich stosowanie wiąże się z dużą częstością występowania działań niepożądanych. Trwają badania nad nowymi terapiami o większej skuteczności i mniejszej liczbie skutków ubocznych. Jednak leczenie uszkodzonej chrząstki stawowej pozostaje jednym z głównych wyzwań medycyny regeneracyjnej. Należy podkreślić, że terapia regeneracyjna, łącząca osiągnięcia medycyny, inżynierii tkankowej i biologii molekularnej, umożliwia naprawę zniszczonych tkanek w celu przywrócenia ich pierwotnej struktury i funkcji. Obecność komórek, enzymów czy innych czynników biologicznych i/lub komórek macierzystych samych lub osadzonych na materiale indukuje procesy autonaprawcze organizmu/tkanki [Zhang i in. 2016, Manoto i in. 2018].

Różne produkty krwiopochodne stały się nowymi i atrakcyjnymi terapeutami ze względu na wysoką zawartość czynników przyspieszających gojenie tkanek. Istotne znaczenie mają stosowane już dostawowo koncentraty płytkopochodne, do których należą: PRP, PL, ACS, APS oraz surowica HAS. Spośród produktów krwiopochodnych PRP jest najbardziej znanym, stosowanym od dawna, preparatem o najszerszym zastosowaniu [Calvo i in. 2021]. Według definicji PRP jest produktem o istotnie wyższym (zwykle 4–6-krotnie) stężeniu płytek krwi i czynników wzrostu w porównaniu ze stężeniem wyjściowym pacjenta [Richards i in. 2016]. Wspomagające stosowanie PRP dało lepszy efekt gojenia niż niektóre zabiegi chirurgiczne wykonywane samodzielnie [Altan i in. 2014]. Istnieją jednak pewne kontrowersje co do korzyści jego stosowania i może on nie być skuteczny w zatrzymywaniu lub odwracaniu procesu zwyrodnieniowego w stawach. Głównymi wadami są zmienność jego składu spowodowana różnymi technikami wytwarzania oraz uzyskanie odpowiedniej zawartości pożądanых komponentów, zwłaszcza czynników prozapalnych, takich jak fibryna, a także obecność lub brak komórek zapalnych [Calvo i in. 2021].

Należy wspomnieć, że istnieją warianty PRP bogate w leukocyty (L-PRP) i ubogie w leukocyty (PURE-PRP) o różnej zawartości [Zdziennicka i in. 2021b]. Przeciwwzapalna rola PRP została wykazana *in vivo* w modelu zapalenia stawów u świni domowej wywołanego antygenem. Podczas dostawowego wstrzyknięcia PRP późniejsza odpowiedź zapalna została osłabiona. PRP może również poprawić integrację przeszczepu kostno-chrzęstnego na styku chrząstki i zmniejszyć degenerację w modelu królika *in vivo*. Nowa strategia terapeutyczna polega na połączeniu czynników wzrostu i rusztowań 3D wpływających na regenerację tkanek [Zhang i in. 2014]. W przeciwieństwie do tego w L-PRP obecność leukocytów może nasilić reakcję zapalną [Everts i in. 2020, Zdziennicka i in. 2021b].

Lizat płytkowy (PL) jest produktem otrzymywanym w wyniku lizy płytek krwi. Ma on wiele zastosowań, w tym jako substytut surowicy, do wspomagania

gojenia ran oraz inne, wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej. Jego właściwości wspomagające gojenie tkanek są powiązane z wysokim poziomem czynników wzrostu, które oddziałują z receptorami kinazy tyrozynowej, wspierają proliferację komórek i hamują apoptozę. Skład PL jest złożony i obejmuje białko, czynniki wzrostu i sole mineralne, z dużą zawartością immunoglobulin i możliwą obecnością fibrynogenu oraz innych czynników krzepnięcia. Czynniki wzrostu w PL, takie jak płytkopochodny czynnik wzrostowy (PDGF), czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF), transformujący czynnik wzrostowy $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), naskórkowy czynnik wzrostowy (EGF) oraz insulinopochodny czynnik wzrostowy 1 (IGF-1), odgrywają ważną rolę podczas naprawy tkanek [Bari i in. 2018]. Wśród licznych zastosowań PL potwierdzono jego chondroprotektynywny efekt na szczurzym modelu OA [Yan i in. 2019].

Terapeutyczne zastosowanie ACS w formie iniekcji dostawowej wynika z wysokiego stężenia endogennego antagonisty receptora IL-1 (IL-1Ra) oraz cytokin przeciwzapalnych i czynników wzrostu, takich jak TGF- β , PDGF, IGF-1, IL-4 i IL-10. Autologiczna kondycjonowana surowica stymuluje różnicowanie w kierunku chondrocytów w komórkach macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej i przyczynia się do redukcji proliferacji i aktywacji limfocytów *in vitro*. Natomiast w modelu króliczym zmniejszyła tworzenie się osteofitów [Camargo Garbin and Morris 2021].

Kolejnym produktem krwiopochodnym znajdującym szerokie zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jest antagonist receptoru IL-1 w postaci izolowanego z surowicy pacjentów z potwierdzoną ChZS autologicznego roztworu białka (APS). Ponadto preparat ten zawiera liczne substancje o działaniu przeciwzapalnym. U koni z naturalnie występującą ChZS stosowanie APS znacząco przyczyniło się do ograniczenia kulawizny oraz obniżenia zawartości białka w płynie stawowym [Camargo Garbin i Morris 2021].

Oba produkty – ASC i APS – są obiecujące, ponieważ wydają się bezpieczne oraz wykorzystują surowicę pacjenta bogatą w cytokiny i czynniki wzrostu, więc nie generują odpowiedzi immunologicznej. Dlatego mogą okazać się skuteczną opcją w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego [Camargo Garbin i Morris 2021].

Hiperostra surowica (HAS) jest roztworem wolnym od komórek i fibryny, uzyskanym przez odsączenie skrzepów fibrynowych. Roztwór ten zachowuje wysoce regeneracyjne właściwości PRP. Wcześniejsze badania HAS wykorzystywały świeżo wyizolowany preparat, płynną wersję, która – jak udowodniono – indukuje proliferację komórek chondrocytów, mezenchymalnego pnia szpiku kostnego komórek, osteoblastów w hodowli komórkowej oraz w modelu niedokrwienia kości. Ponadto HAS zwiększa żywotność komórek i moduluje odpowiedź zapalną, dlatego można uznać ją za możliwy środek terapeutyczny dla ChZS. Produkcja HAS została zoptymalizowana w celu uzyskania liofilizowanej formy, która silnie wspiera żywotność komórek i ma potencjał modulowania odpowiedzi zapalnej, dlatego może być środkiem terapeutycznym w ChZS [Calvo i in. 2021].

Terapie z zastosowaniem produktów krwiopochodnych mogą być skutecznym alternatywnym sposobem leczenia ChZS, mniej inwazyjnym niż chirurgia i konwencjonalne leczenie [Szponder i in. 2022].

Zastosowanie egzosomów jako perspektywa w leczeniu CHZS

Egzosomy pochodzące z różnych komórek okazały się obiecującym narzędziem zarówno diagnostycznym, jak i terapeutycznym w ChZS. Potwierdzono, że chondrocyty, fibroblasty błony maziowej, osteoblasty i komórki ścięgien mogą wytwarzać i wydzielać egzosomy, które wpływają na funkcjonowanie komórek docelowych, nasilając lub hamując procesy patologiczne w przebiegu choroby. Egzosomy zawierają różne cząstki, w tym cytokiny, lipidy, kwasy nukleinowe. Jedną z wielu funkcji biologicznych egzosomów jest ta, że przenoszą one swoją zawartość pomiędzy różnymi komórkami, przyczyniając się do komunikacji międzykomórkowej. Mogą być w ten sposób wykorzystane do dostarczania leków. Ponadto liczba i zawartość egzosomów może służyć jako biomarker do rozpoznawania i prognozowania ChZS. Na modelu mysim wykazano, że utrzymywały one prawidłową mikrostrukturę chrząstki, spowalniały nieprawidłową angiogenezę kości podchrzęstnej poprzez hamowanie PDGF, hamowały ból i resorpcję kości. Zastosowanie egzosomów pochodzących z ludzkich embrionalnych MSC (hEMSC-exo) spowodowało prawie całkowite wyleczenie uszkodzonych komórek podchrzęstnych kości i chrząstki. Również powierzchnia chrząstki szklistej zmieniła się z szorstkiej i nierównej w gładką i regularną. W badaniach na modelu mysim objętość kości podchrzęstnej zwiększała się, degradacja kości była zmniejszona, a degeneracja mikrostruktury beleczkowej kości podchrzęstnej została zahamowana. Z powyższych względów zwrócono uwagę na doskonały potencjał terapeutyczny egzosomów, które mogą nie tylko zmniejszyć objawy, ale także opóźniają lub nawet odwracają postęp ChZS. Istnieje jednak wiele przeszkód w zastosowaniu egzosomów w praktyce klinicznej. Dlatego konieczna jest optymalizacja strategii ich wykorzystywania w celu poprawy skuteczności terapeutycznej w ChZS i możliwych przyszłych zastosowań terapeutycznych w medycynie regeneracyjnej [Wu i in. 2023].

Jak wspomniano wcześniej, PRP jest obecnie stosowane klinicznie w leczeniu ChZS, chociaż jego skuteczność jest kontrowersyjna. Stwierdzono jednak, że egzosomy pochodzące z PRP (PRP-exo) dają lepsze efekty niż samo PRP w ochronie chrząstki. W badaniach eksperymentalnych zastosowanie PRP-exo zwiększało proliferację i migrację oraz zmniejszało apoptozę chondrocytów indukowaną przez IL-1 β . Potencjalny mechanizm polega na aktywacji szlaku sygnałowego Wnt/ β -kateniny. Ponieważ efekt działania PRP-exo był lepszy niż pełnego PRP w łagodzeniu objawów ChZS, uznano, że mają one potencjał terapeutyczny, a dostawowa iniekcja PRP-exo może zapewnić nowatorskie podejście do zastosowania w praktyce klinicznej przyczynowego leczenia ChZS [Liu i in. 2019].

Chociaż wcześniejsze strategie terapeutyczne mają potencjał, istnieją różne ograniczenia w ich klinicznym zastosowaniu. Formułowanie strategii terapeutycznych stale się zmienia wraz z postępem nauki i techniki. W związku z tym istnieje pilna potrzeba, aby nowe preparaty, w tym oparte na egzosomach różnego pochodzenia, weszły w fazę badań przedklinicznych lub klinicznych leczenia ChZS. Mogą być one stosowane wraz z lekami lub modyfikacjami genetycznymi.

Podsumowanie

Niniejsze opracowanie stanowi przegląd podstawowych informacji o znaczeniu i występowaniu CHZS u ludzi i zwierząt, elementów patogenezы tego zaburzenia, a także metod terapeutycznych opartych na preparatach krwiopochodnych, które mogą uzupełniać dotychczasowe metody lecznicze. Niektóre z nich są obecnie stosowane w praktyce klinicznej, inne to nowatorskie podejście do tego bardzo poważnego i szeroko rozpowszechnionego problemu.

Piśmiennictwo

- Abramson S.B., Attur M., 2009. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11(3), 227. <https://doi.org/10.1186/ar2655>
- Altan E., Aydin K., Erkocak O., Senaran H., Ugras S., 2004. The effect of platelet-rich plasma on osteochondral defects treated with mosaicplasty. *Int. Orthop.* 38(6), 1321–1328. <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2275-9>
- Alves J.C., Santos A., Jorge P., 2021. Platelet-rich plasma therapy in dogs with bilateral hip osteoarthritis. *BMC Vet. Res.* 17(1), 207.
- Bari E., Perteghella S., Faragò S., Torre M.L., 2018. Association of silk sericin and platelet lysate: premises for the formulation of wound healing active medications. *Int. J. Biol. Macromol.* 119, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.142>
- Berenbaum F., 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr. Cartil.* 21(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.11.012>
- Calvo I., Kuten-Pella O., Kramer K., Madár Á., Takács S., Kardos D., Simon D., Erdő-Bonyár S., Berki T., De Luna A., Nehrer S., Lacza Z., 2021. Optimization of lyophilized hyperacute serum (HAS) as a regenerative therapeutic in osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 22(14), 7496. <https://doi.org/10.3390/ijms22147496>
- Camargo Garbin L.C., Morris M.J., 2021. A comparative review of autologous conditioned serum and autologous protein solution for treatment of osteoarthritis in horses. *Front. Vet. Sci.* 8, 602978. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.602978>
- Chaney S., Vergara R., Qiryaqoz Z., Suggs K., Akkouch A., 2022. The involvement of neutrophils in the pathophysiology and treatment of osteoarthritis. *Biomedicines* 10(7), 1604. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071604>
- Chen D., Shen J., Zhao W., Wang T., Han L., Hamilton J.L., Im H.-J., 2017. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res.* 5, 16044. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.44>
- Clegg P.D., Mobasheri A., 2003. Chondrocyte apoptosis, inflammatory mediators and equine osteoarthritis. *Vet. J.* 166(1), 3–4. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00270-8)

- Cohen-Solal M., Funck-Brentano T., Hay E., 2013. Animal models of osteoarthritis for the understanding of the bone contribution. *Bonekey Rep.* 2, 422. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.156>
- Englund M., Haugen I.K., Guermazi A., Roemer F.W., Niu J., Neogi T., Aliabadi P., Felson D.T., 2016. Evidence that meniscus damage may be a component of osteoarthritis: the Framingham Study. *Osteoarthr. Cartil.* 24(2), 270–273. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.08.005>
- Everts P., Onishi K., Jayaram P., Lana J.F., Mautner K., 2020. Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *Int. J Mol. Sci.* 21(20), 7794. <https://doi.org/10.3390/ijms21207794>
- Feng X., Pan J., Li J., Zeng C., Qi W., Shao Y., Liu X., Liu L., Xiao G., Zhang H., Bai X., Cai D., 2020. Metformin attenuates cartilage degeneration in an experimental osteoarthritis model by regulating AMPK/MTOR. *Aging (Albany NY)* 12(2), 1087–1103. <https://doi.org/10.18632/aging.102635>
- Hached F., Vinatier C., Le Visage C., Gondé H., Guicheux J., Grimandi G., Billon-Chabaud A., 2017. Biomaterial-assisted cell therapy in osteoarthritis: from mesenchymal stem cells to cell encapsulation. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 31(5), 730–745. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.05.002>
- van der Kraan P.M., van den Berg W.B., 2012. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthr. Cartil.* 20(3), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.003>
- Kuyinu E.L., Narayanan G., Nair L.S., Laurencin C.T., 2016. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J. Orthop. Surg. Res.* 11, 19. <https://doi.org/10.1186/s13018-016-0346-5>
- Lieberthal J., Sambamurthy N., Scanzello C.R., 2015. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 23(11), 1825–1834. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.08.015>
- Little C.B., Smith M.M., 2008. Animal models of osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.* 4(3), 175–182. <http://dx.doi.org/10.2174/157339708785133523>
- Liu X., Wang L., Ma C., Wang G., Zhang Y., Sun S., 2019. Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Orthop. Surg. Res.* 14, 470. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1529-7>
- Loukov D., Karampatos S., Maly M.R., Bowdish D.M.E., 2018. Monocyte activation is elevated in women with knee-osteoarthritis and associated with inflammation, BMI and pain. *Osteoarthr. Cartil.* 26(2), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.10.018>
- Malemud C.J., 2015. Biologic basis of osteoarthritis: state of the evidence. *Curr. Opin. Rheumatol.* 27(3), 289–294. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000162>
- Manoto S.L., Maepa M.J., Motaung S.K., 2018. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J. Biol. Sci.* 25(4), 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.002>
- McIlwraith C.W., Frisbie D.D., Kawcak C.E., 2012. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Jt. Res.* 12, 1(11), 297–309. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.111.2000132>
- McIlwraith C.W., Kawcak C.E., Frisbie D.D., Little C.B., Clegg P.D., Peffers M.J., Karsdal M.A., Ekman S., Laverty S., Slayden R.A., Sandell L.J., Lohmander L.S., Kraus V.B., 2018. Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 36(3), 823–831. <https://doi.org/10.1002/jor.23738>
- Muley M.M., Krustev E., Reid A.R., McDougall J.J., 2017. prophylactic inhibition of neutrophil elastase prevents the development of chronic neuropathic pain in osteoarthritic mice. *J. Neuroinflamm.* 14(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0944-0>
- Munday J., 2017. Pathologic basis of veterinary disease, 6th Ed. Elsevier, St. Louis, MO, *Vet. Dermatol.* 28(2), 258. <https://doi.org/10.1111/vde.12434>
- Richards M.M., Maxwell J.S., Weng L., Angelos M.G., Golzarian J., 2016. Intra-articular treatment of knee osteoarthritis: from anti-inflammatories to products of regenerative medicine. *Phys. Sportsmed.* 44(2), 101–108. <https://doi.org/10.1080/00913847.2016.1168272>

- Schiller J., Benard S., Reichl S., Arnhold J., Arnold K., 2000. Cartilage degradation by stimulated human neutrophils: reactive oxygen species decrease markedly the activity of proteolytic enzymes. *Chem. Biol.* 7(8), 557–568. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(00\)00013-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(00)00013-2)
- de Souza M.V., 2016. Osteoarthritis in horses – part 1: relationship between clinical and radiographic examination for the diagnosis. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150024>
- Szponder T., Latański M., Danielewicz A., Krawiec K., Kozera A., Drzewiecka B., Nguyen Ngoc D., Dobko D., Wessely-Szponder J., 2022. Osteoarthritis: pathogenesis, animal models, and new regenerative therapies. *J. Clin. Med.* 12(1), 5. <https://doi.org/10.3390/jcm12010005>
- Wessely-Szponder J., Michalska J., Szponder T., Żylińska B., Tarczyńska M., Szubstarski M., 2020. The role of antimicrobial neutrophil extract in modification of the inflammatory response during osteochondral autograft and allograft transplantation in rabbits. *J. Comp. Pathol.* 175, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.12.007>
- Wessely-Szponder J., Zdziennicka J., Junkuszew A., Latański M., Świeca M., Szponder T., 2022. Prospects and applications of natural blood-derived products in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 23(1), 472. <https://doi.org/10.3390/ijms23010472>
- Wu C., He Y., Yao Y., Yang H., Lu F., 2023. Exosomes treating osteoarthritis: hope with challenge. *Heliyon* 9(1), e13152. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13152>
- Xia B., Chen D., Zhang J., Hu S., Jin H., Tong P., 2014. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif. Tissue Int.* 2014, 95(6), 495–505. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9917-9>
- Yan L., Zhou L., Xie D., Du W., Chen F., Yuan Q., Tong P., Shan L., Efferth T., 2019. Chondro-protective effects of platelet lysate towards moniodoacetate-induced arthritis by suppression of TNF- α -induced activation of NF- κ B pathway in chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 11(9), 2797–2811. <https://doi.org/10.18632/aging.101952>
- Yunus M.H.M., Nordin A., Kamal H., 2020. Pathophysiological perspective of osteoarthritis. *Medicina* 2020, 56(11), 614. <https://doi.org/10.3390/medicina56110614>
- Zdziennicka J., Junkuszew A., Latański M., Świeca M., Wessely-Szponder J., 2021a. Long-term interactions of circulating neutrophils with titanium implants, the role of platelets in regulation of leukocyte function. *Int. J. Mol. Sci.* 22(18), 10060. <https://doi.org/10.3390/ijms221810060>
- Zdziennicka J., Szponder T., Wessely-Szponder J., 2021b. Application of natural neutrophil products for stimulation of monocyte-derived macrophages obtained before and after osteochondral or bone injury. *Microorganisms* 9(1), 124. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010124>
- Zhang W., Ouyang H., Dass C.R., Xu J., 2016. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Res.* 4, 15040. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.40>
- Zhang Y., Pizzute T., Pei M., 2014. Anti-inflammatory strategies in cartilage repair. *Tissue Eng. Part B Rev.* 20(6), 655–668. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0014>

Wpływ hydroksyapatytu na aktywność neutrofili izolowanych z krwi ludzkiej

Beata Drzewiecka ^{1*}, Dominika Osmęcka², Joanna Wessely-Szponder ¹,
Tomasz Szponder ³, Dominika Nguyen Ngoc ¹

¹ Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, *e-mail: beata.drzewiecka@up.lublin.pl

² Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³ Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Komórki, które aktywnie uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej, mogą mieć wpływ na przebieg naprawy tkanek. Proces ten może być zaburzony przy nadmiernym odczynie zapalnym, natomiast w przypadku implantacji biomateriału może stanowić przyczynę odrzucenia implantu. Neutrofile to komórki, które w pierwszej kolejności reagują na wszczepione biomateriały. Migrują one w miejsce urazu w ciągu kilku godzin. Komórki te wspomagają oczyszczanie tkanek uszkodzonych oraz pozostałości w okolicy biomateriałów dzięki fagocytozie, generowaniu reaktywnych form tlenu oraz uwalnianiu enzymów z ziarnistości neutrofilowych. Kolejne fazy procesu naprawczego są przeprowadzane przez makrofagi. Biomateriały mogą regulować aktywność makrofagów, a ich zróżnicowane właściwości fizykochemiczne powodują różną odpowiedź tych komórek. Najczęściej wpływają pozytywnie na integrację biomateriałów i regenerację tkanek.

Celem niniejszego opracowania jest przybliżenie tematu wpływu biomateriałów na bazie hydroksyapatytu na żywotność i odpowiedź sekrecyjną neutrofili oraz makrofagów.

Wstęp

Komórki biorące udział w odpowiedzi immunologicznej mogą wpływać na przebieg i wynik naprawy tkanek. Nadmiernie nasilony proces zapalny może zaburzyć naprawę tkanek, a w przypadku implantacji biomateriału bywa źródłem poważnych powikłań, włącznie z odrzuceniem implantu [Shang i in. 2022]. Neutrofile to pierwsze komórki, które reagują na wszczepiony biomateriał. Są to komórki krótko żyjące, wywodzące się ze szpiku kostnego. W ciągu kilku godzin

migrują do miejsca urazu, następnie oczyszczają uszkodzone tkanki oraz pozostałości w okolicy biomateriałów [Drzewiecka i in. 2023]. Ich działanie jest zależne od fagocytozy oraz uwalniania enzymów i generowania reaktywnych form tlenu. Po spełnieniu swojej funkcji obumierają. Podczas aktywności neutrofilów dochodzi do degranulacji ich ziarnistości, które mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe i są wykorzystywane przez organizm jako element pierwszej linii obrony przed patogenem.

Tabela 1. Rodzaje ziarnistości neutrofilów według Othman i in. [2021]

Ziarnistości azurofilne (pierwotne)	Ziarnistości specyficzne (wtórne)	Ziarnistości trzeciorzędowe (żelaziste)	Ziarnistości wydzielnicze
Mieloperoksydaza – wybuch tlenowy; wytwarza kwas podchlorawy, ma właściwości bakteriobójcze i przeciwnowotworowe Elastaza – enzym trawiący białka podścieliska, ma bezpośrednie działanie bakteriobójcze oraz bierze udział w przedostaniu się do miejsca zapalenia Lizozym – białko o właściwościach hydrolitycznych Katepsyna G – proteaza powodująca depolimeryzację włókien kolagenowych i degradację proteoglikanów Defensyny – białka kationowe bogate w cysteinę (aktywność przeciwdrobnoustrojowa)	Kolagenaza – enzym trawiący włókna kolagenowe Gelatynaza (MMP-8) – metaloproteinaza zdolna do rozkładu kolagenu IV Heparynaza Laktoferyna – białko pomagające regulować wchłanianie żelaza; chroni przed infekcjami bakteryjnymi	Antybakteryjne peptydy: – lizozym – katelicydyna (CAP-18) Proteazy: – gelatynaza B (MMP-9) – leukolizyna (MMP-25) – kolagenaza (MMP-8)	Antybakteryjne peptydy: Gp91^{phox} / p22^{phox} Proteazy: – leukolizyna (MMP-25) – proteinaza 3 (mieloblastyna)

W kolejnych etapach naprawy zastępują je makrofagi. Okazało się, że ich aktywność może być regulowana przez biomateriały, co jest związane z ich specyficznymi właściwościami. Różne biomateriały mogą wpływać pozytywnie na integrację na poziomie biomateriał–tkałka oraz naprawę uszkodzeń [Shang i in. 2022].

Tkanki, takie jak kości oraz zęby, składają się w większości z hydroksyapatytu. Uważa się przez to, że tworzywa ceramiczne mogą być bardziej efektywne podczas stosowania jako wszczepy niż używane wcześniej metale czy tworzywa sztuczne. Bioceramika hydroksyapatytowa jest oparta na fosforanach wapnia oraz

innych związkach chemicznych, które są budulcem naturalnej kości, a ich skład jest jak najbardziej zbliżony do naturalnych tkanek [Sobczak i Kowalski 2007]. Atrakcyjne cechy tych tworzyw to wysoka osteoinduktywność, biokompatybilność oraz zdolność do osteointegracji [Drzewiecka i in. 2023]. Charakterystyczna jest również ich wysoka oporność na ścieranie, a także mała gęstość właściwa i wytrzymałość na ściskanie, co powoduje, że wykonuje się z nich np. sztuczne stawy biodrowe. Hydroksyapatyt charakteryzuje wysoka biointegralność w środowisku tkankowym oraz porowatość umożliwiającą wrastanie tkanek, co pozwala uzyskać efekt trwałego połączenia pomiędzy tkankami a implantem [Ślósarczyk 1997]. Negatywną cechą jest tendencja do defragmentacji i uwalniania małych cząstek. Prowadzi to do aktywacji neutrofili podczas procesów naprawy oraz powoduje niepowodzenie osteointegracji aż do odrzucenia implantu [Chłopek i in. 2002]. Można zauważyć również ograniczenia w zastosowaniu w chirurgii kostnej z powodu niewystarczających właściwości mechanicznych, a przede wszystkim słabej oporności na pękanie.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP), zwane także peptydami obronnymi gospodarza, to różnorodna grupa naturalnie występujących cząsteczek znalezionych w różnych organizmach, w tym w ludziach, zwierzętach, roślinach i mikroorganizmach. Peptydy te odgrywają kluczową rolę w układzie odpornościowym, działając jako mechanizm obronny przed infekcjami bakteryjnymi, grzybiczymi, wirusowymi, a nawet niektórymi infekcjami pasożytniczymi [Hancock i in. 2006]. Główną funkcją AMP jest docieranie do błon komórkowych lub ścian komórkowych patogenów i zakłócanie ich, co prowadzi do zniszczenia. Ta szeroko-spektralna aktywność przeciwdrobnoustrojowa sprawia, że AMP są istotnym składnikiem pierwszej linii obrony organizmu przed infekcjami. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe działają szybko i skutecznie, często zapobiegając rozwojowi opornych na leki szczepów mikroorganizmów, co stanowi istotny problem w nowoczesnej medycynie [Jenssen i Hancock 2009].

W ostatnich latach badania nad peptydami przeciwdrobnoustrojowymi nabrały rozpędu ze względu na rosnący problem oporności na antybiotyki. Naukowcy eksplorują potencjał wykorzystania AMP jako alternatywy lub uzupełnienia tradycyjnych antybiotyków. Dodatkowo peptydy przeciwdrobnoustrojowe znajdują zastosowanie w różnych dziedzinach, w tym w biotechnologii i opracowywaniu nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych o zastosowaniach medycznych i przemysłowych [Yeaman i Yount 2003]. Drzewiecka i in. [2023] wykazali, że inkubacja neutrofili z hydroksyapatytem wpływa na aktywność tych pierwszych. W swoim doświadczeniu badali aktywność neutrofili izolowanych z krwi ludzkiej po inkubacji z hydroksyapatytem. W badaniu tym użyto przygotowanego wcześniej neutrofilowego ekstraktu AMP. Ekstrakt ten podzielono na porcje o znanej zawartości, poddano liofilizacji i umieszczono w zamrażarce, gdzie był przechowywany w temperaturze -70°C do czasu wykonania zaplanowanych testów. Z krwi pobranej od zdrowych ochotników przygotowano zawiesinę neutrofili (czystość 95%). Równocześnie przygotowano biomateriały (hydroksyapatyt HA

Biocer). Próbkę zawierającą po 20 mg HA nałożono w dwóch powtórzeniach na płytkę do hodowli komórkowych (24 dołki), zalano 500 µl roztworu PBS (Biomed Lublin) i pozostawiono na 2 godziny do napęczenia. Po tym czasie odprowadzono nadmiar PBS, który nie uległ wchłonięciu. Do każdego z 12 dołków nałożono po 40 µg ekstraktu AMP uzyskanego z izolowanych neutrofili. Płytkę umieszczono na 4 godziny w inkubatorze w warunkach 37°C z 5-procentowym udziałem CO₂. Po tym czasie oceniono aktywność wolnorodnikową neutrofili na podstawie wytwarzania tlenu azotu oznaczoną z użyciem metody Griessa w celu wykrycia azotynów w podłożu hodowlanym oraz wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego z użyciem metody Confera, a także aktywność elastazy w zawieszynie neutrofili. Odczyt powtórzono po 20 godzinach. W świetle uzyskanych wyników stwierdzono, że hydroksyapatyt ma istotny wpływ na aktywność neutrofili, co otwiera nowe perspektywy zrozumienia interakcji między tym biomateriałem a komórkami układu odpornościowego. Stwierdzenie wyższego stężenia azotynów w hodowlach z udziałem hydroksyapatytu wskazuje na zdolność tego materiału do modyfikacji funkcji neutrofili, a dodatek ekstraktu neutrofilowego potwierdza istnienie oddziaływań między nimi. Ponadto zwiększona produkcja anionu ponadtlenkowego po użyciu hydroksyapatytu sugeruje aktywację neutrofili przez ten biomateriał. Kolejnym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest obserwacja wzrostu aktywności neutrofili w hodowlach stymulowanych hydroksyapatytem, co może wskazywać na jego potencjalne właściwości stymulujące te komórki. Jednak równie istotne jest odkrycie, że dodatek ekstraktu neutrofilowego może zmniejszać tę wysoką odpowiedź, co sugeruje możliwość uzyskania efektu immunomodulacyjnego poprzez interakcje między ekstraktem neutrofilowym a hydroksyapatytem [Drzewiecka i in. 2023].

Tego typu badania stanowią istotny wkład w wiedzę na temat oddziaływań między biomateriałami a komórkami układu odpornościowego, co ma istotne znaczenie w kontekście potencjalnych zastosowań hydroksyapatytu w medycynie regeneracyjnej oraz terapii immunomodulacyjnej. Mimo to konieczne są dalsze eksperymenty, aby głębiej zrozumieć mechanizmy tych interakcji i potwierdzić ich praktyczne implikacje kliniczne.

Piśmiennictwo

- Chłopek J., Haberk K., Szaraniec B., 2002. Wpływ rodzaju podłoża na proces narastania apatyty w warunkach in vitro. *Inż. Biomat.* 5(23–25), 83–87.
- Drzewiecka B., Przekora A., Dobko D., Kozera A., Krać K., Nguyen Ngoc D., Fernández-De la Cruz E., Wessely-Szponder J., 2023. Analysis of in vitro leukocyte responses to biomaterials in the presence of antimicrobial porcine neutrophil extract (AMPNE). *Materials* 16(16), 5691. <https://doi.org/10.3390/ma16165691>
- Hancock R.E., Sahl H.G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnol.* 24(12), 1551–1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Jenssen H., Hancock R.E., 2009. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>

- McManus B.J., Mowry D.M., Gilroy M.J., 2016. Hydroxyapatite: a review of syntheses, structure and applications in hard tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 46, 1–27.
- Othman A., Sekheri M., Filep J.G., 2022. Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity. *FEBS J* 289(14), 3932–3953. <https://doi.org/10.1111/febs.15803>
- Shang L., Shao J., Shaohua G., 2022. Immunomodulatory properties: the accelerant of hydroxyapatite-based materials for bone regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 28(8), 377–392. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2022.00111112>
- Sobczak A., Kowalski Z., 2007. Materiały hydroksyapatytowe stosowane w implantologii. *Czas. Tech. Chemia*, 104 (1-Ch), 149–158.
- Yeaman M.R., Yount N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>

Wpływ produktów krwiopochodnych na odpowiedź makrofagów na implant z powłoką Si-DLC na modelu owczym

Bartłomiej Szymczak ^{1*}, Dominika Nguyen Ngoc ¹,
Joanna Wessely-Szponder ¹, Tomasz Szponder ², Beata Drzewiecka ¹

¹ Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
*e-mail: bartlomiej.szymczak@up.lublin.pl

² Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

W niniejszym rozdziale omówiono reakcję ciała obcego (FBR) jako odpowiedź na implantację biomateriału, a także specyfikę wybranych materiałów, w tym powłoki Si-DLC. Przedstawiono też niektóre produkty krwiopochodne, ich rodzaje, skład, właściwości i zastosowanie w medycynie oraz znaczenie makrofagów w procesie gojenia. Makrofagi są komórkami odporności wrodzonej, biorącymi udział w odpowiedzi zapalnej, a ich rolę determinuje fenotyp funkcjonalny. Makrofagi typu M1 są odpowiedzialne za uwalnianie cytokin prozapalnych oraz generowanie reaktywnych form tlenu i azotu. Z kolei makrofagi typu M2 działają przeciwzapalnie i przyspieszają proces gojenia. W implantologii szczególnie istotna jest rola makrofagów w FBR. Wykazano, że produkty krwiopochodne, do których zalicza się osocze ubogopłytkowe (PPP) i bogatopłytkowe (PRP), mogą modyfikować i polaryzować funkcjonalne fenotypy makrofagów uzyskanych z monocytów z krwi obwodowej owiec po implantacji biomateriału. W rozdziale poruszono też temat oceny biozgodności biomateriałów. Kompleksowe badanie biozgodności opiera się na badaniach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Badania takie powinny być prowadzone zgodnie z normą ISO 10993, która szczegółowo określa sposób postępowania ze zwierzętami, niezbędne testy analizujące genotoksyczność, rakotwórczość i toksyczność wyrobów. Ponadto norma wskazuje lokalizację badanych implantów. Wybór odpowiedniego modelu zwierzęcego jest jednym z najważniejszych elementów projektowania eksperymentu. Omówiono również specyficzne markery funkcjonalne makrofagów: oznaczenie stężenia anionorodnika nadadtlenkowego oraz tlenku azotu odpowiadające aktywności prozapalnej makrofagów M1-like oraz aktywność arginazy-1 jako markera makrofagów M2-like uczestniczących w procesach gojenia. Dokładne określenie fenotypu makrofagów możliwe jest w oparciu o techniki biologii molekularnej.

Celem niniejszego opracowania było przybliżenie informacji na temat roli makrofagów w procesie gojenia po implantacji biomateriału, sposobów oceny funkcji tych komórek jako aspektu badania biogodności materiałów, a także opisanie udziału produktów krwiopochodnych w modyfikacji odpowiedzi makrofagowej.

Wstęp

Reakcja na ciało obce (FBR) jest naturalnym mechanizmem obronnym organizmu w odpowiedzi na implantowane biomateriały. Może jednak prowadzić do powikłań, utraty funkcji i właściwości wszczepionych materiałów, co stanowi wyzwanie w dziedzinie biomedycyny. Reakcja ta jest wieloetapowym procesem, który rozpoczyna się już kilka godzin po implantacji. W odpowiedzi na obecność „ciała obcego” organizm wytwarza kompleksowy zestaw mediatorów, które prowadzą do zapalenia, włóknienia i tworzenia łącznotkankowej torebki wokół wszczepionego materiału. FBR może wpływać na różnorodne materiały, takie jak metale, polimery naturalne i syntetyczne, zarówno hydrofilowe, jak i hydrofobowe [Carnicer-Lombarte i in. 2021]. Nawet materiały uważane za biokompatybilne, takie jak glikol polietylenowy (PEG), poli(2-hydroksyetylo metakrylan) (PHEMA) czy kolagen, zostały uznane za indukujące FBR. Ponadto proces FBR może różnić się w zależności od typu materiału, miejsca wszczepienia oraz indywidualnych cech organizmu gospodarza. FBR może prowadzić do wielu powikłań, w tym odrzucenia implantu.

W wyniku tego współczynnik niepowodzeń wszczepionych implantów związanych z FBR jest szacowany na 10%, co ma ogromny wpływ na koszty opieki zdrowotnej. Aby zmniejszyć wpływ FBR na funkcję wszczepionych materiałów, rozwijane są badania nad nowymi materiałami o właściwościach przeciwzapalnych. Takie materiały mogą zmniejszać reakcję zapalną oraz minimalizować włóknienie. Przykładami są hydrogele, nanomateriały, powłoki z bioaktywnymi substancjami czy biomateriały z dodatkowymi właściwościami antybakteryjnymi [Zhang i in. 2021].

Właściwości powłoki Si-DLC

Jedną z powłok, zwiększającą biokompatybilność wszczepianego implantu, jest powłoka diamentopodobna z domieszką krzemu (Si-DLC), która nie powoduje szkodliwych reakcji immunologicznych oraz nie wykazuje w organizmie gospodarza toksyczności zarówno miejscowej, jak i ogólnoustrojowej. Minimalizuje ona odpowiedź immunologiczną organizmu na implant, co przyczynia się do zmniejszenia ryzyka odrzutu implantu oraz innych niepożądanych reakcji. Ponadto powłoka ta chroni otaczające tkanki przed dyfuzją jonów metali z rdzenia implantu do otaczających tkanek [Bociaga i in. 2016]. Powłoki Si-DLC są znane

z wyjątkowej wytrzymałości na zużycie mechaniczne, takie jak tarcie i ścieranie. Zmniejszają one zużycie implantu w wyniku kontaktu z tkankami. Chronią również implanty przed korozją, co jest ważne zwłaszcza w organizmie żywym, gdzie wszczep wystawiony jest na działanie płynów ustrojowych oraz substancji uwalnianych przez komórki procesu zapalnego związanego z FBR, co przyczynia się do dłuższej trwałości implantu [Świątek i in. 2016].

Produkty krwiopochodne – rodzaje, skład, właściwości i zastosowanie w medycynie

Poza podnoszeniem biokompatybilności implantów kolejną metodą redukcji niepowodzeń związanych z implantacją jest modyfikowanie odpowiedzi zapalnej organizmu za pomocą autologicznych produktów krwiopochodnych.

Produkty płytkopochodne, takie jak osocze bogatopłytkowe (PRP) i ubogopłytkowe (PPP), są szeroko stosowane w medycynie regeneracyjnej i przyspieszaniu procesów gojenia ran. PRP jest produktem otrzymywanym poprzez oddzielenie płytek krwi od osocza. W ten sposób tworzy się koncentrat płytek bogaty w czynniki wzrostu, które są odpowiedzialne za stymulowanie procesów naprawczych w tkankach. W zależności od zawartości leukocytów PRP może być podzielone na czyste PRP (PURE-PRP) i PRP bogate w leukocyty (L-PRP), co wpływa na jego właściwości biologiczne. Z kolei PPP jest produktem ubocznym uzyskiwanym w procesie wirowania krwi pełnej, zawierającym niższe stężenie płytek w porównaniu z normalnym osoczem, ale nadal bogatym w fibrynogen, fibronektynę i trombinę [Dohan Ehrenfest i in. 2009]. Oba te produkty są szeroko stosowane w różnych dziedzinach medycyny, takich jak ortopedia, okulistyka, stomatologia czy neurochirurgia, do przyspieszania gojenia ran ostrych i przewlekłych, regeneracji tkanek i wspomagania procesów naprawczych. Wykazano, że PRP i PPP mogą pobudzać migrację, proliferację i funkcje komórek związanych z gojeniem ran, takich jak fibroblasty czy komórki nabłonka. Wpływają one również na makrofagi, które odgrywają kluczową rolę w FBR.

Znaczenie makrofagów w procesie gojenia

Makrofagi są ważnymi komórkami układu odpornościowego zaangażowanymi w fagocytozę, prezentację antygenów, produkcję cytokin, regulację procesów naprawczych i udział w odpowiedzi immunologicznej na infekcje oraz uszkodzenia tkanek, w tym na uszkodzenia wynikające z implantacji. W zależności od mikrośrodowiska, w którym się znajdują, oraz sygnałów, na które są ekspozowane, komórki te mogą przyjmować różnorodne formy. Pod względem fenotypu funkcjonalnego makrofagi są często dzielone na dwa główne typy: M1-like i M2-like.

Makrofagi M1-like wykazują działanie prozapalne, produkując cytokiny prozapalne, takie jak interleukina-1 β (IL-1 β), interleukina-6 (IL-6) i czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α). Zazwyczaj są one aktywowane w odpowiedzi na infekcje bakteryjne lub uszkodzenia tkanek i mają zdolność do eliminacji patogenów [Varol i in. 2015]. Z kolei makrofagi M2-like są uważane za przeciwzapalne lub regulujące procesy naprawcze, ponieważ wykazują zdolność do wydzielania cytokin przeciwzapalnych, takich jak interleukina-10 (IL-10), oraz wspomaganie gojenia się tkanek poprzez produkcję czynników wzrostu i remodeling tkanki. Makrofagi M2-like mogą być także zaangażowane w procesy immunosupresji, regulacji angiogenezy i modulowania odpowiedzi immunologicznej [Sica i Mantovani 2012]. Warto jednak zauważyć, że podział na M1 i M2 to jedynie uproszczenie, a w rzeczywistości istnieje szerokie spektrum różnych fenotypów funkcjonalnych makrofagów, które mogą przyjmować różnorodne funkcje w zależności od sytuacji. W odpowiedzi na różne bodźce makrofagi mogą przyjmować pośrednie fenotypy, które wykazują cechy zarówno M1-like, jak i M2-like [Watanabe i in. 2019].

Ocena biogodności biomateriałów z użyciem testów *in vivo* oraz *in vitro*

Kompleksowe badanie biogodności opiera się zarówno na badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Badania takie powinny być prowadzone zgodnie z normą ISO 10993, która szczegółowo określa sposób postępowania ze zwierzętami, niezbędne testy analizujące genotoksyczność, rakotwórczość i toksyczność reprodukcyjną wyrobów. Ponadto norma wskazuje miejsca, w których powinny zostać umieszczone badane implanty. Wybór odpowiedniego modelu zwierzęcego jest jednym z najważniejszych elementów projektowania eksperymentu. Należy przy tym wziąć pod uwagę różnice fizjologiczne pomiędzy poszczególnymi gatunkami zwierząt. Żaden pojedynczy model zwierzęcy nie jest w stanie w pełni odzwierciedlić złożoności procesów zachodzących w organizmie człowieka, z tego powodu sukces w badaniach translacyjnych wymaga oceny na kilku modelach zwierzęcych. Do badań wstępnych najczęściej wykorzystuje się gryzonie, które ze względu na niewielkie rozmiary i dobrze poznaną fizjologię pozwalają potwierdzić biogodność materiału lub odrzucić tę koncepcję. W kolejnym etapie badań *in vivo* model zwierzęcy powinien być zbliżony rozmiarami do człowieka i w tym aspekcie owca staje się obiecującą opcją i dobrym zamiennikiem dla modeli naczelnych innych niż ludzie. Obecnie model owcy stanowi cenne narzędzie do testowania środków farmakologicznych i wyrobów medycznych, w tym implantów kostnych lub stawowych o potencjalnych zastosowaniach klinicznych. Ponadto standaryzacja procedur badań na modelu owczym będzie prowadziła do uzyskiwania powtarzalnych wyników badań, a tym samym owce staną się nie tylko większą wersją modeli zwierzęcych, ale również

samodzielnym modelem zwierzęcym. Minusem wykorzystania dużych zwierząt w badaniach *in vivo* są wysokie koszty ich utrzymania, co musi być uwzględnione w planowaniu budżetu eksperymentu. W porównaniu z gryzoniami, które są powszechnie stosowane w badaniach, mniej jest dostępnych szczegółowych atlasów anatomicznych owiec, a także niektóre przeciwciała nie są szeroko dostępne w sprzedaży [Banstola i Reynolds 2022].

Badania *in vitro* stanowią uzupełnienie badań *in vivo* i zgodnie z normą ISO 10993 służą do określenia cytotoksyczności oraz interakcji implantu z krwią. Ocena poszczególnych parametrów wymaga prawidłowego przygotowania próbek pobranych od zwierząt. Materiałem do badań hemokompatybilności jest krew pełna pobierana od zwierząt doświadczalnych z dwóch grup – kontrolnej (zwierzęta bez wszczepionego implantu) oraz doświadczalnej (zwierzęta z wszczepionym implantem). Aby ocenić wpływ autologicznych produktów krwiopochodnych na odpowiedź makrofagów, niezbędne jest wyizolowanie tych komórek z krwi pełnej. Jak wiadomo, makrofagi są dojrzałą formą komórek mononuklearnych i właśnie te komórki należy wyizolować z krwi pełnej. Jedną z metod izolacji jest odwirowanie krwi w roztworze o odpowiedniej gęstości, jakim może być np. Gradisol L. Następnie, po wirowaniu, komórki mononuklearne tworzą pierścień zawieszony w roztworze, pierścień ten zbiera się i umieszcza w płytkach hodowlanych z odpowiednio dobranym medium (np. DMEM wzbogacony 10-procentową surowicą cielęcą). Płytki inkubuje się w 37°C, w środowisku z 5-procentowym stężeniem CO₂. Regularna obserwacja hodowli pod mikroskopem pozwala dostrzec morfologiczne zmiany w komórkach, co świadczy o dojrzewaniu i różnicowaniu się komórek do makrofagów. Po uzyskaniu hodowli ze zróżnicowanymi makrofagami można przejść do stymulacji tych komórek PRP i PPP. Po wzbogaceniu podłoża o badaną substancję hodowlą inkubuje się określony czas i pobiera się podłoże hodowlane do oznaczeń.

Aby sprawdzić fenotyp makrofagów, wykorzystuje się markery funkcjonalne, specyficzne dla danego typu. Dla makrofagów M1-like są to: oznaczenie stężenia anionorodnika nadtlenkowego oraz tlenu azotu odpowiadające aktywności prozapalnej tych makrofagów. Dla makrofagów M2-like wykorzystywana jest aktywność arginazy-1 jako marker ich aktywności w procesach gojenia. Aktywność arginazy-1 określana jest na podstawie pomiaru stężenia mocznika, produktu hydrolizy L-argininy. Wyższa koncentracja mocznika odpowiada większej aktywności enzymatycznej. W określaniu fenotypu funkcjonalnego przydatne są również obserwacje mikroskopowe, zmiany komórek są pośrednim dowodem ich polaryzacji. Dokładne określenie fenotypu makrofagów możliwe jest w oparciu o cytometrię przepływową, immunohistochemię, reakcję łańcuchową w czasie rzeczywistym (qPCR), sekwencjonowanie mRNA i *western blotting*. Metody te zostały dobrze poznane, jednak ich wykonanie jest czasochłonne i kosztowne.

Podsumowanie

Wprowadzenie do praktyki klinicznej nowych materiałów zawsze musi być poprzedzone gruntowną analizą oddziaływania tych materiałów na organizm gospodarza. Prowadzenie takich badań od wielu lat jest ustandaryzowane tak, by każdy wprowadzany na rynek produkt był bezpieczny dla pacjentów. Zwiększanie biogodności implantu jest jednym z ważniejszych wyzwań stawianych nowoczesnej inżynierii materiałowej. Jednocześnie ze zwiększaniem biogodności należy poszukiwać metod zmniejszających odczyn zapalny towarzyszący implantacji. Produkty krwiopochodne, takie jak PRP i PPP, mają zdolność polaryzacji makrofagów do jednego z dwóch fenotypów funkcjonalnych, prozapalnego lub przeciwzapalnego, jednak dokładne zgłębienie mechanizmów leżących u podstaw tych interakcji wymaga większej liczby głębokich analiz prowadzonych na różnorodnych modelach zwierzęcych.

Piśmiennictwo

- Bociaga D., Kaminska M., Sobczyk-Guzenda A., Jastrzebski K., Swiatek L., Olejnik A., 2016. Surface properties and biological behaviour of Si-DLC coatings fabricated by a multi-target DC-RF magnetron sputtering method for medical applications. *Diam. Relat. Mater.* 67, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2016.01.025>
- Banstola A., Reynolds J.N.J., 2022. The sheep as a large animal model for the investigation and treatment of human disorders. *Biology* 11(9), 1251, <https://doi.org/10.3390/biology11091251>
- Carnicer-Lombarte A., Chen S.-T., Malliaras G.G., Barone D.G., 2021. Foreign body reaction to implanted biomaterials and its impact in nerve neuroprosthetics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.622524>
- Dohan Ehrenfest D.M., Rasmusson L., Albrektsson T., 2009. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 27(3), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
- PN-EN ISO 10993-1:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem.
- PN-EN ISO 10993-5:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5: Badania cytotoxyczności in vitro.
- PN-EN ISO 10993-10:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 10: Badania działania drażniącego i działania uczulającego na skórę.
- Sica A., Mantovani A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122(3), 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
- Świątek L., Olejnik A., Grabarczyk J. (2016). The influence of the DLC and DLC-Si coatings on the changes occurring on the implants surface during the implant-bone contact. *Eng. Biomat.* 19(137), 2–12.
- Varol C., Mildner A., Jung S., 2015. Macrophages: development and tissue specialization. *Ann. Rev. Immunol.* 33(1), 643–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
- Watanabe S., Alexander M., Misharin A.V., Budinger G.R.S., 2019. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 129(7), 2619–2628. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>
- Zhang D., Chen Q., Shi C., Chen M., Ma K., Wan J., Liu R., 2021. Dealing with the foreign-body response to implanted biomaterials: strategies and applications of new materials. *Adv. Funct. Mat.* 31(6), 2007226. <https://doi.org/10.1002/adfm.202007226>

Biomateriały stosowane w leczeniu zwyrodnieniowej choroby stawów

Aleksandra Domańska^{1}, Agata Bukała¹, Joanna Wessely-Szponder^{1b 2},
Tomasz Szponder^{1b 3}, Dominika Nguyen Ngoc^{1b 2}, Beata Drzewiecka^{1b 2},
Aleksandra Kozera¹, Katarzyna Krać¹*

¹ Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
e-mail: aleksandrdomanska28@gmail.com

² Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³ Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet
Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Zwyrodnieniowa choroba stawów (OA) to schorzenie, na skutek którego dochodzi do nieodwracalnego uszkodzenia chrząstki stawowej. Towarzyszy jej przewlekły ból, sztywność oraz ograniczenie ruchomości. Choroba ta może występować u różnych gatunków zwierząt, a głównymi predysponowanymi są psy i konie. Najczęściej dotyczy to zwierząt w podeszłym wieku. Jest to choroba należąca do dziesięciu najczęściej diagnozowanych schorzeń u psów, które przekroczyły siódmy rok życia. W przypadku koni, ze względu na intensywny wysiłek fizyczny, OA dotyczy zwykle koni sportowych oraz wyścigowych. Przyczynami OA mogą być: nadwaga, podeszły wiek, intensywne treningi, nieprawidłowy rozwój kości i chrząstek (niestabilność, uraz stawu, przeciążenie). Choroby endokrynologiczne, np. cukrzyca, również mogą prowadzić do wystąpienia OA. Systematycznie pojawiają się coraz to nowsze preparaty do jej leczenia, lecz ich skuteczność nie zawsze jest naukowo udowodniona. Wiele czynników wzrostu (np. czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik wzrostu B, białko morfogenetyczne kości) jest pomocnych w gojeniu kości, proliferacji chondrocytów, tworzeniu chrząstki. Wyniki badań przedstawiają, że zastosowanie biomateriałów daje lepszą odpowiedź w rekonwalescencji oraz poprawę wyników histologicznych w porównaniu z metodami leczenia bez ich zastosowania. Efekty badań udowadniają, że terapia z wykorzystaniem biomateriałów jest coraz bardziej innowacyjna, co wpływa na poprawę jej skuteczności.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najnowszych doniesień dotyczących leczenia OA z zastosowaniem biomateriałów.

Zwyrodnieniowa choroba stawów

Zwyrodnieniowa choroba stawów (OA) jest chorobą, która może prowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia chrząstki stawowej, zmian w kościach na styku stawu, towarzyszy jej też przewlekły ból, sztywność i ograniczenie ruchomości [Watson 2014]. Choroba ta jest szczególnie powszechna u psów i koni, zwłaszcza u zwierząt w podeszłym wieku. U psów, które przekroczyły siódmy rok życia, OA należy do dziesięciu najczęściej diagnozowanych schorzeń [Johnston i in. 2005]. W przypadku koni często dotyka zwłaszcza konie sportowe i wyścigowe, które są narażone na intensywny wysiłek fizyczny [Strzelec i in. 2017]. Czynniki zwiększającymi ryzyko jej wystąpienia są: nadwaga, przetrenowanie, podeszły wiek, urazy oraz choroby endokrynologiczne, np. cukrzyca [Kowalska i Degórska 2016]. Objawy mogą mieć różne nasilenie: od niewielkich zmian w zachowaniu zwierzęcia po silnie wyrażone, powodujące zmianę stylu życia [Godfrey 2011]. Powstałe zmiany są nieodwracalne, leczenie sprowadza się do zahamowania rozwoju choroby i zapewnienia pacjentowi możliwego komfortu życia [Blanchard 2015].

Aby wspierać procesy gojenia i redukcję objawów choroby, wykorzystuje się różnorodne biomateriały, takie jak biomateriały płytkopochodne, autologiczną kondycjonowaną surowicę, kwas hialuronowy, wraz z innymi metodami leczenia.

Biomateriały płytkopochodne

Do biomateriałów płytkopochodnych należą różne produkty, takie jak produkty na bazie fibrynogenu, mieszaniny płytka–fibrynogen–trombina, osocze bogatopłytkowe czy bogatopłytkowa fibryna, które naśladują procesy krzepnięcia krwi i mają zastosowanie w medycynie oraz biotechnologii medycznej.

- Produkty na bazie fibrynogenu (szczeliwa fibrynowe) opierają się na fibrynogenie, który jest białkiem krwi odpowiedzialnym za proces krzepnięcia. Przy użyciu enzymu trombiny i w obecności jonów wapnia (CaCl_2) fibrynogen jest przekształcany w fibrynę, która tworzy sieć fibrynową, co jest procesem imitującym naturalne krzepnięcie krwi [Radosevich i in. 1997]. Szczeliwa są wykorzystywane głównie w celu zamykania krwawiących naczyń krwionośnych podczas zabiegów chirurgicznych. Stosowane są również do uszczelniania ran po operacjach, aby zapobiec wyciekowi płynów ustrojowych [Annabi i in. 2015].
- Mieszanina płytka–fibrynogen–trombina (żel płytkowy) jest otrzymywana poprzez aktywację płytek krwi przez trombinę lub CaCl_2 [Arai i in. 2012]. Dochodzi wówczas do przemiany fibrynogenu w żel fibrynowy, a do środowiska tkankowego uwolnione zostają czynniki wzrostu. Żele płytkowe są używane

przede wszystkim w celu wspomagania gojenia ran i regeneracji tkanek [Blair i Flaumenhaft 2009].

- Osocze bogatopłytkowe posiada znacznie większą ilość płytek krwi w porównaniu z krwią obwodową. Uzyskuje się je poprzez odwirowanie krwi pełnej pobranej od pacjenta, zwykle z dodatkiem koagulantu [Marx 2001]. W zależności od czasu trwania oraz prędkości wirowania można uzyskać różne produkty, takie jak: osocze bogatopłytkowe, osocze bogatopłytkowe Buffy-Coat, koncentrat osocza bogatopłytkowego (koncentracja wszystkich płytek krwi na dnie próbówki), koncentrat płytek krwi Buffy-Coat (większa wydajność w stosunku do koncentratu osocza bogatopłytkowego). Po podaniu osocza bogatopłytkowego do ubytku kostno-chrzęstnego dochodzi do jego kontaktu z kolagenem i tkankową tromboplastyną, w wyniku czego płytki krwi aktywują się i zaczynają uwalniać czynniki wzrostu, co wspomaga gojenie tkanek [Satyam i Naveen 2016].
- Bogatopłytkowa fibryna powstaje w wyniku wirowania krwi pełnej bez antykoagulantu. Podczas procesu aktywacji płytek krwi w próbówce tworzy się skrzep fibrynowy. Powstająca sieć fibrynowa zapewnia naturalny induktor angiogenezy i gojenia się ran. Płytki krwi odpowiadają również za aktywację procesów obronnych organizmu [Satyam i Naveen 2016].

Autologiczna kondycjonowana surowica

Kolejny cenny biomateriał to autologiczna kondycjonowana surowica, która jest specjalnie przygotowanym produktem pochodzącym z krwi własnej pacjenta. Jest to objętość frakcji osocza autologicznej krwi mająca wysokie stężenie czynników wzrostu [Griffin i in. 2009] i działająca jako potencjalny induktor regeneracji i gojenia tkanek [Hajduk i in. 2018]. Jest również bogata w cytokiny przeciwzapalne, które wraz z czynnikami wzrostu odgrywają ważną rolę w proliferacji komórek, chemotaksji, różnicowaniu i angiogenezie [Hajduk i in. 2018]. Poprzez syntezę IL-1RA zmniejszana jest aktywność prozapalnej IL-1; IL-4 pobudza procesy krwiotwórcze, które wspomagają chrząstkę stawową w jej odbudowie; IL-10 hamuje rozwój procesu zapalnego spowodowanego przez IL-1 [Wehling i in. 2007].

Kwas hialuronowy

W leczeniu OA stosuje się dodatkowo kwas hialuronowy w postaci iniekcji dostawowej, co zwiększa lepkość i nawilżenie płynu stawowego, a to zmniejsza ból [Canapp 2013]. Zmniejszone zostaje tarcie oraz poprawia się ruchomość stawu [Puchała 2018]. Kwas hialuronowy bierze również udział w powstawaniu

chrząstki stawowej oraz zmniejsza dolegliwości bólowe [Volpi i in. 2009]. Zastosowanie znalazła także jego modyfikacja chemiczna, która jest mniej podatna na degradację, dzięki czemu może znacznie dłużej utrzymywać się w organizmie [Collins i Birkinshaw 2013].

Inne metody leczenia

Inne metody leczenia OA obejmują różnorodne podejścia mające na celu łagodzenie objawów i poprawę stanu pacjentów. Do obiecujących sposobów zalicza się terapię genową z wykorzystaniem dostawowej iniekcji genu antagonisty receptora IL-1 oraz stosowanie egzogennych czynników wzrostu.

- Terapia genowa z wykorzystaniem dostawowej iniekcji genu antagonisty receptora IL-1 – jedną z przyczyn OA jest działanie chondrocytów i komórek synowialnych, które aktywują wytwarzanie cytokin prozapalnych IL-1 i TNF- α . Inicjują one powstawanie zmian degradacyjnych w stawach poprzez syntezę kolejnych cytokin prozapalnych, aktywację metaloproteinaz (przyczyniających się do degradacji kolagenu), procesy kataboliczne i spadek produkcji proteoglikanów oraz kolagenu [Hajduk i in. 2018]. W przypadku zastosowania genu antagonisty receptora IL-1 dochodzi do blokowania miejsc receptorowych dla interleukiny oraz osłabienia jej działania [Firestein i in. 1992].
- Egzogenne czynniki wzrostu są skutecznymi aktywatorami procesów naprawczych i regeneracyjnych tkanek. Powodują migrację komórek do miejsc uszkodzenia, nasilając ich proliferację, różnicowanie oraz powstawanie naczyń krwionośnych [Hajduk i in. 2018]. Transformujący czynnik wzrostu beta zapewnia prawidłową homeostazę chrząstki stawowej [Pecina i in. 2002], białko morfogenetyczne kości poprawia właściwości mechaniczne chrząstki [Borovecki i in. 2007]. Płytkopochodny, insulinopodobny czynnik wzrostu fibroblastów jest pomocny w gojeniu kości, proliferacji chondrocytów i tworzeniu chrząstki [Griffin i in. 2009].

Podsumowanie

Zwyrodnieniowa choroba stawów wymaga różnorodnych metod leczenia, aby poprawić jakość życia pacjentów i złagodzić objawy. Wśród tych metod wymienia się wykorzystanie biomateriałów płytkopochodnych, autologicznej kondycjonowanej surowicy oraz kwasu hialuronowego, które wspomagają procesy gojenia i zmniejszają objawy. Dodatkowo terapia genowa z iniekcją genu antagonisty receptora IL-1 oraz stosowanie egzogennych czynników wzrostu są obiecującymi kierunkami leczenia OA.

Piśmiennictwo

- Altan E., Aydin K., Erkokac O., Senaran H., Ugras S., 2014. The effect of platelet-rich plasma on osteochondral defects treated with mosaicplasty. *Int. Orthop.* 38(6), 1321–1328. <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2275-9>
- Annabi N., Yue K., Tamayol A., Khademhosseini A., 2015. Elastic sealants for surgical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95(Pt A), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.022>
- Arai M., Ogita-Nakanishi H., Lee K., Yoshimura K., Kawata R., Kanazawa A., Terada T., Takenaka H., Sato T., Endo Y., Kato R., Ijiri Y., Tanaka K., Tashiro-Yamaji J., Kubota T., Yoshida R., 2012. Role of cytokines in lavage or drainage fluid after hemithyroidectomy in wound healing: involvement of histamine in the acceleration and delay of wound healing. *Wound Repair Reg.* 20(2), 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2012.00770.x>
- Blair P., Flaumenhaft R., 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23(4), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>
- Blanchard L., 2015. Helping manage chronic pain in dogs with osteoarthritis. *Clin. Brief* 12, 3–4.
- Borovecki F., Pecina-Slaus N., Vukicevic S., 2007. Biological mechanisms of bone and cartilage remodeling – genomic perspective. *Int. Orthop.* 31(6), 799–805. <https://doi.org/10.1007/s00264-007-0408-8>
- Canapp D.A., 2013. Canine osteoarthritis. *Clin. Brief* 8, 21–23.
- Collins M.N., Birkinshaw C., 2013. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – a review. *Carbohydr. Polym.* 92(2), 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>
- Firestein G.S., Berger A.E., Tracey D.E., 1992. IL-1 receptor antagonist protein production and gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *J. Immunol.* 149(3), 1054–1062.
- Godfrey D., 2011. Diagnosis and management of osteoarthritis in cats. In *Pract.* 33(8), 380–385. <https://doi.org/10.1136/inp.d5347>
- Griffin X.L., Smith C.M., Costa M.L., 2009. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury*, 40(2), 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.06.025>
- Hajduk G., Liberski J., Filipek J., Ficek K., 2018. Zastosowanie autologicznej surowicy kondycjonowanej w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów i innych schorzeń narządu ruchu. *Prakt. Ortop. Traumatol.*, <https://www.praktyczna-ortopedia.pl/artykul/zastosowanie-autologicznej-surowicy-kondycjonowanej-w-leczeniu-choroby-zwyrodnieniowej-stawow-i-innych-schorzen-narządu-ruchu> [dostęp: 9.12.2022].
- Johnston S.A., Budsberg S.C., Marcellin-Little D.J., Philips W.T., Caterson B., Schoenherr W.D., Roush J.K., Allen T.A.: Canine osteoarthritis. *Clin. Update, Suppl. NAVC Clin. Brief* 2005, 4, 1–12.
- Kowalska M., Degórska B., 2016. Zwyrodniająca choroba stawów u psów i kotów. *Życie Wet.* 91(8), 575–578.
- Marx R.E., 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?. *Implant Dent.* 10(4), 225–228. <https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002>
- Pecina M., Jelic M., Martinovic S., Haspl M., Vukicevic S., 2002. Articular cartilage repair: the role of bone morphogenetic proteins. *Int. Orthop.* 26(3), 131–136. <https://doi.org/10.1007/s00264-002-0338-4>
- Puchała M., 2018. Zastosowanie kwasu hialuronowego w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. *Prakt. Ortop. Traumatol.*, <https://www.praktyczna-ortopedia.pl/artykul/zastosowanie-kwasu-hialuronowego-w-leczeniu-choroby-zwyrodnieniowej-stawu-kolanowego> [dostęp: 9.12.2022].
- Radosevich M., Goubran H.A., Burnouf T., Radosevich M., Goubran H.I., Burnouf T., 1997. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang.* 72(3), 133–143. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1997.7230133.x>

- Satyam A., Naveen A., 2016. Platelet derived biomaterials for therapeutic use: review of technical aspects. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 33(2), 159–167. <https://doi.org/10.1007%2Fs12288-016-0669-8>
- Strzelec K., Liss M., Jaroszyńska K., Janczarek I., Górski K., 2017. Schorzenia ortopedyczne koni wyścigowych i sportowych. *Przegl. Hod.* 85(4), 16–21.
- Volpi N., Schiller J., Stern R., Soltés L., 2009. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr. Med. Chem.* 16(14), 1718–1745. <https://doi.org/10.2174/092986709788186138>
- Watson T., 2014. Treatment and management of osteoarthritis in dogs and cats. *Vet Times* 14(4), 12–14.
- Wehling P., Moser C., Frisbie D., 2007. Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases. *Biodrugs* 21(5), 323–332. <https://doi.org/10.2165/00063030-200721050-00004>

Korozja biomateriałów metalicznych

Sandra Podwysocka^{1*}, *Wiktoria Rudczyk*¹, *Joanna Wessely-Szponder* ²,
Tomasz Szponder ³, *Dominika Nguyen Ngoc* ², *Beata Drzewiecka* ²

¹ Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
*e-mail: sanpod@onet.pl

² Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³ Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet
Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Biotolerancja, czyli zdolność biomateriałów do harmonijnego współdziałania z organizmem, stanowi kluczową cechę w medycynie i weterynarii. Zapewnia ona to, że wskazane materiały nie wywołują niepożądanych reakcji zapalnych ani nie zakłócają procesów naprawczych tkanek. Niemniej jednak biomateriały metaliczne, szeroko wykorzystywane w implantach chirurgicznych, podlegają różnym rodzajom degradacji, takim jak korozja wżerowa, szczelinowa czy uszkodzenia spowodowane zmęczeniem materiału. W niniejszym opracowaniu omawiamy te problemy związane z degradacją biomateriałów metalicznych oraz przedstawiamy wymagania stawiane wskazanym materiałom. Postęp w chirurgii rekonstrukcyjnej i protetyce skutkuje wzrostem zapotrzebowania na implanty metaliczne, ale jednocześnie wiąże się z koniecznością rozważenia kwestii degradacji materiałów i potencjalnych konsekwencji, takich jak potrzeba kolejnych operacji.

Biotolerancja, czyli nietoksyczność, jest istotnym czynnikiem w przypadku reakcji organizmu na wszczepy. Korzystna reakcja organizmu objawia się utworzeniem zbitej tkanki łącznej wokół implantu, tworzącej warstwę o różnej grubości. Warstwa ta izoluje implant biologicznie i świadczy o wysokiej biotolerancji materiału, z którego wykonany jest implant. Brak biotolerancji może skutkować rozszerzeniem się blizny pooperacyjnej i zgrubieniem naskórka po zabiegu, a wokół wszczepu mogą pojawić się ziarniste wydzieliny [Ozwoniarek i in. 2006].

Biomateriał to syntetyczny lub naturalny materiał zaprojektowany specjalnie do interakcji z układami biologicznymi, takimi jak komórki, tkanki i narządy, w celu diagnozowania, leczenia, naprawy lub zastąpienia uszkodzonych lub chorych części ciała. Biomateriały znajdują zastosowanie w medycynie i opiece zdrowotnej, m.in. w produkcji implantów medycznych, protez, systemów dostarczania leków, rusztowań do inżynierii tkankowej i narzędzi diagnostycznych. Wybierane

są ze względu na swoją kompatybilność z organizmem, nietoksyczność, właściwości mechaniczne oraz zdolność do wspierania lub poprawiania funkcji biologicznych. Biomateriały odgrywają kluczową rolę w nowoczesnej medycynie, ale obecność ciała obcego w organizmie stymuluje aktywację mechanizmów obronnych, co może prowadzić do degradacji implantów [Świeczko-Żurek 2009].

Biomateriały metaliczne i ich stopy charakteryzują się zazwyczaj wysokimi parametrami mechanicznymi, co sprawia, że są lepsze od ceramiki i polimerów. Niektóre pierwiastki składające się na metale i ich stopy mogą wywoływać alergie i mieć negatywny wpływ na organizm. Poza tym, w porównaniu z materiałami ceramicznymi, większość materiałów metalicznych wykazuje niższą biogodność, co może prowadzić do powstawania zakrzepów i reakcji alergicznych. Problem biotolerancji biomateriałów metalicznych często jest związany z ich odpornością na korozję w środowisku płynów i tkanek ludzkiego organizmu. Odporność ta jest głównie wynikiem procesów elektrochemicznych związanych z korozją. Wynikająca z tego korozja może prowadzić do uwolnienia fragmentów materiału do organizmu, co może wywołać metalozę [Plaskota i in. 2004]. Metalozą to rzadkie schorzenie związane z obecnością nieakceptowalnych metali w organizmie, które może przejawiać się różnymi objawami, takimi jak ból, obrzęk, zmiany skórne, skrócenie kończyn i zmniejszenie ruchomości. Występują także objawy ogólnoustrojowe, jak np. neuropatia, niedoczynność tarczycy lub kardiomiopatia [Hawranek i in. 2018].

Korozja

Korozja jest jednym z problemów towarzyszących wykorzystywaniu metali jako materiału do produkcji różnego rodzaju implantów. Agresywny charakter środowiska płynów ustrojowych sprzyja korozji implantów, co jest związane z trzema elementami:

- obecnością składników organicznych, np. białek,
- wysoką temperaturą organizmu, która występuje przy obciążeniach i w warunkach trybologicznych (ruchomy styk ciał stałych),
- kwaśnym środowiskiem podczas wprowadzania ciała obcego (implantu) do organizmu.

Wszystko to sprawia, że żywy organizm jest bardzo wymagającym środowiskiem, z którym nie każdy materiał jest w stanie sobie poradzić. Aby przeciwdziałać niekorzystnym warunkom ustroju, współcześnie stosowane materiały osiągają wymaganą odporność na korozję. Polega ona na wytworzeniu na powierzchni materiału warstwy tlenków będących inhibitorami procesów korozyjnych. W efekcie wytwarzane są warstwy pasywnego filmu, które ograniczają prędkość procesów destrukcyjnych. Narastanie takiej warstwy trwa kilka sekund [Świeczko-Żurek 2009].

Reakcje katodowe i anodowe są podstawowymi reakcjami związanymi z korozjami. Podczas reakcji anodowej utleniana jest powierzchnia materiału, co dostarcza do otoczenia jony metali. Natomiast reakcja katodowa uzależniona jest od występującego elektrolitu. Wiąże się to z procesami redukcji, które wykorzystują do tego elektrony generowane w procesach anodowych. Równowaga pomiędzy procesami anodowymi i katodowymi warunkuje pojawienie się korozji [Mystkowska 2018].

Z medycznego punktu widzenia wystąpienie korozji może powodować:

- nieprawidłowe działanie implantu w organizmie,
- powstanie produktów korozji, takich jak jony metali, które mogą działać toksycznie oraz prowadzić do wystąpienia niepożądanych reakcji biologicznych, czyli nieprzyjęcia się i odrzucenia wszczepu.

Skutkiem tego może być wystąpienie bólu w wyniku uwolnienia do otaczających tkanek produktów korozji (bez wystąpienia procesu zapalnego) [Świeczko-Żurek 2009].

Rodzaje korozji

Metale i stopy używane jako implanty chirurgiczne osiągają stan pasywności dzięki obecności ochronnej warstwy filmu na powierzchni. Zapobiega on korozji, utrzymuje przepływ prądu i uwalnianie produktów korozji na bardzo niskim poziomie. Warto zrozumieć, że wszystkie materiały implantacyjne podczas użytkowania podlegają pewnemu stopniowi korozji w skomplikowanym środowisku organizmu [Walkowiak 2004]. Rodzaje korozji związane z obecnie stosowanymi stopami obejmują wżerową, cierną, spoinową, galwaniczną, szczelinową, międzykrystaliczną korozję naprężeniową indukowaną wodorem oraz korozję zmęczenia [Kamachi Mudali i in. 2003].

- Korozja wżerowa (punktowa) to forma lokalnej korozji, która tworzy małe dołki na powierzchni materiału, często niewidoczne gołym okiem. Atakuje miejsca, gdzie warstwa pasywna jest osłabiona, co prowadzi do utworzenia dołków. Dołki te mogą być źródłem pęknięć korozji naprężeniowej i mają duże znaczenie w ocenie odporności na korozję. Wprowadzenie molibdenu i kontrola zawartości inkluzji mogą zwiększyć odporność na korozję wżerową w środowisku solankowym [Kamachi Mudali i in. 2003].
- Korozja cierna występuje wtedy, gdy dwie przeciwległe powierzchnie, takie jak płyty kostne i główki śrub w urządzeniach protetycznych, ciągle się ze sobą stykają i przesuwają w trybie oscylacyjnym w środowisku ciała. Jest wynikiem niewielkich względnych ruchów między stykającymi się powierzchniami w środowisku korodującym. Kliniczne znaczenie korozji czarnej leży w jej intensywności, która może prowadzić do znacznego uwolnienia produktów korozji w tkankach sąsiednich lub być głównym czynnikiem inicjacji pęknięć i awarii implantu [Kamachi Mudali i in. 2003].

- Korozja spoinowa to rodzaj korozji związanej z detalami konstrukcyjnymi. Występuje wtedy, gdy metalowa powierzchnia jest częściowo osłonięta od środowiska, zazwyczaj pod głowicą śruby lub w podobnych miejscach. Istotnym czynnikiem jest obecność wąskiej szczeliny bądź pęknięcia. Problem korozji spoinowej można często rozwiązać poprzez odpowiedni projekt urządzenia i wybór właściwego materiału [Kamachi Mudali i in. 2003].
- Korozja galwaniczna to proces, który ma miejsce wtedy, gdy dwa różne metale są w bezpośrednim kontakcie w przewodzącym płynnym medium, takim jak surowica lub płyn międzykomórkowy. Korozja może wystąpić wówczas, gdy metale te różnią się składem lub innymi parametrami procesowymi, tworząc parę galwaniczną. W praktyce, w wielu aplikacjach, kontakt różnych materiałów jest nieunikniony. W przypadku implantów chirurgicznych korozja galwaniczna może wystąpić, jeśli płyta kostna i śruba kostna są wykonane z różnych metali lub stopów – szczególnie między płytą a spodem otworów na śruby [Kamachi Mudali i in. 2003].
- Korozja szczelinowa to forma korozji, która występuje wtedy, gdy metalowa powierzchnia jest częściowo osłonięta od środowiska, zazwyczaj w wąskich szczelinach lub otworach. Jest często spotykana pod elementami takimi jak głowice śrub, gdzie może prowadzić do powstawania pęknięć i uszkodzeń. Stal nierdzewna typu z domieszką molibdenu jest szczególnie podatna na ten rodzaj korozji w porównaniu z innymi materiałami implantacyjnymi. Korozja szczelinowa może być kontrolowana poprzez odpowiednią konstrukcję i wybór materiałów [Kamachi Mudali i in. 2003].
- Korozja międzykrystaliczna występuje wtedy, gdy mikroobszary blisko granic ziaren mają wyższy potencjał elektrochemiczny niż mikroobszary w głębi ziaren, co powoduje tworzenie się ogniw galwanicznych. Najczęściej jest to spowodowane wydzieleniem faz międzymetalicznych na granicach ziaren. Fazy międzymetaliczne to stałe substancje o właściwościach pośrednich między roztworem stałym a związkiem chemicznym. W rezultacie dochodzi do ubogacenia jednego ze składników roztworu stałego na granicy ziaren [Surowska 2002].
- Korozja naprężeniowa indukowana wodorem (kruchość wodorowa) stali jest spowodowana absorpcją atomów wodoru w sieć krystaliczną żelaza, co prowadzi do wewnętrznego naprężenia i potencjalnego pęknięcia materiału. Istnieją dwa rodzaje kruchości wodorowej: anodowa, związana z mniej wytrzymałymi stalami konstrukcyjnymi, i katodowa, dotycząca stali o podwyższonej wytrzymałości. Aby zapobiec temu zjawisku, stosuje się inhibitory, które hamują absorpcję wodoru podczas przygotowania powierzchni. Kruchość wodorowa może pojawić się nawet po kilku miesiącach [Pietkun-Greber i Janka 2010].
- Korozja zmęczeniowa to pęknięcie metalu spowodowane jednoczesnym wpływem reakcji elektrochemicznych i cyklicznego obciążenia. Jest to ważny czynnik przy ocenie odporności na korozję zmęczeniową metali używanych w implantach nośnych lub w aplikacjach z cyklicznym obciążeniem. Awaria może

wystąpić w sytuacji, gdy pęknięcia są inicjowane przez ukryte wady, uszkodzenia powierzchni, mikroskale wady, atak chemiczny i inne czynniki. Środowisko korozji może dodatkowo nasilać wpływ tych niedoskonałości, a jego charakter zależy od rodzaju roztworu, pH, zawartości tlenu i temperatury. Obecność korozji lub zagłębień na powierzchni implantu może przyczynić się do rozwoju zmęczenia [Surowska 2002].

Podsumowanie

Korozja biomateriałów metalicznych jest procesem, w którym metale i ich stopy używane jako implanty chirurgiczne podlegają degradacji w wyniku działań elektrochemicznych w skomplikowanym środowisku organizmu. Istnieje kilka rodzajów korozji związanych z implantami, takich jak korozja wżerowa, cierna, spoinowa, galwaniczna, międzyziarnowa, naprężeniowa, zmęczeniowa, a także kruchość wodorowa. Warto zrozumieć te procesy, aby poprawić trwałość i jakość implantów oraz minimalizować potencjalne zagrożenia zdrowotne.

Piśmiennictwo

- Hawranek M., Stolarz M., Dutka J., Wrzask G., Hawranek J., 2018. Guz rzekomy i metaloza po aloplastyce rewizyjnej stawu biodrowego. *Studium Przypadku. Ortop. Traumatol. Rehab.* 1(6), 43–50. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0011.5875>
- Kamachi Mudali U., Sridhar T.M., Raj B., 2003. Corrosion of bio implants. *Sadhana* 28(3–4), 601–637. <https://doi.org/10.1007/BF02706450>
- Mystkowska J., 2018. Procesy korozji i zużycia tribologicznego wybranych biomateriałów metalowych w środowisku śliny i jej substytutów. *Med. Wyd. Polit. Białostockiej, Białystok* 2018.
- Ozwoniarek J., Wiśniewska-Weinert H., Leshchynsky V., Kędzia Ł., Gierzyńska-Dolna M., 2006. Nowe rozwiązania w zakresie biotribologii i biomateriałów. Część I. Wymagania stawiane biomateriałom stosowanym na endoprotezy stawów. *Obróbka Plast. Met.* 17(3), 29–36.
- Pietkun-Greber I., Janka R.M., 2010. Oddziaływanie wodoru na metale i stopy. *Proc. ECOPE* 4(2), 471–476.
- Plaskota B., Błaszczuk T., Leniart A., Scholl H., 2004. Elektrochemiczne badania korozji biomateriałów. *Inż. Biomat.* 7, 40–45.
- Surowska B., 2002. Wybrane zagadnienia z korozji i ochrony przed korozją. *Polit. Lub., Lublin* 2002.
- Świczko-Żurek B., 2009. *Biomateriały*. Wyd. Polit. Gdańskiej, Gdańsk 2009, 36–45.
- Walkowiak B., 2004. Biomedyczne skutki kontaktu tkanki z implantem. *Inż. Biomat.* 7(38–43), 2004, 200–205.

Biomateriały stosowane w regeneracji nerwów obwodowych

Natalia Gosiewska, Paulina Gajewska*

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

*e-mail: nata1999gos@gmail.com

Streszczenie

Regeneracja włókien nerwowych i ich osłonek zachodzi inaczej, niż dzieje się to w przypadku standardowych procesów gojenia się tkanek. Duża liczba powikłań po zabiegach chirurgicznych wymusiła potrzebę badań, których celem jest usprawnienie regeneracji włókien nerwowych przy wykorzystaniu biomateriałów. W niniejszym opracowaniu przedstawiono budowę nerwów obwodowych, przybliżono proces regeneracji nerwów oraz metody wspomagania gojenia z użyciem materiałów niebiodegradowalnych i biodegradowalnych, ze szczególnym uwzględnieniem wszczepów w kształcie rurek jako materiału o najbardziej obiecujących perspektywach.

Wstęp

Regeneracja włókien nerwowych i ważnych dla ich funkcji osłonek zachodzi inaczej niż standardowe procesy gojenia się tkanek. Z powodu dużej liczby powikłań po zabiegach chirurgicznych zaczęto prowadzić badania, których celem jest usprawnienie regeneracji włókien nerwowych przy wykorzystaniu biomateriałów [Szarek i in. 2006].

Budowa nerwów obwodowych

Neurony są pokryte osłonką mielinową, która jest wytworem komórek Schwanna. Wiele włókien nerwowych biegnących blisko siebie grupuje się, tworząc pęczki. Są one okolone osłonką łącznotkankową – perineurium, a wewnątrz między włóknami wypełnia luźna tkanka – endoneurium.

Pęczki są główną składową nerwu, która ma duże znaczenie przy określaniu wytrzymałości nerwu na działanie mechaniczne. Dzięki spiralnemu i pofałdowanemu ułożeniu wewnątrz nerwu możliwe jest jego wydłużanie się pod wpływem rozciągania, bez uszkodzenia włókien biegnących w środku [Haftak 1970]. Tak

utworzone nerwy zewnętrznie są luźno związane z osłonką – *epineurium*, która pośredniczy ze środowiskiem zewnętrznym [Szarek i in. 2006].

Regeneracja nerwów

Aby nerw po uszkodzeniu mógł dalej pełnić swoją funkcję, konieczne jest przywrócenie ciągłości anatomicznej i fizjologicznej między końcem proksymalnym a dystalnym uszkodzenia [Szarek i in. 2006].

Regeneracja zaczyna się od szeregu procesów patofizjologicznych (degradacja Wallera), podczas których następuje rozpad osłonek mielinowych i wypustek nerwowych. Ważną rolę pełnią tutaj makrofagi, które oprócz funkcji żrnych wytwarzają cytokiny. Stymulują one komórki Schwanna do proliferacji oraz do produkcji substancji neurotroficznych, takich jak NGF (ang. nerve growth factor). Tak powstałe substancje docierają do ciała komórki nerwowej drogą aksonalną i stymulują ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę białek niezbędnych do odbudowy. W następnym etapie komórki Schwanna wytwarzają pomosty będące rusztowaniem do wzrostu aksonów. Regeneracja kończy się w momencie, w którym wytworzone zostaną połączenia synaptyczne oraz osłonki mielinowe wokół nowo powstałych aksonów [Hall 2001].

Metody leczenia

Aby wspomóc regenerację, opracowano metody zespalania i przeszczepiania nerwów. Metody te określa się jako klasyczne i są to: zespolenie operacyjne nerwu koniec do końca, autoprzeszczep i alloprzeszczep. Wykazano, że zasięg regeneracji spada wraz ze wzrostem długości szczeliny między uszkodzonymi końcami, dlatego regeneracja nie może prawidłowo zajść przy większych ubytkach nerwu [Szarek i in. 2006].

Biorąc pod uwagę wady metody klasycznej i właściwości fizjologiczne nerwów, w pracach nad wykorzystaniem biomateriałów określono kilka cech, którymi powinien charakteryzować się implant:

1. Biozgodność,
2. Bioresorbowalność,
3. Stymulacja regeneracji nerwu,
4. Zdolność do generowania grup funkcyjnych na swojej powierzchni, pozwalających na inkorporację czynników modyfikujących regenerację włókien nerwowych,
5. Zbliżone do nerwów obwodowych właściwości mechaniczne określane przez moduł Younga,
6. Poręczność chirurgiczna,
7. Niska cena [Heiduschka i in. 1998].

Przebieg regeneracji

1. Wszczepienie implantu na bazie rurki.
2. Wypełnienie rurki płynem bogatym w czynniki neurotroficzne (przesącz z kikutów przeciętych nerwów). Stymulacja regeneracji.
3. Implant wypełnia się luźną bezkomórkową macierzą pozakomórkową.
4. W 7. dniu zachodzi organizacja włókienka wzdłuż osi długiej rurki, przez co powstaje pomost łączący oba końce uszkodzenia.
5. Następnie pojawiają się fibroblastopodobne komórki wywodzące się z unerwienia, które pokrywają zewnętrzną ścianę, a następnie środek regeneratu.
6. W czasie formowania się macierzy bezkomórkowej dochodzi do wzbudzenia i namnażania się komórek Schwanna, następnie komórki migrują do wnętrza implantu.
7. Komórki Schwanna układają się linijnie wzdłuż włókien fibryny na całej długości, a od strony proksymalnej już pod koniec pierwszego tygodnia w światło implantu wrastają aksony.
8. Komórki Schwanna dobudowują osłonkę mielinową do formujących się aksonów.
9. Zatrzymanie namnażania komórek Schwanna i dojrzewanie substancji pozakomórkowej po osiągnięciu przez aksony kikuta dystalnego.
10. W 2. tygodniu naczynia wrastają w implant.
11. Powstanie nowych włókien nerwowych [Williams i in. 1983].

Materiały niebiodegradowalne i biodegradowalne

Materiałami, które mogą być wykorzystywane jako implanty, są głównie polimery, do których należy m.in. silikon. Umożliwia on tworzenie zamkniętego środowiska – wewnątrz którego następuje samoistne formowanie się macierzy fibryny – a także wzrost aksonów i naczyń włosowatych oraz migrację komórek podporowych w takim implancie [Szarek i in. 2006].

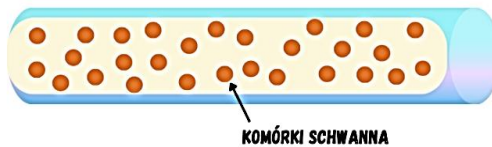
Silikon powoli jednak zostaje wyparty na rzecz materiałów biodegradowalnych, takich jak polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), kopolimer laktydu z glikolidem (PLGA) i poli-3-hydroksybutyren (PHB). Oprócz łatwej dostępności i obróbki implanty wykonane z poliglikolidu i polilaktydu cechują się porowatą strukturą stanowiącą korzystne podłoże do tworzenia naczyń krwionośnych [Bużańska i in. 2015]. Poli-3-hydroksybutyren wyróżnia się poręcznością, wytrzymałością i niską antygenowością, co pozwala na dobrą pracę z tym materiałem. Dodatkowo przez 24–30 miesięcy jest usuwany z organizmu w całości [Hazari i in. 1999].

Biomateriałem coraz częściej stosowanym jest chitozan, ponieważ ma duże powinowactwo do komórek neurogleju, hydrofilność, porowatość. Wykazuje łatwość oddziaływania z lamininą, fibronektyną i kolagenem IV typu, a także zdolność do adhezji komórek oraz inhibicji powstania blizny [Yuan i in. 2004].

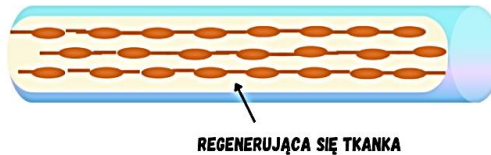
WYTWARZANIE HYDROŻELOWEJ MIKROKOLUMNY



KOMÓRKI SCHWANNA WPROWADZONE DO MIKROKOLUMNY W DNIU 0 IN VITRO



WZROST KOMÓREK SCHWANNA W ŚWIELE IMPLANTU W 1 DNIU IN VITRO



Ryc. 1. Wykorzystanie mikrokolumny hydrożelowej do zapewnienia ciągłego i równomiernego wzrostu komórek Schwanna w świetle implantu

Jako tzw. nerveguide wykorzystywany jest kolagen, który poddaje się obróbce przy udziale m.in. ultrafioletu czy ogrzewania, co nadaje mu wytrzymałość [Itoh i in. 2002]. Jest też elastyczny i odporny na zniszczenie. Może być używany jako podłoża dla wzrastających włókien nerwowych oraz wypełnienie innych implantów [Nakamura i in. 2004].

Kolejnym biomateriałem mającym zastosowanie w sterowanej regeneracji nerwów są mikroelektrody. Ich działanie polega na biernym podparciu tkanki i czynnej stymulacji elektrycznej. Elektrody umieszczane są na brzegu otworów specjalnej płytki oraz w ubytku nerwu, tak aby regenerujące się włókna nerwowe mogły przechodzić przez te otwory. Poza tym tworzą stabilne układy ze względu na umieszczenie mikroelektrod między kanałami łączącymi kikut proksymalny z dystalnym nerwu [Heiduschka i in. 1998].

Dużą rolę w regeneracji ośrodkowego układu nerwowego (OUN) odgrywają także nanorurki węglowe (CNT), które są zdolne do reagowania z żywymi komórkami oraz poprawiania parametrów mechanicznych. Dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym wykazują trwałość, odporność na rozciąganie, osłabienie tworzenia blizny, możliwość działania z czynnikami wzrostu neuronów i tworzenia sieci połączeń synaptycznych. Warto podkreślić, że w przypadku nanorurek stwierdzono przyrost wartości impulsów nerwowych [Telford 2005, Stodolak i in. 2010]. Nanorurki węglowe stanowią również nośnik o zdolnościach transportu dkomórkowego cząstek aktywnych biologicznie [Bużańska i in. 2015].

Do bardziej wymagających napraw nerwów stosowane są komórki zamykane w matrycach hydrożelowych. Do światła hydrożelowej rurki za pomocą mikroiniekcji wprowadza się kolagen, który pokrywa wewnętrzne światło mikrokolumny, a powłokę zewnętrzną stanowi agaroz. W pustym rdzeniu mikrorurki dochodzi do procesów regeneracyjnych. Fenomen rurek hydrożelowych polega na zapewnieniu równomiernego i ciągłego wzrostu komórek Schwanna w całym świetle implantu [Panzer i in. 2020].

Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach wypróbowano wiele różnych materiałów, które mogą zostać użyte do sprawnej regeneracji nerwów. Największą nadzieję pokłada się we wszczepach o kształcie rurek, których wnętrze jest przystosowane do warunków potrzebnych do odbudowy nerwów. Prowadzone są prace nad wstępnie uformowaną, wszczepialną, wyłożoną odpowiednimi komórkami mikrokątką, która naśladuje anizotropową strukturę i funkcję naturalnie występujących pasm.

Piśmiennictwo

- Bużańska L., Zychowicz M., Sarnowska A., 2015. Technologie XXI wieku i komórki macierzyste w badaniach i terapii schorzeń neurologicznych. *Wszechświat* 116(1–3), 31–39.
- Haftek J., 1970. Stretch injury of peripheral nerves. Acute effects of stretching on rabbit nerve. *J. Bon. J. Surg* 52(2), 354–365.
- Hall S., 2001. Nerve repair: a neurobiologist's view. *J. Hand Surg.* 26(2), 129–136. <https://doi.org/10.1054/jhsb.2000.0497>
- Hazari A., Wiberg M., Johansson-Rudén G., Green C., Terenghi G.L., 1999. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve auto-graft in nerve gap repair. *Brit. J. Plastic Surg.* 52(8), 653–657. <https://doi.org/10.1054/bjps.1999.3184>
- Heiduschka P., Thanos S., 1998. Implantable bioelectronic interfaces for lost nerve functions *Prog. Neurobiol.* 55(5), 433–461. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00013-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00013-6)
- Itoh S., Takakuda K., Kawabata S., Aso Y., Kasai K., Itoh H., Shinomiya K., 2002. Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. *Biomaterials* 23(23), 4475–4481. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00166-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00166-7)

- Nakamura T., Inada Y., Fukuda S., Yoshitani M., Nakada A., Itoi S., Kanemaru S., Endo K., Shimizu Y., 2004. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res.* 1027(1–2), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.040>
- Panzer K.V., Burrell J.C., Helm K.V.T., Purvis E.M., Zhang Q., Le A.D., O'Donnel J.C., Cullen K.D., 2020. Tissue engineered bands of Büngner for accelerated motor and sensory axonal outgrowth. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 580654. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.580654>
- Stodolak E., Frączek-Szczypta A., Błażewicz M., 2010. Nanokompozyty polimerowe do zastosowań medycznych. *Kompozyty* 10(4), 322–327.
- Szarek D., Jarmundowicz W., Frączek A., Błażewicz S., 2006. Biomateriały w leczeniu pourazowych ubytków nerwów obwodowych – przegląd metod i materiałów. *Inż. Biomat.* 9(56–57), 40–53.
- Telford M., 2005. Carbon nanotubes boost neural signaling. *Mater. Today* 8(8), 7. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)71015-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(05)71015-4)
- Williams L.R., Longo F.M., Powell H.C., Lundborg G., Varon S., 1983. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J. Comparat. Neurol.* 218(4), 460–470. <https://doi.org/10.1002/cne.902180409>
- Yuan Y., Zhang P., Yang Y., Wang X., Gu X., 2004. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 2004, 25(18), 4273–4278. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.029>

Zastosowanie hydrożeli w farmacji i medycynie

Karolina Pniaczek^{1*}, Małgorzata Kowalczyk¹, Joanna Wessely-Szponder²,
Tomasz Szponder³, Beata Drzewiecka², Dominika Nguyen Ngoc²

¹ Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
*e-mail: karolinapniaczek626@gmail.com

² Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³ Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet
Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Układy koloidalne, w których fazą rozproszoną jest woda, a fazę rozpraszającą stanowią na ogół polimery naturalne, sztuczne lub ich modyfikacje, nazywane są hydrożelami. Aby przezwyciężyć ograniczenia zwykłych postaci leków, związane z ich dystrybucją w organizmie i rozłożonym w czasie uwalnianiem, wprowadzono systemy kontrolowanego dystrybuowania leków. Obiecujące właściwości hydrożeli sprawiają, że stają się one oczekiwaną alternatywą w drogach podawania środków leczniczych. Główną zaletą hydrożeli jest możliwość długotrwałego uwalniania zawartej w lekach substancji czynnej o wysokim stężeniu. Opatrunki hydrożelowe do zabezpieczania ran są bardzo użyteczne, umożliwiają stałe nawilżenie rany i szybkie schłodzenie miejsca urazu, zapewniają też czasowe zmniejszenie bólu. Opatrunek hydrożelowy, zapewniający wilgotne środowisko, ma wiele korzyści w porównaniu z tradycyjną gazą. Warunki uzyskane po jego zastosowaniu przyspieszają gojenie, ułatwiają bezbolesną zmianę opatrunku i zapobiegają pozostaniu trudno usuwalnych fragmentów materiału na ranie. Substancja lecznicza podana w systemie transdermalnym jest uwalniana ze stałą szybkością, omija w znacznym stopniu metabolizm wątrobowy i łatwo można przerwać jej działanie przez eliminację. Ponadto dzięki dużej zawartości wody pęczniejące hydrożele są przyjemniejsze w użyciu niż konwencjonalne maści. Tempo i zasięg przenikania leku przez skórę można kontrolować, dobierając odpowiednio substancje pomocnicze. Badania nad cukrzycą typu I na modelu mysim wykazały, że hydrożel zapewnił odpowiednie warunki dla rozwoju przeszczepionych komórek wysp trzustkowych. Hydrożele dają nadzieję na udoskonalenie drogi podawania leków, komfort gojenia i opatrywania ran oraz leczenie cukrzycy insulinozależnej.

Wstęp

Hydrożele są koloidami, w których fazą rozproszoną jest woda, a fazą rozpraszającą są polimery naturalne, sztuczne, jak również ich modyfikacje. Wyodrębniono hydrożele fizyczne, chemiczne i biochemiczne. Hydrożele fizyczne przechodzą z fazy ciekłej do żelowej w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe, w tym temperaturę, stężenie jonów lub odczyn pH. Występujące w hydrożelach chemicznych wiązanie kowalencyjne skutkuje mechaniczną integralnością i opornością na degradację, natomiast w przypadku żeli biochemicznych w procesie żelowania istotne znaczenie mają enzymy lub aminokwasy [Kędzierska i in. 2019].

Znaczenie hydrożeli jako systemów kontrolowanej dystrybucji preparatów leczniczych

Systemy kontrolowanej dystrybucji są wykorzystywane do transportu preparatów leczniczych w organizmie do miejsc docelowych oraz uwalniania ich w określonym tempie, aby zapewnić wysokie stężenie substancji czynnej w określonym miejscu w długim czasie. Właściwości hydrożeli sprawiają, że materiały te stanowią innowację w sposobie dostarczania leków. Można wykorzystać je w doustnych systemach uwalniania leków. Hydrożel z usieciowanej 1-winylo-2-pirolidonem albuminy został oceniony pod względem zachowania przy zmieniających się wartościach pH. W przypadku hydrożelowego systemu opartego na kopolimerze N-winylopirolidonu z kwasem akrylowym i polietylenoglikolem potwierdzono zdolność powolnego pęcznienia w kwaśnym środowisku soku żołądkowego w celu przedłużenia czasu przebywania leku w żołądku. Superporowate hydrożele szybko pęcznią z powodu napływu wody przez otwarte pory [Pepas i in. 2000, Amiji i in. 1997]. System hydrożelowy może być użyty do podania antybiotyku w leczeniu miejscowego zakażenia we wrzodzie trawiennym żołądka wywołanym przez *Helicobacter pylori*. Kationowe hydrożele wrażliwe na pH, w postaci wzajemnie przenikających się sieci, złożone były ze zliofilizowanego chitozanu i politlenku etylenu. Pęczniały one i uwalniały antybiotyki zależnie od pH środowiska, w którym się znajdowały [Stauffer i Peppast 1992]. Z kolei preparat leczniczy podany transdermalnie uwalniał się ze stałą szybkością, a ponadto w znacznym stopniu omijał metabolizm wątrobowy. Dzięki dużej zawartości wody pęczniące hydrożele mają lepsze właściwości pielęgnacyjne w porównaniu z konwencjonalnymi maściami, a przez właściwy dobór substancji pomocniczych można kontrolować szybkość i stopień przenikania leku przez skórę [Bures i in. 2001].

W leczeniu ran wykorzystanie opatrunków hydrożelowych przynosi wiele korzyści, szczególnie w porównaniu z obecnie powszechnie stosowanymi opatrunkami z gazy. Do ich zalet można zaliczyć przyspieszenie procesu gojenia, łatwiejszą i bezbolesną zmianę opatrunku, a także niwelowanie ryzyka pozostawienia w ranie trudnych do usunięcia fragmentów materiału opatrunkowego. Stanowią one trzecią, najnowocześniejszą generację materiałów opatrunkowych, do której należą materiały otrzymywane z wodnej mieszaniny polimerów naturalnych, takich jak agar, żelatyna czy pektyna, oraz syntetycznych, jak glikol polietylenowy. Zapobiegają nadmiernej utracie płynów ustrojowych, tworzą barierę przed zakażeniem, zwalczają ból, nie przyklejają się do rany i nie utrudniają tworzenia nowej tkanki, nie są immunogenne i alergizujące. Hydrożel zwykle występuje jako mieszanina związków wielkocząsteczkowych, zawiera najczęściej 2–20% polimerów syntetycznych, do 5% polimerów naturalnych, 1–3% odpowiedniego plastyfikatora oraz około 75% wody. Usieciowany polimer o grubości 3–4 mm ma właściwą elastyczność, wytrzymałość mechaniczną, można go sterylizować radiacyjnie. Z powodu powyższych właściwości stanowi opatrunek przyspieszający gojenie ran, głównie powstałych po oparzeniach, owrzodzeń troficznych i odleżyn [Pluta i in. 2004].

Trwają badania nad wprowadzeniem hydrożeli do leczenia cukrzycy insulinozależnej, przewlekłej choroby metabolicznej. Najczęstszą jej przyczyną jest toczący się proces autoimmunologiczny, w którym układ odpornościowy atakuje i niszczy zdrowe komórki trzustki, przez co nie wydziela ona hormonu regulującego stężenie cukru, czyli insuliny. Od końca lat 90. XX wieku trwają badania nad przeszczepem komórek wysp trzustkowych pacjentom z upośledzonym wytwarzaniem insuliny w trzustce. Pomimo że początkowe wyniki były optymistyczne, pacjenci musieli wracać do zastrzyków z insuliny. Procedura podawania przeszczepianych komórek bezpośrednio do naczyń krwionośnych skutkowała tym, że połowa z nich obumierała po kontakcie z krwią pacjenta. Naukowcy z Georgia Tech opracowali polimerowy hydrożel wzbogacony w czynniki wzrostowe, który w pierwszym etapie ochrania przeszczepiane komórki, a następnie, rozkładając się w kontrolowany sposób, wspomaga angiogenezę w celu wytworzenia nowych naczyń krwionośnych i zapewnienia odżywiania tych komórek. Badania prowadzone były na myszach laboratoryjnych. Najlepsze wyniki notowano podczas wszczepiania komórek wysp trzustkowych do zewnętrznej ściany jelita cienkiego. Po czterech tygodniach od zabiegu poziom glukozy u myszy, które leczono nową metodą, pozostawał w normie, komórki trzustkowe funkcjonowały prawidłowo i były tak dobrze ukrwione, jak miało to miejsce u zdrowych zwierząt. Dotychczas przeprowadzone eksperymenty nie brały jednak pod uwagę możliwej reakcji układu immunologicznego, gdyż testowane myszy były genetycznie identyczne, bez ryzyka odpowiedzi układu odpornościowego w postaci odrzucenia przeszczepu [Phelps i in. 2013]. Dlatego przed wprowadzeniem testów klinicznych u ludzi wymagane będzie badanie na myszach różnych genetycznie.

Podsumowanie

Hydrożele to wszechstronne materiały wykorzystywane do kontrolowanego uwalniania leków i leczenia ran. Dzięki swojej zdolności do reagowania na zmienne warunki środowiskowe oraz różne typy wiązań (chemiczne i biochemiczne) są obiecującym narzędziem w medycynie. Mogą poprawić skuteczność terapii poprzez precyzyjne uwalnianie substancji czynnych w odpowiednim miejscu i czasie. Badania nad ich zastosowaniem w terapii cukrzycy insulinozależnej są obiecujące, ale wymagają dokładnej analizy reakcji ze strony układu immunologicznego przed wprowadzeniem badań klinicznych u ludzi.

Piśmiennictwo

- Amiji M., Tailor R., Ly M.-K., Goreham J., 1997. Gelatin-poly(ethylene oxide) semi-interpenetrating polymer network with pH-sensitive swelling and enzyme-degradable properties for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23(6), 575–582. <https://doi.org/10.3109/03639049709149822>
- Bures P., Huang Y., Oral E., Peppas N.A., 2001. Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical pharmaceutical applications. *J. Control. Release* 72(1–3), 25–33. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00259-0](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00259-0)
- Kędzierska M., Miłowska K., 2019. Zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w leczeniu trudno gojących się ran. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 73, 768–781.
- Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50(1), 27–46. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(00)00090-4).
- Phelps E.A., Headen M.D., Taylor W.R., Thulé P.M., García A.J., 2013. Vasculogenic bio-synthetic hydrogel for enhancement of pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Biomaterials* 34(19), 4602–4611. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.012>
- Pluta J., Karolewicz B., 2004. Hydrożele: właściwości i zastosowanie w technologii postaci leku. II. Możliwości zastosowania hydrożeli jako nośników substancji leczniczych. *Polim. Med.* 34(3), 63–81.
- Stauffer S.R., Peppas N.A., 1992. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. *Polymer* 33(18), 3932–3936. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90385-A](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90385-A)

Badanie biogodności biomateriałów

Wiktoria Pochwała*¹, Joanna Wessely-Szponder ², Tomasz Szponder ³,
Dominika Nguyen Ngoc ², Beata Drzewiecka ²

¹ Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
*e-mail: wiktoria.pochwala@op.pl

² Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³ Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Biogodność biomateriałów to kluczowy aspekt w medycynie, wymagający kompleksowej oceny. Obejmuje ona zdolność biomateriału do współpracy z organizmem bez wywoływania negatywnych skutków. Aby dokładnie ocenić biogodność, stosuje się badania *in vitro* oraz *in vivo*. Badania *in vitro* pozwalają określić wpływ biomateriału na poziomie komórek, obejmując m.in. cytotoksyczność, czyli zdolność materiału do wywołania uszkodzeń lub śmierci komórek, oraz genotoksyczność identyfikującą potencjalne uszkodzenia genetyczne. Badania *in vivo*, przeprowadzane na zwierzętach doświadczalnych, oceniają zachowanie biomateriału w środowisku organizmu. Uwzględniają reakcje zapalne, odpowiedzi hormonalne, interakcje z komórkami i białkami oraz procesy degradacji biomateriału. Ocena degradacji biomateriałów jest kluczowa, ponieważ może prowadzić do uwalniania substancji toksycznych lub wpływać na właściwości mechaniczne materiału.

Wstęp

Zarówno wszczepy, jak i naturalne tkanki organizmu muszą mieć pewne właściwości fizyczne oraz biologiczne, by spełniać swoją rolę. Charakteryzują się wytrzymałością na czynniki mechaniczne, takie jak ściskanie, rozciąganie i tarcie, oraz sprężystością, a przede wszystkim odpornością na obciążenia. Implant, w zależności od miejsca docelowego umieszczenia, musi mieć odpowiednią strukturę, by dopasować się do okolicznych tkanek.

Biogodność materiałów stosowanych w leczeniu, rekonstrukcji lub zastępowaniu tkanek oznacza, że materiały te muszą posiadać odpowiednie właściwości, które pozwalają na ich bezpieczne oddziaływanie z żywym organizmem.

Biozgodność to zdolność materiału do wykonywania swojej funkcji w sposób akceptowalny przez organizm gospodarza w konkretnym zastosowaniu. Badania *in vitro* umożliwiają ocenę wpływu biomateriału na organizm przez określenie odpowiedzi na poziomie komórkowym, sprawdzając jego cytotoksyczność i genotoksyczność [Liber-Kneć i Łagan 2020].

W analizie biozgodności należy ocenić możliwą adhezję komórek gospodarza do powierzchni materiału, ich morfologię, żywotność, liczbę martwych komórek oraz zdolność do proliferacji. Konieczne jest również wykluczenie toksyczności za pomocą testów jakościowych oraz ilościowych, tj. dyfuzja w agarze, kontakt bezpośredni oraz testy na ekstraktach tkankowych. Trzeba mieć na uwadze to, że obecność implantu jest to wprowadzenie ciała obcego do organizmu żywego i mimo zachowania poprawności procedur mogą wystąpić działania niepożądane [Świczko-Żurek 2009]. Badania *in vitro* pozwalają na wstępną ocenę biozgodności materiału na poziomie komórkowym, ale pełna ocena interakcji biomateriału z żywym organizmem wymaga przeprowadzenia badań *in vivo* [Liber-Kneć i Łagan 2020].

Cytotoksyczność

Materiał toksyczny to substancja, która może uwolnić wystarczającą ilość związku chemicznego, aby zabić komórki – bezpośrednio lub pośrednio – poprzez hamowanie głównych dróg metabolicznych. Testy cytotoksyczności są podstawowymi testami stosowanymi w badaniach biokompatybilności biomateriałów, szczególnie przy wprowadzaniu nowego materiału. W tych testach ocenia się, czy materiał wykazuje toksyczne działanie na komórki organizmu biorcy. Do tego celu wykorzystuje się linie komórkowe, takie jak osteoblasty, chondroblasty, chondrocyty, fibroblasty i komórki nabłonkowe. Komórki te są bardzo wrażliwe na działanie potencjalnie szkodliwych substancji, dlatego stanowią dobre narzędzie do oceny cytotoksyczności materiałów [Błażewicz i Marciniak 2016].

Aktywność cytotoksyczna oceniana jest przez pomiar zmian zachodzących w komórce pod wpływem badanego materiału lub wyekstrahowanych z niego substancji. Wyniki te są porównywane z kontrolną hodowlą komórek, która nie miała kontaktu z badanym materiałem. Istnieje wiele różnych testów cytotoksyczności, opierających się na:

1. Ocenie żywotności komórek i rodzajach ich śmierci,
2. Ocenie morfologii komórek,
3. Szacunku zdolności komórek do przylegania do biomateriału,
4. Analizie zdolności komórek do podziału,
5. Ocenie aktywności enzymatycznej komórek [PN-EN ISO 10993-5:2009].

Genotoksyczność

Genotoksyczność to cecha środka chemicznego, fizycznego lub biologicznego, który wchodzi w interakcję z materiałem genetycznym, powodując uszkodzenia DNA lub składników regulujących DNA. Badania genotoksyczności są kategoryzowane w zależności od rodzaju kontaktu materiału z ciałem i czasu trwania tego kontaktu. Mają na celu wykrycie substancji, które mogą powodować uszkodzenia genetyczne na drodze bezpośredniej lub pośredniej w komórkach narażonych na kontakt z substancjami toksycznymi, nazywanymi genotoksynami [Ribeiro i in. 2007].

Działanie genotoksyczne może objawiać się poprzez:

1. Mutacje genów – zmiany w sekwencji DNA, które mogą prowadzić do błędów genetycznych,
2. Aberracje chromosomowe – nieprawidłowości w strukturze lub liczbie chromosomów,
3. Wpływ na DNA – inne szkodliwe efekty na materiale genetycznym [Philips i Volker 2009].

W badaniach genotoksyczności wykorzystuje się różne metody, w tym testy *in vitro* przy użyciu bakterii, drożdży lub linii komórkowych ssaków. Nie istnieje jednak pojedynczy test *in vitro* zdolny wykryć wszystkie rodzaje efektów genotoksycznych, dlatego często stosuje się zestaw różnych testów, z których rekomendowane to:

1. Test mutacji genu chłoniaka myszy – preferowany, ponieważ wykrywa szeroki zakres mechanizmów genotoksycznych związanych z mutagennością i kancerogenezą (OECD 490),
2. Test aberracji chromosomowej *in vitro* – ocenia nieprawidłowości w strukturze chromosomów,
3. Test mikrojądrowy *in vitro* – służy do wykrywania mikrojąder w komórkach, co może wskazywać na efekty genotoksyczne [Liber-Kneć i Łagan 2020].

Badanie procesów degradacji

W ocenie przydatności materiałów na wyroby medyczne niezwykle istotne jest zrozumienie procesów degradacji, które mogą wystąpić w kontakcie z organizmem ludzkim. Materiały w sytuacji, gdy są wystawione na działanie środowiska biologicznego, mogą ulegać zmianom, które wpływają na ich właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne.

Procesy degradacji materiałów mogą wynikać z różnych czynników, takich jak:

- zużycie mechaniczne – procesy mechanicznego zużycia materiałów mogą prowadzić do uwalniania ich cząstek,

- uwalnianie substancji chemicznych – materiały mogą ulegać procesom wymywania, rozpadu chemicznego lub korozji, co może skutkować uwalnianiem wolnych jonów lub innych substancji chemicznych [Liber-Kneć i Łagan 2020].

Produkty degradacji mogą być reaktywne lub stabilne. Stabilne produkty nie reagują z organizmem, ale ich kumulacja może wpływać na tkanki. Mogą pozostawać w miejscu ich powstania lub migrować w organizmie.

Badania degradacji materiałów są niezbędne w przypadku wyrobów medycznych – biodegradowalnych, przeznaczonych do implantacji na okres dłuższy niż 30 dni, lub gdy istnieje uzasadnione podejrzenie uwalniania toksycznych substancji do organizmu podczas użytkowania. Jednak w pewnych sytuacjach badania degradacji mogą nie być konieczne, zwłaszcza jeśli przyjmuje się, że potencjalne produkty rozpadu mają te same właściwości, przewidywalną ilość i tempo uwalniania, a ich właściwości fizyczne (rozmiar, kształt, rozmieszczenie) są podobne do produktów o potwierdzonym wcześniej bezpieczeństwie klinicznym [PN-EN ISO 10993-1:2009].

Ocena procesów degradacji może być przeprowadzana w badaniach *in vitro*, które odwzorowują warunki, w jakich wyrób medyczny będzie używany. Jeśli cały implant może być poddany badaniom, należy przygotować reprezentatywną próbkę, która umożliwi maksymalną ekspozycję wszystkich istotnych komponentów wyrobu medycznego z punktu widzenia odpowiedzi biologicznej.

Badania degradacji mogą być również przeprowadzane z wykorzystaniem ekstraktów z badanych materiałów. Proces ekstrakcji podlega określonym warunkom, takim jak czas, temperatura, stosunek masy lub powierzchni materiału do objętości środka ekstrakcyjnego. Wykorzystuje się zarówno media polarne (np. woda destylowana, roztwór soli fizjologicznej), jak i niepolarne (np. oleje roślinne), a także mieszaniny (np. etanol/woda) [Liber-Kneć i Łagan 2020].

Badania *in vivo*

Badania *in vivo* przeprowadzane na zwierzętach doświadczalnych pozwalają ocenić oddziaływanie biomateriału na różne typy komórek, reakcję na czynniki hormonalne, interakcje z macierzą zewnątrzkomórkową, komórkami krwi, białkami i innymi molekułami. Dzięki tym badaniom możliwe jest określenie ogólnych i lokalnych reakcji tkanek na implant, procesu gojenia, a także zmian w samym implancie. Badania *in vivo* dostarczają także ogólnych informacji na temat tego, czy dany materiał lub implant działa zgodnie z przeznaczeniem i nie powoduje szkód.

Wstępna ocena biomateriałów *in vivo* zwykle obejmuje ocenę reakcji zapalnej i odpowiedzi organizmu na wszczepiony materiał. Przy planowaniu takich badań należy uwzględnić wiele czynników, takich jak dobór odpowiednich zwierząt doświadczalnych, rodzaj techniki operacyjnej (w zależności od funkcji i miejsca

wszczepienia implantu), rodzaj badań pooperacyjnych (ocena ogólnego i miejscowego wpływu wszczepionego materiału), rodzaj badań patomorfologicznych oraz obserwacje śródoperacyjne.

Badania nad miejscowym odczynem po implantacji polegają na analizie tkanek otaczających implant oraz samego implantu w określonym czasie po wszczepieniu. Opierają się one na preparatach histologicznych i mikroskopowych. W trakcie analizy preparatów histologicznych dokonuje się oceny wielu parametrów, w tym:

1. Stopnia zwłóknienia tkanki otaczającej implant oraz obecności stanu zapalnego,
2. Zmian morfologicznych w tkankach, takich jak ich struktura i wygląd,
3. Liczby i dystrybucji komórek zapalnych w tkankach, takich jak granulocyty, limfocyty, makrofagi oraz komórki plazmatyczne,
4. Obecności, zasięgu i rodzaju martwicy tkanek,
5. Innych parametrów tkankowych, takich jak unaczynienie, obecność tłuszczu, tworzenie ziarnin i kości,
6. Parametrów samego materiału implantacyjnego, w tym fragmentacji i/lub obecności cząstek, formy i lokalizacji pozostałości po degradacji,
7. Przerastania tkanek implantów porowatych i biodegradowalnych [Kościelniak-Ziemniak i in. 2013].

Badania *in vivo* prowadzone zgodnie z ISO 10993 obejmują również testy toksyczności ogólnoustrojowej, które służą ocenie wpływu substancji chemicznych uwalnianych z implantu na narządy wewnętrzne i tkanki odległe od miejsca implantacji, takie jak wątroba, serce, nerki itp. oraz wpływu na ogólny stan zdrowia organizmu. W celu przeprowadzenia tych ocen wykorzystuje się różne metody, takie jak:

- obserwacja objawów klinicznych,
- badania hematologiczne,
- analiza moczu,
- badania biochemiczne,
- badania histopatologiczne.

Ustanowiono cztery kategorie toksyczności w zależności od czasu, w jakim pojawiają się negatywne objawy po podaniu substancji badanej:

- ostra – objawy występują w ciągu pierwszych 24 godzin,
- podostra – objawy pojawiają się między 24. godziną a 14. dniem,
- subchroniczna – objawy występują między 14. a 28. dniem,
- chroniczna – objawy utrzymują się od 6 do 12 miesięcy.

W przypadku wyrobów medycznych konieczne jest przeprowadzenie testów w celu oceny działania drażniącego i uczulającego na skórę. Badania te mają na celu zidentyfikowanie potencjalnych związków chemicznych, które mogą powodować podrażnienia skóry, błon śluzowych i oczu, a także wywoływać uczulenia skóry. Testy drażniącego działania są przeprowadzane na królikach albinosach – badaniom poddawane są próbki wyrobu medycznego lub ekstrakty z materiałów

w formie płynu i proszku. Kontakt materiału z badaną skórą królika musi trwać co najmniej 4 godziny, a obserwacje przeprowadza się po 1, 24, 48 i 72 godzinach. Ocenia się wystąpienie reakcji skórnych, takich jak obrzęk i rumień, obliczając wskaźnik pierwotnego podrażnienia.

Podsumowanie

Biozgodność biomateriałów w medycynie to kluczowy element, który wymaga kompleksowej oceny. Badania biozgodności wykorzystują metody *in vitro* oraz *in vivo*. Badania *in vitro* pozwalają ocenić wpływ biomateriału na poziomie komórek, sprawdzając jego cytotoksyczność i genotoksyczność. Badania *in vivo* przeprowadzane na zwierzętach doświadczalnych oceniają zachowanie biomateriału w środowisku organizmu, uwzględniając reakcje zapalne, odpowiedzi hormonalne, interakcje z komórkami i procesy degradacji biomateriału. Ocena degradacji biomateriałów jest kluczowa, ponieważ może wpływać na uwalnianie substancji toksycznych oraz właściwości mechaniczne materiału. Badania biozgodności stanowią istotny etap w zapewnieniu bezpieczeństwa i skuteczności biomateriałów w medycynie, wspierając rozwijające się innowacje w tej dziedzinie.

Piśmiennictwo

- Błażewicz S., Marciniak J., 2016. Biomateriały. Akad. Oficyna Wyd. EXIT.
- Kościelniak-Ziemniak M., Janiczak K., Kustosz R., Gonsior M., 2013. Ocena wpływu oddziaływania polimerów konstrukcyjnych pompy ReligaHeart EXT na składniki czerwonej krwi. *Postępy Inż. Biomed.* Rzeszów, 57–62.
- Liber-Kneć A., Łagan S., 2020. Metody badań biomateriałów i tkanek – wstęp do ćwiczeń laboratoryjnych. Wyd. PK, Kraków.
- Philips D.H., Volker M.A., 2009. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS* 99, 87–110. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8336-7_4
- PN-EN ISO 10993-1:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem.
- PN-EN ISO 10993-5:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*.
- PN-EN ISO 10993-10:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 10: Badania działania drażniącego i działania uczulającego na skórę.
- Ribeiro D.A., Matsumoto M.A., Marques Padovan L.E., Alencar Marques M.E., Fávero Salvadori D.M., 2007. Genotoxicity of corrosion eluates obtained from endosseous implants. *Implant Dent.* 16(1), 101–109. <https://doi.org/10.1097/id.0b013e3180327663>
- Świczko-Żurek B., 2009. Biomateriały. Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk.

Zagrożenia dla organizmu wywołane biofilmem bakteryjnym na biomateriałach

Antonina Krawczyk*, Dominika Nguyen Ngoc 

Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

*e-mail: tosiakr@gmail.com

Streszczenie

Biomateriały znalazły szerokie zastosowanie w nowoczesnej medycynie. Są materiałami w postaci stałej, żelowej lub ciekłej i mają kontakt z tkankami żywego organizmu ludzkiego bądź zwierzęcego. Ich zadaniem jest uzupełnienie lub zastąpienie tkanek narządu albo jego części. Pełnią różne funkcje, m.in. protezy, opatrunków, różnorodnych implantów. W Polsce około 500 tys. ludzi posiada rozrusznik serca, a co roku przeprowadza się około 90 tys. operacji endoprotez stawów. Obecnie materiałami najszerzej stosowanymi w medycynie są polimery, następnie metale i ich stopy, materiały kompozytowe, ceramiczne, a grupą o najmniejszym zastosowaniu są materiały węglowe. Wykorzystanie szerokiej gamy materiałów przeznaczonych do użytku wewnętrznego stwarza ogromne szanse na leczenie kolejnych chorób i poprawianie komfortu życia pacjentów. Z drugiej strony materiały te są narażone na zakażenia bakteryjne, które są trudne do wykrycia i wyleczenia bez konieczności wymiany całego elementu czy urządzenia, czyli ponownej operacji obciążającej organizm chorego.

Tworzenie się biofilmu bakteryjnego na powierzchni biomateriałów jest szczególnym rodzajem zakażenia bakteryjnego. Biofilm to wielokomórkowa struktura, w której bakterie tworzą swego rodzaju mikrośrodowisko, w którym są odporne na działanie czynników zewnętrznych, w tym na antybiotyki. Formowanie się biofilmu rozpoczyna się od pojedynczych komórek, które z pozoru mogą wydawać się niegroźne dla organizmu. W dalszych etapach rozwoju biofilmu metabolizm bakterii zmienia się, umożliwiając adhezję kolejnych komórek, wytwarzane są peptydoglikany zewnątrzkomórkowe podtrzymujące strukturę biofilmu oraz egzopolisacharydy ochraniające komórki. Biofilmy tworzone są przede wszystkim przez bakterie Gram-ujemne, często patogenne, takie jak *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., oraz Gram-dodatnie, takie jak *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Powstały biofilm może być źródłem infekcji organizmu gospodarza, utrudnia też gojenie się ran pooperacyjnych. Ze względu na trudności z usuwaniem już powstałego biofilmu obecnie poszukuje się głównie rozwiązań

mających na celu zapobieganie jego powstawaniu. Jest to między innymi zmniejszanie porowatości materiałów, pokrywanie ich substancjami zmniejszającymi właściwości adhezyjne komórek bakteryjnych czy nasycanie związkami przeciwdrobnoustrojowymi hamującymi wzrost bakterii.

Poszukiwanie nowych rozwiązań w celu poprawy właściwości antybakteryjnych pozwoli na rozwój możliwości związanych z wykorzystaniem biomateriałów w medycynie i zwiększy bezpieczeństwo ich stosowania.

Wstęp

Chociaż pojęcie implantu znane jest ludzkości od 2000 lat, to dziedzina nowoczesnych biomateriałów rozwija się od zaledwie 50 lat. Pierwsze biomateriały zastępowały uszkodzone części ciała. Rozwój medycyny pozwolił na opracowanie biomateriałów nowej generacji. Obecnie biomateriały służą również jako nośniki leków czy naśladują naturalne procesy zachodzące w organizmie [Ratner i Bryant 2004]. W środowisku naturalnym bakterie mogą występować i rosnąć jako pojedyncze kolonie lub formować złożone struktury nazywane biofilmem. Biofilm można opisać jako pewnego rodzaju mikrośrodowisko, w którym zmiany ulega m.in. metabolizm bakterii. Zwiększa się również ich odporność na niekorzystne warunki środowiska. Szczególnym wyzwaniem dla medycyny okazują się infekcje powodowane biofilmem. Często są przewlekłe lub nawracające ze względu na utrudnione wnikanie leków w głąb struktury biofilmu [Bjarnsholt i in. 2013]. Szacuje się, że do 2050 roku nawet 10 mln ludzi rocznie będzie umierać z powodu zakażeń lekoopornymi bakteriami. Duża część z nich może być związana z biofilmem [Li i in. 2023].

Biomateriały

Biomateriał to materiał stworzony w celu interakcji z komponentami żywych organizmów i używany w procedurach terapeutycznych lub diagnostycznych w medycynie bądź weterynarii [Williams 2009]. Pierwsza generacja biomateriałów przeznaczonych do stosowania wewnątrz ciała została opracowana w latach 70. XX wieku. Poznanie i zrozumienie właściwości i funkcjonowania tkanek pozwoliło na zaadaptowanie istniejących materiałów do leczenia i poprawiania jakości życia pacjentów. Wybierano i modyfikowano różnego rodzaju materiały w celu uzyskania jak największej obojętności dla organizmu. Szczególnie ważna była ich nietoksyczność i właściwości antykorozyjne. Przy stworzeniu drugiej generacji biomateriałów nastąpiła zmiana podejścia do sposobu, w jaki wpływały na organizm. W medycynie rozpoczęto stosowanie materiałów bioaktywnych, które oddziaływały w sposób pozytywny na zdrowie pacjentów, np. poprzez łączenie się z tkanką kostną w celu poprawy mocowania implantów. W XXI wieku powstało wiele rozwiązań wykorzystujących biomateriały. Są one projektowane

w celu stymulowania specyficznych odpowiedzi komórkowych, opracowano również materiały resorbowalne. Nastąpił także rozwój inżynierii tkankowej, gdzie wykorzystuje się biokompozyty w regeneracji uszkodzonych tkanek, m.in. jako rusztowania do hodowli komórek [Hench i Thompson 2010]. Obecnie dostępne na rynku biomateriały są oparte na naturalnych biopolimerach, takich jak kolagen, elastyna, fibryny, polipeptydy, polisacharydy, siarczany chondroityny, bądź syntetycznych, takich jak poliestry, poliglikolidy, poliuretany, polilaktydy [Nair i Laurencin 2007].

Do głównych zastosowań biomateriałów w medycynie należą wymienione poniżej:

1. Opatrunki ran powstałych w wyniku różnych urazów czy zabiegów medycznych – złożoność i trudność gojenia niektórych urazów wymaga zastosowania opatrunków o odpowiednich właściwościach, takich jak hydrożele, pianki czy tekstylia wzbogacone o leki i nanocząsteczki. Wpływają pozytywnie na proliferację komórek, co przyspiesza gojenie ran [Niculescu i Grumezescu 2022].
2. Implanty zastępujące brakujące lub uszkodzone części ciała – wykonane z metalu, materiałów ceramicznych, silikonowych i szklanych. Są to między innymi implanty zębów, stawów, piersi [Baran i in. 2013].
3. Urządzenia elektroniczne – urządzenia wykonane z materiałów nietoksycznych (inertnych) dla organizmu, wprowadzane do niego w celu wspomagania procesów w nim zachodzących. Są to między innymi rozruszniki serca, aparaty słuchowe, automatyczne systemy dostarczania leków [Hanker i Giammara 1988].
4. Rusztowania do hodowli tkankowych – jako rusztowania dla hodowli komórkowych w medycynie regeneracyjnej najczęściej wykorzystuje się kolagen bądź materiały syntetyczne modyfikowane przez różne nanoformy, np. nanorurki węglowe, które są mniej immunogenne niż materiały naturalne. Materiały syntetyczne mogą wykazywać dodatkowe właściwości, takie jak przewodnictwo elektryczne, które może być pomocne w stymulowaniu wzrostu komórek [Saito i in. 2009].

Biofilm bakteryjny

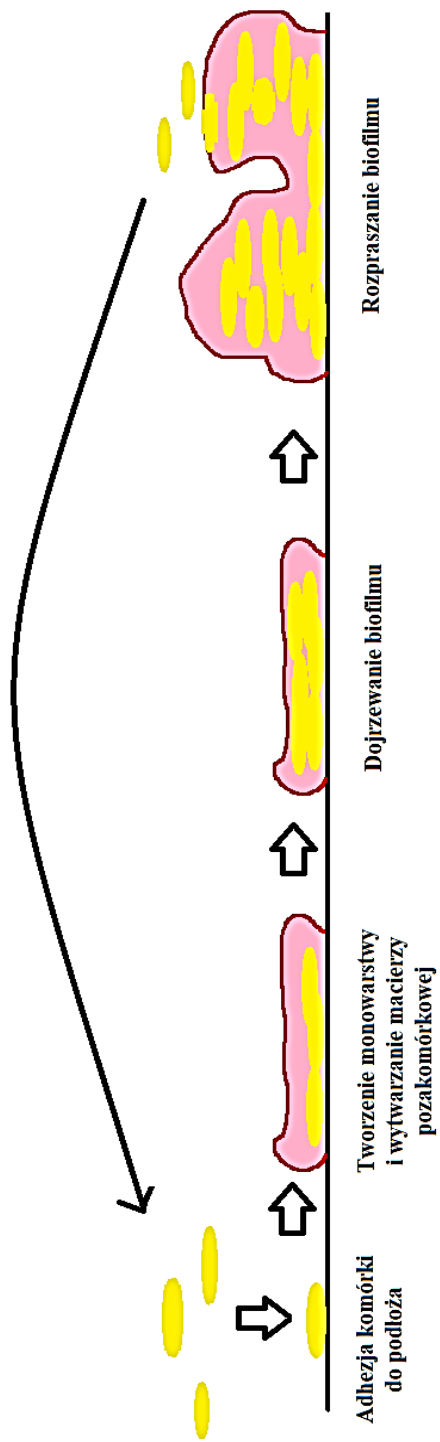
Od wielu lat obserwuje się występowanie przewlekłych, trudnych do wyleczenia infekcji bakteryjnych. Dopiero w latach 70. XX wieku zauważono, że bakterie tworzą grupy komórek, które żyją we wspólnej macierzy pozakomórkowej, złożonej z egzopolisacharydów. Biofilm występuje przy zakażeniach pojawiających się w narządach oraz na różnego rodzaju implantach i urządzeniach, które znajdują się wewnątrz ciała. Biomateriały ze względu na bezpośredni kontakt z tkankami są szczególnie narażone na różnego rodzaju infekcje [Costerton 1999]. Biofilm bakteryjny obserwowano na różnego rodzaju implantach usuniętych od pacjentów, takich jak zastawki serca, protezy stawów, cewniki, oraz na urządzeniach wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych [Donlan 2001].

Biofilm bakteryjny jest dominującą formą życia drobnoustrojów. Większość bakterii naturalnie występuje w społecznościach. Niewiele z nich żyje jako pojedyncze komórki nazywane planktonem bakteryjnym. Utworzenie struktury biofilmu pozwala przetrwać w środowisku i zwiększa odporność na czynniki zewnętrzne. Biofilm tworzy wiele patogenów ludzkich [Dufour i in. 2010]. Występuje on również u osób zdrowych jako część naturalnego mikrobiomu człowieka, np. w jamie ustnej [Schoilew i in. 2019]. W skład biofilmu wchodzi m.in. bakterie *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, które stanowią zagrożenie dla zdrowia [Magana i in. 2018]. Na szczególne właściwości bakterii żyjących w biofilmie wpływa wiele czynników. Powstanie biofilmu rozpoczyna się od jednej komórki planktonicznej, która ulega adhezji do powierzchni. W kolejnych etapach przyłączają się kolejne komórki, a między nimi dochodzi do wytworzenia macierzy pozakomórkowej (ryc. 1). Zmienia się również metabolizm komórkowy. U bakterii znajdujących się we wnętrzu dojrzałej struktury metabolizm jest znacznie spowolniony. Matrix oraz zmiany metaboliczne wpływają na zwiększenie odporności na czynniki chemiczne – środki dezynfekcyjne, antybiotyki oraz mechaniczne – ścieranie [Li i in. 2020].

Problemem jest także odpowiednia diagnostyka infekcji powodowanych biofilmem. Choroby mogą być wywoływane przez drobnoustroje odłączające się od dojrzałej struktury, a sam biofilm może rozwijać się niewykryty przez długi czas, powodując przewlekłe infekcje. Szacuje się, że do 80% infekcji występujących u człowieka może być wywoływanych przez biofilm bakteryjny. Niski poziom odpowiedzi immunologicznej na występujący biofilm prowadzi do wysokiej śmiertelności pacjentów, których organizm zmaga się z chroniczną infekcją. Duża trudność w usunięciu powstałego już biofilmu przyczynia się do wysokich kosztów leczenia. Często niezbędne jest usunięcie implantów, na których rozwija się biofilm. Stwarza to konieczność ponownej reoperacji pacjentów, co obniża komfort leczenia i wydłuża czas jego trwania [Römling i Balsalobre 2012].

Zapobieganie powstawaniu biofilmu i jego usuwanie

Uważa się, że zapobieganie powstawaniu biofilmu jest o wiele łatwiejsze niż proces jego usuwania ze względu na charakterystykę tego typu struktur. Ryzyko zakażenia implantów jest najwyższe podczas zabiegów i w ciągu kilku pierwszych tygodni po operacji. Sporadycznie obserwuje się przypadki rozwoju infekcji powodowanych rozwojem biofilmu na biomateriałach znajdujących się we wnętrzu ciała przez długi czas. Wysokim ryzykiem jest również obciążony zabieg wymiany implantu w przypadku rozwoju zakażenia na powierzchni poprzedniego implantu [Huang i in. 2020].



Ryc. 1. Etapy powstawania biofilmu

Opracowanie rozwiązań problemów stwarzanych przez rozwój biofilmu stało się dla medycyny bardzo istotne w ostatnich latach. Pacjenci zmagający się z tego typu infekcjami stanowią obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej. Stosowanie antybiotyków ogólnoustrojowych po operacji okazało się nieefektywne, a jednocześnie przyczyniło się do rozwoju antybiotykooporności wśród drobnoustrojów [Bazaka i in. 2012].

Jednym z najprostszych sposobów zapobiegania powstawaniu biofilmu jest nadawanie biomateriałom odpowiedniej mikrostruktury. Udowodniono, że niektóre materiały gładkie są o wiele bardziej narażone na rozwój mikroorganizmów na swojej powierzchni. Dzięki strukturyzacji materiałów zmienia się także ich aktywność biologiczna względem komórek organizmu. Zauważono pozytywny wpływ na ich adhezję, proliferację i różnicowanie [Xu i Siedlecki 2012]. Pozytywne efekty stwierdzono również przy jednoczesnym nadawaniu właściwości hydrofilowych i odpowiedniej tekstury. Najsilniej hydrofobowe materiały są narażone na powstawanie największej ilości biofilmów [De-la-Pinta i in. 2019]. Dla zwiększenia hydrofilowości powierzchni biomateriałów wykorzystuje się między innymi działanie plazmy jarzeniowej, czyli zjonizowanego gazu w niskiej temperaturze. Dochodzi do utworzenia grup hydroksylowych i karbonylowych [Taheeran i in. 2016].

Kolejnym intensywnie badanym rozwiązaniem są modyfikacje powierzchni biomateriałów poprzez pokrywanie ich różnego rodzaju powłokami o właściwościach bakteriostatycznych i bakteriobójczych. Tego typu powłoki uniemożliwiają adhezję komórek bakteryjnych lub po zetknięciu się ich z powłoką powodują śmierć, np. poprzez przerwanie błony komórkowej [Hasan i in. 2013]. Mogą też stymulować odpowiedź immunologiczną na zakażenie drobnoustrojami, wytwarzać reaktywne formy tlenu, w zetknięciu z mikroorganizmem ingerując w proces *quorum sensing* (proces komunikacji międzykomórkowej niektórych mikroorganizmów w populacjach).

Ze względu na właściwości modyfikacje powłok biomateriałów można wyróżnić trzy główne kategorie:

1. Nieorganiczne cząsteczki, przede wszystkim nanocząsteczki metali i ich tlenków, np. nanocząsteczki srebra, złota, tlenku cynku,
2. Polimery, np. peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP), czwartorzędowe pochodne soli amoniowych,
3. Małe cząsteczki o właściwościach antibakteryjnych, np. pochodne antybiotyków [Cai i Liu 2020].

Podsumowanie

Z powodu nadużywania antybiotyków i szybkiego wykształcania lekooporności przez mikroorganizmy medycyna zmuszona jest poszukiwać nowych rozwią-

zań do zwalczania infekcji. Opracowanie skutecznych substancji o działaniu antybiotycznym pozwoli na obniżenie kosztów związanych z leczeniem, zmniejszy śmiertelność w wyniku zakażeń pooperacyjnych oraz skróci okres rekonwalescencji pacjentów. Ważne jest również zwiększanie świadomości i wiedzy na temat biofilmu oraz problemów powodowanych przez jego występowanie.

Piśmiennictwo

- Baran G.R., Kiani M.F., Samuel S.P., 2013. Biomaterials applications in medicine and case studies. *Healthcare Biomed. Technol.* 21st Cent., 249–285. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-8541-4_8
- Bazaka K., Jacob M.V., Crawford R.J., Ivanova E.P., 2012. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95(2), 299–311. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4144-7>
- Bjarnsholt T., Alhede M., Alhede M., Eickhardt-Sørensen S.R., Moser C., Kühl M., Jensen P.Ø., Høiby N., 2013. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 21(9), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.002>
- Cai J., Liu R., 2020. Introduction to antibacterial biomaterials. *Biomater. Sci.* 8(24), 6812–6813. <https://doi.org/10.1039/d0bm90100h>
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- De-la-Pinta I., Cobos M., Ibarretxe J., Montoya E., Eraso E., Guraya T., Quindós G., 2019. Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 30(7), 77. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6281-3>
- Donlan R.M., 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 33(8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>
- Dufour D., Leung V., Lévesque C.M., 2010. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod. Topics* 22(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- Hanker J.S., Giammara B.L., 1988. Biomaterials and biomedical devices. *Science* 242(4880), 885–892. <https://doi.org/10.1126/science.3055300>
- Hasan J., Crawford J.R., Ivanova E.P., 2013. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends Biotechnol.* 31(5), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.017>
- Hench L.L., Thompson I., 2010. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J. R. Soc. Interface* 7(4), 379–391. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0151.focus>
- Huang D., Wang J., Ren K., Ji J., 2020. Functionalized biomaterials to combat biofilm. *Biomater. Sci.* 8(15), 4052–4066. <https://doi.org/10.1039/d0bm00526f>
- Li G., Lai Z., Shan A., 2023. Advances of antimicrobial peptide-based biomaterials for the treatment of bacterial infections. *Adv. Sci.* 10(11), 2206602. <https://doi.org/10.1002/advs.202206602>
- Li Y., Xiao P., Wang Y., Hao Y., 2020. Mechanisms and control measures of mature biofilm resistance to antimicrobial agents in the clinical context. *ACS Omega* 5(36), 22684–22690. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294>
- Magana M., Sereti C., Ioannidis A., Mitchell C.A., Ball A.R., Magiorkinis E., Chatzipanagiotou S., Hamblin M.R., Hadjifrangiskou M., Tegos G.P., 2018. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clin. Microbiol. Rev.* 31(3), e00084–16. <https://doi.org/10.1128/cmr.00084-16>
- Nair L.S., Laurencin C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progr. Polym. Sci.* 32(8–9), 762–798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- Niculescu A.-G., Grumezescu A.M., 2022. An up-to-date review of biomaterials application in wound management. *Polymers* 2022, 14(3), 421. <https://doi.org/10.3390/polym14030421>
- Ratner B.D., Bryant J.S., 2004. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 6, 41–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>
- Römling U., Balsalobre C., 2012. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.* 272(6), 541–561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>

- Saito N., Usui Y., Aoki K., Narita N., Shimizu M., Hara K., Ogiwara N., Nakamura K., Ishigaki N., Kato H., Tarutac S., Endo M., 2009. Carbon nanotubes: biomaterial applications. Chem. Soc. Rev. 38(7), 1897–1903. <https://doi.org/10.1039/b804822n>
- Schoilew K., Ueffing H., Dalpke A., Wolff B., Frese C., Wolff D., Boutin S., 2019. Bacterial biofilm composition in healthy subjects with and without caries experience. J. Oral Microbiol. 11(1), 1633194. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1633194>
- Taheran L., Zarrini G., Khorram S., Zakerhamidi M.S., 2016. Plasma surface modification as a new approach to protect urinary catheter against *Escherichia coli* biofilm formation. Iran. J. Microbiol. 8(4), 257–262.
- Williams D.F., 2009. On the nature of biomaterials. Biomaterials 30(30), 5897–5909. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>
- Xu L.-C., Siedlecki C.A., 2012. Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation. Acta Biomater. 8(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.009>

Aktywność neutrofili izolowanych z krwi świń po stymulacji hydroksyapatytem oraz ekstraktem neutrofilowym

Aleksandra Kozera^{1*}, Katarzyna Krac¹, Joanna Wessely-Szponder²,
Tomasz Szponder³, Beata Drzewiecka², Dominika Nguyen Ngoc²

¹ Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
*e-mail: aleksandra1kozera@gmail.com

² Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³ Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Hydroksyapatyt jest popularnym biomateriałem używanym w stomatologii oraz leczeniu implantologicznym kości. Cechuje się wysoką biogodnością, osteoindukcyjnością oraz zdolnością do osteointegracji. Jedną z przeszkód w pełnej implantacji wszczepionego biomateriału jest nadmierna odpowiedź immunologiczna organizmu w postaci procesu zapalnego, która wpływa na przebieg naprawy tkanek. Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony; po zadziałaniu bodźca jako pierwsze docierają z krwi do ogniska zapalnego, gdzie w wyniku degranulacji uwalniają liczne enzymy, fagocytują pozostałości uszkodzonych tkanek oraz wytwarzają reaktywne formy tlenu. Hydroksyapatyt wykazuje tendencję do defragmentacji, zwiększając prawdopodobieństwo aktywacji neutrofili, co powoduje niepowodzenie osteointegracji, a w efekcie odrzucenie implantu. W niniejszej pracy przedstawiono oddziaływanie hydroksyapatytu z neutrofilami izolowanymi z krwi świń oraz rolę stymulacji powyższych hodowli komórkowych preparatem zawierającym mieszaninę homogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Wstęp

Wykorzystanie biomateriałów w medycynie weterynaryjnej wzrosło znacząco na przestrzeni ostatnich lat. Biomateriał to substancja, której zadaniem jest zastąpienie tkanki w organizmie oraz przejęcie jej funkcji na stałe lub okresowo. Wśród biomateriałów wyróżniamy wiele rodzajów, takich jak metalowe, ceramiczne, węglowe lub polimerowe. Materiały bioceramiczne charakteryzują się wysoką biokompatybilnością, brakiem wywoływania reakcji alergicznych, toksycznych

czy mutagennych [Laska 2017]. Do tej grupy materiałów zaliczane są szeroko stosowane ortofosforany wapnia, w tym hydroksyapatyt (HA) oraz hydroksyapatyt z β -fosforanen trójwapniowym (β -TCP).

W niniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki badań mających na celu ocenę odpowiedzi *in vitro* neutrofili świńskich na kontakt z różnymi biomateriałami po homologicznej stymulacji ekstraktem neutrofili. Wykorzystany w badaniu ekstrakt neutrofili uzyskany z krwi świń (AMPNE) cechuje się aktywnością przeciwdrobnoustrojową oraz ma zdolności immunomodulacyjne, co może wpływać na modyfikowanie odpowiedzi zapalnej i procesu naprawy tkanek.

Hydroksyapatyt oraz jego losy w organizmie

Ceramiczny hydroksyapatyt jest popularnym biomateriałem używanym w stomatologii oraz implantacji do kości, głównie ze względu na jego identyczny skład chemiczny oraz fazowy jak tkanka kostna. Hydroksyapatyt służy do pokrywania metalowych części protez w celu poprawy biokompatybilności oraz jako substytut kości w przebiegu leczenia schorzeń ortopedycznych. Jest on resorbowalny w tkankach, dostępny w formie proszkowej, granuli, kryształków porowatych lub zagęszczonych. Cechuje się wysoką biogodnością, osteoindukcyjnością oraz zdolnością do osteointegracji [Adamska i Voelkel 2022]. Pomimo wielu lat stosowania wpływ właściwości hydroksyapatytu na odpowiedź tkankową nie został jeszcze w pełni poznany. Odpowiedzi komórkowe zależą od właściwości fizycznych i chemicznych podłoża, a zwłaszcza od jego składu chemicznego, krystaliczności, wielkości cząstek i struktury powierzchni. Uważa się, że obróbka termiczna hydroksyapatytu, jak spiekanie w różnych temperaturach, może powodować zmianę jego właściwości chemicznych oraz stopnia uporządkowania strukturalnego, co bezpośrednio wpływa na aktywność osteoblastów. Jednak dokładna charakterystyka powierzchni, niezbędna do optymalnej osteointegracji, wciąż nie jest w pełni poznana [Deligianni i in. 2001]. Jedną z przeszkód w pełnej implantacji wszczepionego biomateriału jest nadmierna odpowiedź immunologiczna organizmu w postaci procesu zapalnego, która wpływa na przebieg naprawy tkanek i może go zaburzyć. Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony – po zadziałaniu bodźca jako pierwsze docierają z krwi do ogniska zapalnego, gdzie w wyniku degranulacji uwalniają liczne enzymy, fagocytują pozostałości uszkodzonych tkanek oraz wytwarzają reaktywne formy tlenu [Velard i in. 2009]. Hydroksyapatyt wykazuje tendencję do defragmentacji, zwiększając prawdopodobieństwo aktywacji neutrofili, co powoduje niepowodzenie osteointegracji, a w efekcie odrzucenie implantu [Prystowsky i in. 1995].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial peptides, AMP) stanowią ważną alternatywę dla klasycznych antybiotyków, coraz częściej też docenia

się ich rolę jako czynników immunomodulujących i wspomagających gojenie tkanek [Wessely-Szponder i in. 2022].

Aktywność neutrofili stymulowanych hydroksyapatytem i AMP

Drzewiecka i in. [2023] przeprowadzili eksperyment, w którym zbadano neutrofile wyizolowane z krwi świń pobranej podczas uboju. W celu zapobiegnięcia krzepnięciu krwi przygotowano 3,8% roztwór cytrynianu sodu. Uzyskany ekstrakt podzielono na porcje o stężeniu peptydów (AMP) potwierdzonym spektrofotometrycznie oraz poddano liofilizacji i przechowywano go w temperaturze – 70°C. Wykorzystanymi w badaniu biomateriałami były hydroksyapatyt oraz hydroksyapatyt + β -fosforan triwapnia (HATCP) w próbkach po 20 mg zawieszonych w dwóch powtórzeniach na 2 godziny w 500 μ l sterylnego buforu PBS na 24-studzienkowych płytkach w temperaturze 37°C z dodatkiem 5% CO₂. Zawieszinę neutrofili wysiano w gęstości 1×10^6 komórek/ml na wspomniane już 24-studzienkowe płytki zawierające uprzednio przygotowane HA i HATCP w buforze PBS i inkubowano w temperaturze 37°C z 5% CO₂ przez 4 i 24 godziny. Reprezentatywne hodowle ze wszystkich grup dodatkowo stymulowano AMPNE o stężeniu 40 μ g/ml i oznaczano jako HA + EXT i HATCP + EXT. Neutrofile bez biomateriałów stanowiły grupę kontrolną oznaczoną jako N. Następnie oznaczono aktywność neutrofili świńskich poprzez pomiary po 4 i 24 godzinach inkubacji. Odpowiedź enzymatyczna z ziaren azurofilnych oceniana była na podstawie uwalniania elastazy oraz mieloperoksydazy (MPO) mierzonego na podstawie reakcji barwnej w wyniku rozkładu substratów, ocenionej spektrofotometrycznie przy użyciu czytnika mikropłytek BioTek EL800. Wytwarzanie reaktywnych form tlenu było oceniane na podstawie produkcji tlenu azotu (NO). Jego wytwarzanie było mierzone za pomocą reakcji Griessa i przeliczeń wyników z krzywą wzorcową dla różnych stężeń azotynów jako trwałego produktu NO w pożywce.

W badaniach dotyczących interakcji między hydroksyapatytem (HA) a neutrofilami zaobserwowano istotne zmiany w wydzielaniu tlenu azotu oraz aktywności enzymów neutrofilowych. W próbce zawierającej neutrofile i HA wykrywalność tlenu azotu po 4 godzinach inkubacji względem próbki kontrolnej (oznaczonej jako N) wzrosła o 0,54 μ M. Po 24 godzinach ten wzrost wyniósł 3,48 μ M. W przypadku próbki stymulowanej ekstraktem neutrofilowym (oznaczonej jako HA + EXT) pomiar po 4 godzinach wykazał wzrost parametru o 0,35 μ M względem próbki HA. Jednak po 24 godzinach obserwowano spadek wytwarzania tlenu azotu o 2,0 μ M w porównaniu z próbką HA. Również poziom uwalniania elastazy uległ zmianie w obecności hydroksyapatytu. Po 4 godzinach inkubacji obserwowano wzrost poziomu jej aktywności względem próby kontrolnej o 7,2%, a po 24 godzinach wzrost wyniósł 7,61%. Jednak dodatkowa stymulacja AMPNE spowodowała spadek aktywności elastazy o 8,87% po 4 godzinach i 7,0% po

24 godzinach. W próbie badającej poziom uwalniania MPO w obecności hydroksyapatytu zaobserwowano wzrost o 2,4% po 4 godzinach inkubacji i 1,7% po 24 godzinach w porównaniu z próbą kontrolną. Jednak obecność ekstraktu neutrofilowego spowodowała spadek uwalniania MPO o 0,2% po 4 godzinach i 1% po 24 godzinach w porównaniu z próbą zawierającą tylko HA [Drzewiecka i in. 2023].

Wnioski z tych badań sugerują, że interakcje między hydroksyapatytem a izolowanymi neutrofilami z krwi świń prowadzą do zwiększonej aktywności enzymatycznej i wydzielania wolnych rodników zarówno po 4, jak i po 24 godzinach inkubacji. Jednak dodatek ekstraktu AMPNE do tych hodowli ogranicza aktywność neutrofili, co może wskazywać na aktywność przeciwzapalną homologicznego ekstraktu AMPNE. Te wyniki mają istotne implikacje dla zrozumienia roli hydroksyapatytu, ekstraktu AMPNE i neutrofili w procesach zapalnych.

Piśmiennictwo

- Adamska K., Voelkel A., 2022. Chromatographic examination of the influence of environment on selected properties of ceramic biomaterials. *Surf. Interfaces* 29, 101777. <https://doi.org/10.1016/j.surf.2022.101777>
- Deligianni D., Katsala N.D., Koutsoukos P.G., Missirlis Y.F., 2001. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 22(1), 87–96. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00174-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00174-5)
- Drzewiecka B., Przekora A., Dobko D., Kozera A., Krać K., Nguyen Ngoc D., Fernández-De la Cruz E., Wessely-Szponder J., 2023. Analysis of in vitro leukocyte responses to biomaterials in the presence of antimicrobial porcine neutrophil extract (AMPNE). *Materials* 16(16), 5691. <https://doi.org/10.3390/ma16165691>
- Laska A., 2017. Biomateriały stosowane w inżynierii tkankowej do regeneracji tkanek. *Zesz. Nauk. Tow. Doktor. UJ Nauki Ścisłe* 14(1), 187–196.
- Prystowsky J.B., Huprikar J.S., Rademaker A.W., Rege R.V., 1995. Human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis of crystalline cholesterol, bilirubin, and calcium hydroxyapatite in vitro. *Digest. Dis. Sci.* 40(2), 412–418. <https://doi.org/10.1007/BF02065430>
- Velard F., Laurent-Maquin D., Guillaume C., Bouthors S., Jallot E., Nedelec J.M., Belaaouaj A., Laquerriere P., 2009. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta Biomater.* 5(5), 1708–1715. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.008>
- Wessely-Szponder J., Zdziennicka J., Junkuszew A., Latański M., Świeca M., Szponder T., 2022. Prospects and applications of natural blood-derived products in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 23(1), 472. <https://doi.org/10.3390/ijms23010472>

The future of orthopedics in the hands of biomaterial

Julia Matczyszyn

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
e-mail: julia.matczyszyn@gmail.com

Abstract

The aim of this study is a presentation of different kinds of biomaterials together with the history of their usage. The different biomaterials, such as metal implants, ceramic implants, polymeric, composite and 3D implants with specific applications were discussed. Researchers are looking for materials with better biocompatibility, durability and novel properties. Nowadays, the application of biomaterials in orthopedics is an integral part of patient treatment and modern orthopedics does not exist without implants. Thanks to their advantages, biomaterials have established a permanent position in orthopedic surgery, thus becoming increasingly popular.

Introduction

Implants have found their permanent place in orthopedic surgery, and their popularity and importance is gradually increasing. The first references to orthopedic treatment are found in the Greek documents of Hippocrates [Francis 1891]. Subsequently, the studies of Galen of Pergamon were considered the gold standard [Brain 1977]. Since then, there have been many discoveries and breakthroughs that have brought modern medicine to where we are [Jin and Chu 2019]. The response of host tissue to an implant depends largely on the composition of the biomaterial and its structural properties [Mitra et al. 2021]. Currently, the most commonly used materials for orthopedic implants are polymers, ceramics and metal alloys. Each type of material has different applications due to its properties [Jin and Chu 2019].

The human body is extremely demanding, and the functioning of an implant in the environment of tissues and body fluids is a very complex issue [Chen and Thouas 2014]. As the number of orthopedic implants used worldwide increases, so do the needs and requirements. Researchers are looking for products that provide greater biocompatibility, durability and novel properties [Ong et al. 2015].

Metal implants

Metal implants are mainly used in bone fractures and as joint replacements [Jin and Chu 2019]. Metal is a good conductor of heat and electricity. The biggest problem with this type of implant is corrosion. Metal atoms can react with compounds present in the body, causing defects in the implant. The environment inside the body is conducive to corrosion, which can result in a reduction in the strength of the material and the need for replacement [Chen and Thouas 2014]. The construction of individual implants has a close relationship to the function they perform and the location they are placed in due to the stresses they are subjected to in the body [Jin and Chu 2019].

Ceramic implants

Ceramic implants, unlike metal implants, are insulators [Chen and Thouas 2014]. Ceramic materials have found use as coatings on implants because they have too little mechanical strength to be used as load-bearing elements [Jin and Chu 2019]. They are not as susceptible to corrosion, but are far more brittle [Chen and Thouas 2014]. They have high chemical inertness so that they have virtually no reaction from the body for many years after installation [Jin and Chu 2019].

Polymeric implants

Polymeric implants are the most inert to the living body environment. They exhibit the greatest flexibility among the known types of implants [Chen and Thouas 2014]. Due to their properties, they are often used to reduce friction between surfaces in a joint [Jin and Chu 2019].

For example, silicone, the most common type of material used for small joints such as the metacarpophalangeal joint, has high biocompatibility [Ong et al. 2015].

Composite implants

A composite implant is constructed from a combination of the previously mentioned material groups. This combination is supposed to provide the best properties of the implant [Chen and Thouas 2014]. Depending on the materials chosen, even biodegradable or resorbable composites are produced so that there is no need for additional surgery to remove the implant [Chłopek 2001].

3D printing

The future of orthopedics is seen in 3D implant printing. This method involves designing an implant in a special computer system, which is then printed layer by layer in a special 3D printer. The result is a 3D model that conforms to our design. This method allows us to better tailor the implant to the patient, as we can create a component with completely customized dimensions or complex shapes tailored to our patient's individual needs and surgical requirements [Ong et al. 2015]. The orthopedic surgeon can also choose the material for the implant by taking into account the patient's bone density or the potential forces acting on the implant in the body [Wong 2022]. This modern technique uses materials such as biphasic CaP [Ong et al. 2015]. Unfortunately, like any method, this also has its downsides. Studies indicate that implants printed in 3D printers have higher roughness than commercial implants. This results in increased adhesion and biofilm formation by bacteria such as *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* on the implant surface. An increased predisposition to biofilm formation can impinge on the safety of use, as the implant can become a reservoir for bacterial strains. Bacterial accumulation causes inflammation and this leads to rejection of the implant by the body [Mazurek-Popczyk et al. 2022].

Conclusion

Biomaterials in orthopedics have become an integral part of patient treatment. Modern orthopedics does not exist without implants. Thanks to their use, they have established a permanent position in orthopedic surgery, thus becoming increasingly popular. We can consider the Greek scientist Hippocrates, or immediately after him Galen of Pergamon, as the pioneers of orthopedics. Their precursor discoveries set the track for medicine thanks to which it is in its current place. A wide range of types of implants allows a perfect match to the patient's needs. Despite state-of-the-art technology, the proper functioning of an implant is the object of research by many scientists, because the body is a complex tool of adaptation and it is never possible to predict one hundred percent how it will react to a foreign body. The biomaterials market is evolving as patients' needs and expectations grow. Surgeries that were once unattainable now seem to be within reach. The world is growing all the time, population growth is pushing upward pulling demand for a multitude of things, including implants. The use of 3D technologies has proven to be a major breakthrough in personalized orthopedics in recent years. For many people and animals, implants are the only chance to restore function and live a high level of comfort.

References

- Brain P., 1977. Galen on the ideal of the physician. *S. Afr. Med. J.* 52(23), 936–938.
- Chen Q., Thouas G., 2014. *Biomaterials: a basic introduction*. CRC Press, Boca Raton, FL, 9–15.
- Chłopek J., 2001. Kompozyty w medycynie. *Kompozyty (Composites)*, 1(1), 50–54.
- Francis A., 1891. *The genuine works of Hippocrates*. William Wood and Company, New York, 3–4.
- Jin W., Chu P.K., 2019. *Encyclopedia of biomedical engineering, orthopedic implants*. Hong Kong, China, 425–439. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.10999-7>
- Mazurek-Popczyk J., Palka L., Arkusz K., Dalewski B., Baldy-Chudzik K., 2022. Personalized, 3D-printed fracture fixation plates versus commonly used orthopedic implant materials-biomaterials characteristics and bacterial biofilm formation. *Injury* 53(3), 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.12.020>
- Mitra I., Bose S., Dernell W.S., Dasgupta N., Eckstrand C., Herrick J., Yaszemski M.J., Goodman S.B., Bandyopadhyay A., 2021. 3D Printing in alloy design to improve biocompatibility in metallic implants. *Mater. Today*, 45, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.11.021>
- Ong K., Yun B.M., White J.B., 2015. New biomaterials for orthopedic implants. *Orthop. Res. Rev.* 7, 107–130. <https://doi.org/10.2147/ORR.S63437>
- Wong K.C., 2022. 3D-printed patient-specific applications in orthopedics. *Orthop. Res. Rev.* 8, 57–66. <https://doi.org/10.2147/ORR.S99614>

Biokompozyt FlexiOss® przyszłością medycyny regeneracyjnej kości

Wiktoria Muszak^{1*}, Aleksandra Pyzerska¹, Dominika Nguyen Ngoc ²,
Joanna Wessely-Szponder ², Beata Drzewiecka ², Bartłomiej Szymczak ²

¹ Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
*e-mail: w.muszak@wp.pl

² Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³ Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Preparat kośćcozastępczy FlexiOss® jest to biomedyczny materiał, który umożliwia leczenie ubytków kostnych powstałych na skutek różnych urazów w obrębie kończyn. Materiał ten znalazł również zastosowanie w uzupełnianiu ubytków zaistniałych pod wpływem nowotworu tkanki kostnej czy też cyst pozapalnych.

Wykorzystano go także w odmiennych dziedzinach medycyny, nie tylko ludzkiej, ale i zwierzęcej – w weterynarii. FlexiOss® to preparat implantacyjny trzeciej generacji. W składzie jest dwufazowy, zawiera hydroksyapatyt (HA) i polimer. FlexiOss® wykazuje biokompatybilność z tkanką kostną, jest bardzo elastyczny oraz ma postać gąbki. To biomateriał unikalny również pod względem wchłaniania krwi i leków, bioaktywny, nietoksyczny, łatwy do przenoszenia i przechowywania. Wysoka jego nasiąkliwość pozwala dostarczać substancje odżywcze do miejsca implantacji oraz odprowadzać produkty metabolicznych komórek, co w efekcie przyspiesza naprawę miejsca uszkodzenia. Kompozyt może też zostać nasączony przed implantacją substancjami bakteriobójczymi, co zapobiega infekcji.

Ocena biokompatybilności materiałów kośćcozastępczych

Tkanka kostna zaliczana jest do tkanek łącznych podporowych, które tworzą szkielet u wszystkich kręgowców. Tkanka ta nierzadko ulega uszkodzeniom, co związane jest zarówno z fizjologicznym procesem starzenia się organizmu, jak i procesami patologicznymi, takimi jak osteoporoza, osteomalacja i uszkodzenia mechaniczne, np. wypadki komunikacyjne. Częstą komplikacją tych uszkodzeń

jest powstanie ubytku kostnego, który należy uzupełnić. W ostatnich latach biokompozyty, charakteryzujące się doskonałą biokompatybilnością, stały się obiecującymi biomateriałami mającymi zastosowanie w leczeniu uszkodzeń kości.

Biokompatybilność materiałów kośćcozastępczych jest związana zarówno z ich opornością na działanie płynów fizjologicznych i otaczających tkanek, jak i z brakiem toksyczności miejscowej i ogólnej. Ponadto materiał taki powinien cechować się osteoindukcyjnością (zdolność biomateriału do rekrutowania komórek osteoprogenitorowych i przyspieszania ich różnicowania oraz proliferacji) i osteokonduktywnością (zdolność biomateriału do promowania proliferacji osteoblastów i tworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej) [Klimek i in. 2022].

Ocena biokompatybilności implantu łączy się z szerokim spektrum badań zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ewaluacja biomateriałów wprowadzanych na rynek przeprowadzana jest zgodnie z normą ISO-10993 i obejmuje określenie cytotoksyczności, genotoksyczności, rakotwórczości oraz hemo- i cytokompatybilności [Huzum i in. 2021].

Składniki biokompozytów i ich znaczenie w odbudowie kości

W celu zwiększenia biokompatybilności materiałów kośćcozastępczych obecnie stosuje się mieszaniny materiałów. Materiały składające się z dwóch lub więcej składowych, z których przynajmniej jedna jest pochodzenia naturalnego, noszą nazwę biokompozytów. Dzięki połączeniu kilku materiałów uzyskany biokompozyt cechuje się lepszymi parametrami niż poszczególne materiały składowe [Rudin and Choi 2013]. Ciągły rozwój inżynierii materiałowej doprowadził do wytworzenia biokompozytów trzeciej generacji, które cechują się nie tylko osteoindukcyjnością, ale również spowolnioną kolonizacją przez drobnoustroje lub jej brakiem.

Biokompozyty stosowane są przede wszystkim do odbudowy kości, a także do produkcji implantów i protez, przez co znajdują szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny, m.in. stomatologii, ortopedii, chirurgii, medycynie estetycznej, traumatologii narządu ruchu oraz weterynarii. Do takich biokompozytów zalicza się biomateriał kośćcozastępczy trzeciej generacji FlexiOss® wytwarzany przez lubelską firmę Medical Inventi S.A. Jest to preparat implantacyjny dwufazowy w składzie – zawiera granulaty fosforanu wapnia (hydroksyapatytu) oraz polimeru cukrowcowego (kurdlanu) o strukturze potrójnej helisy.

Hydroksyapatyt (HAP) jest nieorganicznym składnikiem kości i zębów o wzorze $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Kationy wapnia są w nim ułożone w regularne struktury krystaliczne, tworząc tzw. szkielek krystaliczny, którego puste przestrzenie wypełniają aniony fosforanowe oraz grupy hydroksylowe. Jako biomateriał klasyfikowany jest jako resorbowalny i aktywny, o bardzo dobrych właściwościach sorpcyjnych. Cechuje się również niewielką rozpuszczalnością w środowisku tkankowym. Hydroksyapatyt jest też dielektryczny, czyli słabo przewodzi prąd, dzięki

czemu można go stosować w implantach u pacjentów wymagających zabiegów fizykoterapeutycznych. Naturalny, czysty chemicznie HAP po wypaleniu jest biały, z kolei syntetyczny odpowiednik może odznaczać się niebieskawym zabarwieniem i otrzymywany jest za pomocą metody chemii mokrej – synteza zachodzi w roztworach lub zawiesinach, w których wykorzystuje się kwasy i zasady lub sole wapniowe i fosforanowe jako substraty. Kolejną ważną cechą tego biomateriału jest jego porowatość oraz sama architektura porów. Są to istotne parametry ze względu na to, że charakter oraz zagęszczenie połączeń pomiędzy porami decydują o jakości i czasie połączenia implantu z kością [Drużdż i Mikuła 2014].

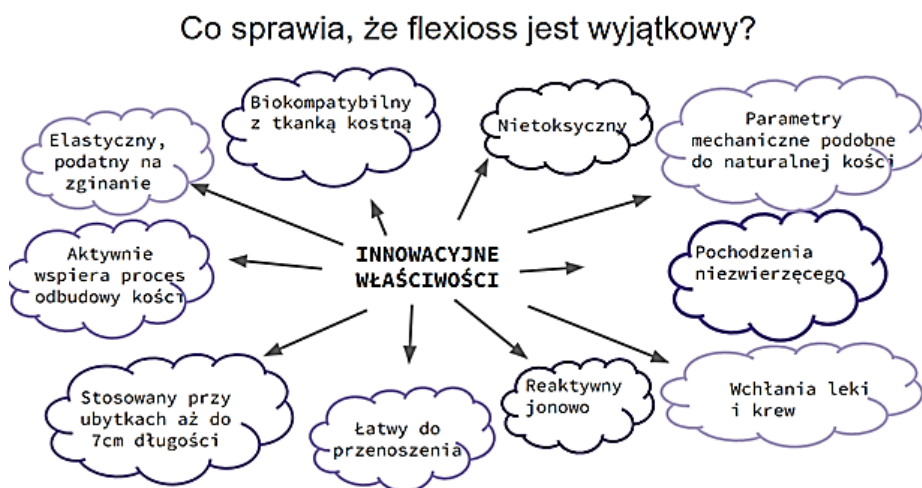
Poważną wadą implantów wykonanych jedynie z materiałów resorbowalnych jest ich skłonność do pęknięcia podczas obciążeń dynamicznych, co stanowi ograniczenie ich zastosowania. Aby poprawić właściwości mechaniczne i chirurgiczne hydroksyapatytu, można dodać do niego substancje spajające i zwiększające elastyczność [Balcarz i in. 2010]. Kurdlan należy do klasy zewnątrzkomórkowych mikrobiologicznych homopolimerów D-glukozy połączonej wiązaniami β -(1,3)-O-glikozydowymi. Polimer ten produkowany jest przez wyizolowany z gleby szczep bakteryjny *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, ulepszony poprzez wielostopniową mutagenizację. Zdolność wytwarzania kurdlanu posiadają również bakterie z rodzaju *Agrobacterium*. Kurdlan w zasadowym roztworze NaOH (powyżej 0,2 N) jest całkowicie rozpuszczalny, a jego cząsteczki mają konformacje przypadkowego zwoju. Podczas zobojętniania roztworu jego cząsteczki zwijają się helikalnie, występując w postaci pojedynczych bądź potrójnych łańcuchów, gdzie na jeden zwój helisy przypada 7 reszt glukozowych. Uzyskiwanie ściślej struktury potrójnej helisy polega na ogrzaniu zawiesiny kurdlanu do temperatury powyżej 90°C, a następnie jej powolnym schłodzeniu.

Kolejnym etapem jest suszenie pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia wody ze struktury. Kurdlan posiada właściwości termożelujące – powyżej 54°C zaczyna tworzyć się mało stabilny i lepki żel, który po podgrzaniu do 95°C staje się mocny i trwały. Uzyskany w ten sposób żel jest nierozpuszczalny do temperatury 140–160°C. Cechuje się również wysoką elastycznością oraz stabilnością w zakresie pH 3–9,5 w porównaniu z najbardziej wytrzymałymi żelami powstającymi przy pH 3. Dla porównania żele agarowe są kruche i miękkie oraz nie żelują w pH < 4,5 [Turkiewicz i Czub 1997].

Potrójna helisa kurdlanu pozwala wnikać w jej struktury granulatom HAP, co prowadzi do powstania biokompozytu hydroksyapatytowo-polimerowego. Dzięki takiej budowie jest on w stanie łatwo wchłaniać płyny, takie jak krew, płyn fizjologiczny czy roztwory leków, co czyni go plastycznym i sprężystym, umożliwiając jego mechaniczną obróbkę. Ponadto materiał ten nie zawiera składników odzwierzęcych, co zapewnia, że jest bezpieczny dla pacjenta i redukuje ryzyko reakcji alergicznych. Te właściwości pozwalają biokompozytowi dostosować się do miejsca implantacji, co ułatwia proces leczenia ubytków kostnych. Biomateriał ten może znaleźć zastosowanie w chirurgii stomatologicznej i twarzowo-szczękowej u ludzi i zwierząt – wypełnienia przetok ustno-nosowych, poekstrakcyjnych

zębodołów czy ubytków kostnych po wyłuszczeniu torbieli. Właściwości implantu kośćcozastępczego zostały przedstawione na rycinie 1.

Preparat ma wiele cech, które wspomagają regenerację ubytku kostnego. Przede wszystkim tworzy rusztowanie dla komórek osteogennych oraz komórek macierzystych dzięki swojej zróżnicowanej i wysokiej porowatości. Ponadto jest nietoksyczny dla tkanek otaczających ubytek oraz dla tkanki kostnej. Wyróżnia się również biozgodnością oraz bioaktywnością, przyciąga jony wapniowe i fosforanowe w okolice implantu, co skutkuje odkładaniem się własnego hydroksyapatytu u chorego. Biokompozyt stwarza również odpowiednie środowisko do nadbudowy kości własnej pacjenta poprzez zasiedlanie przez komórki kościotwórcze, co skutkuje możliwością pozostawienia implantu. Wszystkie te cechy przyspieszają regenerację miejsca uszkodzenia bez indukowania zapalenia. Biokompozyt hydroksyapatytowo-polimerowy znalazł zastosowanie głównie w leczeniu ubytków kostnych o niskim lub średnim obciążeniu mechanicznym. Do takich uszkodzeń zalicza się m.in. ubytki pochodzenia zapalnego, będące konsekwencją zaburzeń metabolicznych czy pourazowe [Balcarz i in. 2010].



Ryc. 1. Właściwości kompozytu hydroksyapatytowo-polimerowego jako materiału kośćcozastępczego do zastosowania klinicznego

Podsumowanie

FlexiOss® jest nadzieją na udoskonalenie i zrewolucjonizowanie medycyny oraz weterynarii. Dzięki jego wyjątkowym cechom wielu pacjentów ma szansę uniknąć efektów niepożądanych związanych z obecnością ciała obcego w postaci implantu. Biomateriał wykazuje duże możliwości do wykorzystania go w wielu

indywidualnych przypadkach klinicznych. Biomateriał ten prezentuje duży potencjał do zastosowania w innych lokalizacjach niż kości długie oraz spełnienia dodatkowych funkcji jako nośnika leków i innych substancji oraz czynników wzrostu wspomagających gojenie kości.

Biomateriał ten pod nazwą FlexiOss®Vet stosowany jest w medycynie weterynaryjnej. Z powodzeniem używano go jako wypełnienie ubytków po zabiegach osteotomii, również gabinety stomatologii weterynaryjnej wykorzystują ten biokompozyt w zabiegach regeneracyjnych, szczególnie u zwierząt po wypadkach komunikacyjnych. Właściwości sorpcyjne tego materiału umożliwiają też wzbogacenie go o autologiczne produkty krwiopochodne, takie jak osocze bogatopłytkowe, które w znacznym stopniu przyspieszają tworzenie się blizny kostnej, a tym samym umożliwiają pacjentowi szybszy powrót do zdrowia. W literaturze niewiele artykułów odnosi się do wykorzystania tego materiału w przypadkach klinicznych, szczególnie w medycynie weterynaryjnej, dlatego konieczne są dalsze badania potwierdzające aspekty użytkowe omawianego biokompozytu.

Piśmiennictwo

- Balcarz A., Ginalska G., Polkowska I., Przekora A., Ślosarczyk A., Zima A., Paszkiewicz Z., 2010. Pilotażowe badania kliniczne nad efektywnością elastycznego kompozytu opartego na HAp dla wypełnionych ubytków kostnych. Inż. Biomat. 99–101, 16–18.
- Drużdż S., Mikuła J., 2014. Metody wytwarzania implantów z hydroksyapatytu. Prace Stud. Kół Nauk. 32.
- Huzum B., Puha B., Necoara R., Gheorghevi S., Puha G., Filip A., Sirbu P., Alexa O., 2021. Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: an overview (review). Exp. Ther. Med. 22(5), 1315. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10750>
- Klimek K., Palka K., Truszkiewicz W., Douglas T.E.L., Nurzynska A., Ginalska G., 2022. Could curdlan/whey protein isolate/hydroxyapatite biomaterials be considered as promising bone scaffolds? – Fabrication, characterization, and evaluation of cytocompatibility towards osteoblast cells in vitro. Cells 11(20), 3251. <https://doi.org/10.3390/cells11203251>
- Rudin A., Choi P., 2013. Biopolymers. W: A. Rudin, P. Choi (red.), The elements of polymer science and engineering, wyd. 3, Elsevier, 521–535.
- Turkiewicz M., Czub W., 1997. Kurdlan – struktura, właściwości, wykorzystanie. Biotechnologia 3(38), 16–26.

Porcine neutrophil cathelicidins: promising molecules against bacterial resistance

Eric Fernández-De La Cruz^{1*}, *Joanna Wessely-Szponder* ²,
Paula Espinal ¹, *Ester Fusté* ^{1, 3}, *Miquel Viñas* ¹

¹ Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain, *e-mail: ericfd2009@hotmail.com

² Sub-Department of Pathophysiology, Department of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Lublin, Poland

³ Department Public Health, Mental Health and Perinatal Nursing, School of Nursing, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

The emergence of multidrug-resistant (MDR) bacteria and the lack of new effective antimicrobials is one of the major health threats worldwide. In this context, the finding of novel antimicrobial molecules, particularly antimicrobial peptides (AMPs) is mandatory. AMPs are molecules with potential applications in this field due to their antimicrobial and immunomodulatory capabilities. One of the main sources of AMPs is nature, where two major groups can be distinguished: defensins and cathelicidins.

Cathelicidins are short cationic peptides with amphipathic properties, which are present in the innate immune system of different organisms, including some mammals (pigs, humans etc.). An example of this is the LL-37, a human cathelicidin, which are present mainly in epithelial cells and in neutrophil granules. This peptide can perform several biological functions and has antimicrobial activity against different bacteria.

Among the different structures in which cathelicidins can be found, neutrophil granules are a very rich source in nature. More specifically in porcine neutrophils, several cathelicidins have been described, which have shown antimicrobial activity against pathogenic bacteria. The proline-phenylalanine-rich prophenin-1 (PF-1) and the prophenin-2 (PF-2), the proline-arginine-rich 39-amino-acid peptide (PR-39), and the cysteine-rich protegrin-1 to 5 (PG-1 to PG-5) have been purified from porcine neutrophil content. These cathelicidins are active against a broad spectrum of bacteria, both Gram-negative and Gram-positive. It has been observed that PR-39 inhibits some intracellular functions and PG 1 to 5 interact with membranes causing membrane damage followed by cell lysis. The mechanism of action of PF-1 and PF-2 is still unknown.

Introduction

Some studies have analyzed the antimicrobial activity and mechanism of action of porcine neutrophil extract without purification. It was shown that this extract has antimicrobial activity against *Escherichia coli* and the mechanism of action is based on membrane damage. Considering the properties of these peptides, they can be used as doors openers of the outer membrane of Gram-negative bacteria allowing the entry of other antimicrobial molecules. In conclusion, natural AMPs have a promising future as antimicrobial molecules due to their properties.

The rise of bacterial strains resistant to antibiotics is considered a major global health threat to the effective treatment of infectious diseases [Chinemerem Nwobodo et al. 2022]. In fact, the appearance of antimicrobial resistance is emerging faster than new treatments are developed. If this scenario continues, it could become an even greater global health problem in the coming years [Antimicrobial Resistance Collaborators 2022]. According with WHO, it is estimated that by 2050 resistant infections will cause more deaths than cancer [WHO 2019]. The key to solving this problem may lie in the search for new antimicrobial molecules.

Antimicrobial peptides, promising molecules for therapeutic purposes

Among all the new molecules, antimicrobial peptides (AMPs) have great potential. AMPs are synthetic or natural peptides with cationic and hydrophobic properties, consisting of 5–80 amino acid residues, with a broad-antimicrobial spectrum of activity. Due to their chemical properties, AMPs can be electrostatically adsorbed on the surface of the bacterial membrane and, easily penetrate and damage the membrane structures or inhibit some intracellular functions, resulting in cell death. In addition, previous studies have shown AMPs play an important role in the host's innate immune system. Furthermore, AMPs may contribute to the decrease in the emergence of drug-resistant bacteria due to their ability to affect multiple targets [Huang and Li 2023].

Nature is a rich source of AMPs, previous studies have shown that many living organisms including some mammals, amphibians [Rollins-Smith 2023], and insects [Haney et al. 2017] have a large variety of AMPs with broad-spectrum antibacterial properties. Natural AMPs can be divided into two main families, the defensins and the cathelicidins, both of which are host defense peptides (HDPs) [van Dijk et al. 2023].

Blood-derived cathelicidins

Cathelicidins are promising molecules due to their ability to both recognize and kill invading pathogens and to stimulate the host immune system. This family consists of short, cationic peptides with amphipathic properties, that are part of the innate immune system. Studies of several cathelicidins have shown antimicrobial activity against some Gram-positive and Gram-negative bacteria. Among the described cathelicidins, LL-37 is the only one that has identified in humans. It is a cationic and a hydrophobic peptide of about 37 amino acid residues and has a helix- α secondary structure. LL-37 is mainly found in epithelial cells and in the granules of neutrophils. This peptide possesses a variety of biological activities, including the regulation of responses to inflammation, lipopolysaccharide (LPS)-neutralizing, as well as antimicrobial activity in front of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [Nagaoka et al. 2020].

Neutrophil granules are cathelicidin-rich structures. As mentioned above, LL-37 is found in human neutrophils [Ciornei et al. 2005], and also, Bactenecin 7 (Bac7) and bovine myeloid antimicrobial peptide 27 and 28 (BMAP-27 and BMAP-28) are found in bovine neutrophils [Young-Speirs et al. 2018]. Among mammals, pigs have one of the most diverse collections of neutrophil cathelicidins. Some studies have confirmed the presence of cathelicidins in porcine neutrophil granules and have shown antimicrobial activity against different pathogenic bacterial [Wessely-Szponder et al. 2010].

Several cathelicidins have been purified from porcine neutrophils, such as the proline-phenylalanine-rich prophenin-1 (PF-1) and the prophenin-2 (PF-2), the proline-arginine-rich 39-amino-acid peptide (PR-39), and the cysteine-rich protegrin-1 to 5 (PG-1 to PG-5) [Sang and Blecha 2009]. They have been extensively described in previous studies, providing information on their sequence, structure, and properties [Han et al. 2007, Ramanathan et al. 2002]. PF-1 and PF-2 have an extended helical structure and are composed of 79–80 amino acid residues with a high content of proline (53.2%), phenylalanine (19%) and arginine (7.6%) [Zhang et al. 2000]. PR-39 is a linear peptide, composed of 39 amino acid residues rich in proline (49%) and arginine (26%) [Vunnam et al. 1997] and protegrins 1–5 contain 16–18 amino acid residues, rich in arginine and hydrophobic amino acids. They have four conserved cysteines in their amino acid sequence, which form two intramolecular disulphide bonds, that provide stability to the antiparallel β -sheet structure [Steinberg et al. 1997].

The sequence of these molecules gives the peptides cationic and hydrophobic properties, which making them suitable structures for interacting with bacterial membranes. Previous studies have shown that their mechanism of action is to interact with the phospholipids of the bacterial membrane, destabilizing them or penetrating into the bacteria to inhibit some intracellular functions [Huang and Li 2023].

PF-1 and PF-2 are active against Gram-negative bacteria, such as *E. coli* ATCC 25922, although their mechanism of action is still unclear [Harwig et al. 1995]. Meanwhile, PR-39 has antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. Its mechanism of action is based on the penetration through the membrane and inhibition of DNA replication and protein synthesis [Holani et al. 2016]. Protegrins 1–5 are active against Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*. They interact with membranes and induce cell lysis [Wessely-Szponder et al. 2010].

A matter of fact, these peptides embedded inside the porcine neutrophils could be extracted, without the need to be purified, and therefore, used as a mixture of antimicrobial molecules. Some studies carried out, have shown that this mixture is active against Gram-negative bacteria, such as *E. coli* [Scapinello et al. 2011], and suggest that the mechanism of action is based on its interaction with the bacterial membranes [Fernández-De La Cruz et al. 2023].

Regarding the previous studies, where the antimicrobial properties and mechanisms of action, of these natural molecules, were shown, these molecules could also be used as doors openers to facilitate the entrance of other antimicrobial molecules with no possibilities to penetrate the outer membrane of Gram-negative bacteria [Li et al. 2021]. This could be useful to overcome some bacterial resistances related to the low permeability of the outer membrane and to broaden the spectrum of activity of some antimicrobial molecules that are currently only active against Gram-positive bacteria.

Conclusion

In conclusion, natural AMPs, which are present in many structures of the organisms, are promising molecules in the fight against microbial infections, with an enormous range of opportunities to exploit their benefits.

References

- Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Chinemerem Nwobodo D., Ugwu M.C., Oliseloke Anie C., Al-Ouqaili M.T.S., Chinedu Ikem J., Victor Chigozie U., Saki M., 2022. Antibiotic resistance: the challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *J. Clin. Lab. Anal.* 36(9). <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>
- Ciornei C.D., Sigurdardóttir T., Schmidtchen A., Bodelsson M., 2005. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(7), 2845–2850. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2845-2850.2005>
- van Dijk A., Guabiraba R., Bailleul G., Schouler C., Haagsman H.P., Lalmanach A.C., 2023. Evolutionary diversification of defensins and cathelicidins in birds and primates. *Mol. Immunol.* 157, 53–69. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.03.011>

- Fernández-De La Cruz E., Wessely-Szponder J., Viñas M., Vinuesa T., Merlos A., Jorba M., Espinal P., Fusté E., 2023. Native pig neutrophil products: insights into their antimicrobial activity. *Microorganisms* 11(8), 2119. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082119>
- Han F.F., Wang Y.Z., Feng J., Guo J., Xu Z.R., 2007. Developmental gene expression of antimicrobial peptide Protegrin-1 and effect of weaning on gene regulation of Protegrin-1 in piglets. *J. Anim. Feed Sci.* 16(1), 86–95. <https://doi.org/10.22358/jafs/66729/2007>
- Haney E.F., Mansour S.C., Hancock R.E.W., 2017. Antimicrobial peptides: an introduction. *Methods Mol. Biol.* 1548, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1
- Harwig S.S.L., Kokryakov V.N., Swiderek K.M., Aleshina G.M., Zhao C., Lehrer R.I., 1995. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett.* 362(1), 65–69. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00210-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00210-z)
- Holani R., Shah C., Haji Q., Inglis G.D., Uwiera R.R.E., Cobo E.R., 2016. Proline-arginine rich (PR-39) cathelicidin: structure, expression and functional implication in intestinal health. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 49, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.10.004>
- Huang X., Li G., 2023. Antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides: non-antibiotic membrane-targeting strategies against bacterial infections. *Infect. Drug Resist.* 16, 1203–1219. <https://doi.org/10.2147/IDR.S396566>
- Li Q., Cebrián R., Montalbán-López M., Ren H., Wu W., Kuipers O.P., 2021. Outer-membrane-acting peptides and lipid II-targeting antibiotics cooperatively kill Gram-negative pathogens. *Commun. Biol.* 4(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01511-1>
- Nagaoka I., Tamura H., Reich J., 2020. Therapeutic potential of cathelicidin peptide II-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model. *Int. J. Mol. Sci.* 21(17), 5973. <https://doi.org/10.3390/ijms21175973>
- Ramanathan B., Davis E.G., Ross C.R., Blecha F., 2002. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 4(3), 361–372. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01549-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01549-6)
- Rollins-Smith L.A., 2023. The importance of antimicrobial peptides (AMPs) in amphibian skin defense. *Dev. Comp. Immunol.* 142, 104657. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104657>
- Sang Y., Blecha F., 2009. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. *Dev. Comp. Immunol.* 33(3), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.05.006>
- Scapinello S., Brooks A.S., MacInnes J.I., Hammermueller J., Clark M.E., Caswell J.L., 2011. Bactericidal activity of porcine neutrophil secretions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139(2–4), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.09.004>
- Steinberg D.A., Hurst M.A., Fujii C.A., Kung A.H., Ho J.F., Cheng F., Loury D.J., Fiddes J.C., 1997. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(8), 1738–1742. <https://doi.org/10.1128/aac.41.8.1738>
- Vunnam S., Juvvadi P., Merrifield R.B., 1997. Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine. *J. Peptide Res.* 49(1), 59–66. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1997.tb01121.x>
- Wessely-Szponder J., Majer-Dziedzic B., Smolira A., 2010. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *J. Microbiol. Methods* 83(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.010>
- WHO, 2019. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. World Health Organisation, <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis> [dostęp: 6.12.2022].
- Young-Speirs M., Drouin D., Cavalcante P.A., Barkema H.W., Cobo E.R., 2018. Host defense cathelicidins in cattle: types, production, bioactive functions and potential therapeutic and diagnostic applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51(6), 813–821. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.006>
- Zhang G., Ross C.R., Blecha F., Zhang G., 2000. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet. Res.* 31(3), 277–296. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000121>