

USE OF MEMBRANES ON THE BASIS OF COLLAGEN IN SUBSTITUTIONAL MEDICINE

KUKUROVA E, BAKOS D, KOLLER J

VYUŽITIE MEMBRÁN NA BÁZE KOLAGÉNU V SUBSTITUČNEJ MEDICÍNE

Abstract

Kukurova E, Bakos D, Koller J:
Use of membranes on the basis of collagen in substitutional medicine
Bratisl Lek Listy 1999; 100 (10): 560–566

Collagen, as biocompatible and bioactive non-specific polymer, occupies prominent position in the field of tissue engineering. The advanced biomaterials prefer collagen as a matrix for biodegradable implants as are biosynthetic skin substitutes, tendon and ligament substitutes, but also cartilage. Many studies notice the application of chemically modified collagen membranes for hernia and anastomoses reparations, vascular prosthetic materials, or for collagen tubes used in regeneration of peripheral nerves. Besides of defining main problems of tissue engineering, the paper analyses the developmental tendency of these biomaterials in the world, and compares it with the situation in Slovak Republic. (Tab. 3, Ref. 25.)

Key words: collagen, biomaterial tissue substitutes, artificial skin, biocompatibility, substitutive medicine.

V širokom spektre aplikačných oblastí medicíny sa v súčasnosti čoraz viac využívajú prírodné a syntetické polyméry. Jedným z nich je nešpecifický biopolymér — kolagén, ktorý ako prirodzená súčasť tkanív živých organizmov je technologicky dostupný a ako biomateriál je biokompatibilný, netoxický, má vysokú pevnosť v ťahu a má hemostatické účinky. Chemickými sieťovacími reakciami možno modifikovať jeho biodegradabilitu. Fyzikálno-chemickou úpravou, prípadne v zmesi s inými zložkami sa potom získajú biomateriály s presne definovanými vlastnosťami a v požadovaných formách, akými sú: chirurgické nite, membránové vrstvy, špongie, sférické častice, prášok a podobne.

Popri využití hemostatických vlastností kolagénu pri tampónadach a jeho bariérových vlastností pri prekrytí otvorených rán

Abstrakt

Kukurová E., Bakoš D., Koller J.:
Využitie membrán na báze kolagénu v substitučnej medicíne
Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 10, s. 560–566

V oblasti tkanivového inžinierstva má kolagén ako biokompatibilný a bioaktívny nešpecifický polymér popredné miesto. Moderné biomateriály preferujú kolagén ako maticu pre biodegradovateľné implantáty, ako sú biosyntetické náhrady kože, šliach, väzivového tkaniva, ale aj chrupky. Veľa štúdií si všima využitie chemicky upravených kolagénových membrán pre reparácie hernií, anastomóz, vaskulárnych protetických materiálov, alebo kolagénové rúrky pri regenerácii periférnych nervov. Práca analyzuje okrem definovania hlavných problémov kolagénového tkanivového inžinierstva trendy vývoja týchto biomateriálov vo svete a porovnáva situáciu v Slovenskej republike. (Tab. 3, lit. 25.)

Kľúčové slová: kolagén, biomateriály, náhrada kože, biokompatibilita, substitučná medicína.

a popálenín preferujú moderné trendy kolagén ako maticu pre biodegradovateľné implantáty, akými sú biosyntetické náhrady kože alebo vhodný materiál pre rýchlo sa rozvíjajúce tkanivové inžinierstvo. V ortopédii je záujem o kolagénové implantáty pre náhrady šliach, väzivového tkaniva a iných mäkkých tkanív. Veľa štúdií si všima využitie kolagénu bovinného perikardia spolu s hľadáním spôsobov potlačenia kalcifikácie biomateriálov vhodných pre reparácie hernií, anastomóz, ale i pre prípravu srdcových chlopní. Známe sú kolagénové vaskulárne protetické materiály a najnovšie aj kolagénové rúrky využívané pri regenerácii periférnych nervov.

Pre budúcnosť medicínskej praxe sa počíta so širším uplatnením kolagénových lipozómových konjugátov pre cieleň trans-

Institute of Medical Physics and Biophysics, Faculty of Medicine Comenius University, Bratislava. kukurova@fmed.uniba.sk
Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, and Centre for Burns and Reconstructive Surgery and Tissue Bank
Address for correspondence: E. Kukurova, MD, PhD, Institute of Medical Physics and Biophysics, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 2, SK-813 72 Bratislava, Slovakia.
Phone: +421.7.59357 338, Fax: +421.7.593 57 201

Ústav lekárskej fyziky a biofyziky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Chemickotechnologická fakulta Slovenskej technickej univerzity v Bratislave a Centrum popálenín a rekonštrukčnej chirurgie, Centrálna tkanivová banka v Bratislave
Adresa: Doc. MUDr. E. Kukurová, CSc., Ústav lekárskej fyziky a biofyziky LFUK, Sasinkova 2, SK-813 72 Bratislava, Slovakia.

Tab. 1. Characteristics of collagen as a biomaterial.

High tensile strength
High affinity with water
Low antigenicity
Absorbable in body
Good cell compatibility (adhesion, growth and migration)
Enhancement of tissue regeneration
Effect on cell differentiation
Activation of platelets
Availability in control of properties by physical and chemical modification
Availability of various shape fabrications

port a kontrolované dávkovanie liečiv, v ktorých sa málo stabilné, ale vynikajúce lipozómové nosiče farmák stabilizujú v kolagénovej matici. Sľubné výsledky sa v tomto smere získali odskúšaním aplikácie oftalmológik na nosiči z kolagénových filmov a hydrogélom nielen pri liečbe glaukómu, ale i pri ďalších chorobách oka.

Inú oblasť využitia biomateriálov na báze kolagénu tvoria kompozitné materiály vytvorené v kombinácii s prírodnými (kyselina hyalurónová), ako aj syntetickými polymérmi (tvorba gélov s poly-2-hydroxyetylmetakrylátom, polyglycerolmetakrylátom a podobne). Perspektívne sú kompozity s hydroxyapatitom vyznačujúce sa výrazným osteokonduktívnym účinkom, vhodné pre výplne kongenitálnych a iných kranio-maxilofaciálnych a ortopedických defektov.

Analýza využitia biomateriálov na báze prírodného kolagénu

Kolagén je vláknitá hlavná bielkovina spojivového tkaniva, ktorá predstavuje 25–33 % všetkých bielkovín nachádzajúcich sa v organizme cicavcov. Najviac kolagénu sa nachádza v šľachách, koži, kostiach a chrupkách. V menšom množstve sa však vysky-

Tab. 1. Charakteristiky biomateriálov z kolagénu.

Vysoká pevnosť v tahu
Vysoká afinita k vode
Nízka antigénicitá
Absorbovateľnosť organizmom
Dobrá kompatibilita s bunkami (adhézia, rast a migrácia)
Urýchlenie regenerácie tkanív
Vplyv na delenie buniek
Aktivácia trombocytov
Možnosť kontroly vlastností fyzikálnou a chemickou modifikáciou
Možnosť prípravy rôznych tvarov

tuje i v ostatných tkanivách organizmu, a to u všetkých živočíchov okrem niektorých nižších živočíchov a baktérií.

Kolagén má pravidelnú štruktúru vo forme pravotočivej trojzávitnice označovanej ako tropokolagénová časť molekuly. Koncové zoskupenia reťazca — telopeptidy — nemajú helikálnu štruktúru, tvoria zanedbateľnú časť molekulovej hmotnosti kolagénu. Ich hlavná funkcia je hlavne v riadení výstavby trojitej závitnice tropokolagénu, naproti tomu sa však z hľadiska biomateriálového využitia venuje pozornosť ich eliminácii zo štruktúry molekuly kolagénu kvôli potlačeniu antigenicity (Trus a Piez, 1980).

Štruktúrny typ, ako aj stupeň a spôsob zosietenia medzi molekulami kolagénu sa líši podľa druhu organického tkaniva. Menej presietené typy kolagénového tkaniva majú štruktúru s charakteristickou flexibilitou (koža, šľachy, krvné cievy). Vysoko zosietený je kolagén typu I v mechanicky pevnej Achillovej šľache. Z hľadiska prímiesi ďalších makromolekulových zložiek v tkanive je čistý, a preto pre tvorbu biomateriálov osobitne významný (Nimni a Harkness, 1988).

Na široké možnosti využitia kolagénu ako biomateriálu vzhľadom na jeho fyzikálno-chemické a biologické funkcie, ktoré plní v živom organizme, upozornili už Chvapil a spol. (1973). Najdôležitejšie z nich sú v tabuľke 1.

Prírodné zdroje kolagénu so stručnou charakteristikou získaných produktov, ich konkrétne medicínsky využiteľné formy spolu s metódami prípravy sú v tabuľke 2.

Tab. 2. Sources of collagen.

Source	Process	Product and characterization
Skin	pepsin solubilization	atelocollagen – minimal antigenicity, can be used for preparing of solutions and gel, membranes, fibres, hollow fiber, rods, contact lenses, etc.
Tendon	dispersion	fibril collagen - high activity of platelet activation suitable for mechanical preparing of strong materials, such as membrane
Blood vessel Pericardium Amnion Heart valve	removal of cell component, cross-linking	implants maintaining natural collagen tissue skeletal structure, mechanically similar to natural tissue

Tab. 2. Zdroje kolagénu.

Zdroj	Proces	Produkt a charakteristika
Koža	solubilizácia pepsínom	atelokolagén – najmenšia antigenicita použiteľné pre roztoky gély, membrány, vlákna, tyčinkovité útvary, kontaktné šošovky
Achillova šľacha	disperzia	vláknitý kolagén - vhodné pre mechanicky pevné materiály, membrány
Cievy Perikardium	odstránenie bunkových komponentov zosieťovanie	implantáty s prírodnou kolagénovou štruktúrou podobné prírodnému tkanivu

Tab. 3. Applications of collagen biomaterials in various forms.

Forms	Applications
Solution	dermal implant, coating of plastic, carrier of drug, cell culture matrix, material for shape formation, vitreous replacement, viscosurgery, cosmetic use
Membrane (control of permeability, heparin sustained release treatment)	wound dressing, permeable membrane for cell matrix, antiadhesion membrane, material for hybrid organ, delivery system
Sponge (control of porosity, protamine fixation, chemical modification)	three-dimensional cell culture, wound dressing, hemostatic agent, artificial skin, material for hybrid organs
Fibers	surgical suture
Hollow fiber	material for hybrid organs
Rod, sphere	drug delivery systems
Hydrogel	soft contact lens, tissue implants, cell culture matrix
Heterograft	cardiovascular graft, wound dressing, artificial heart valve, antiadhesion membrane and others

Tab. 3. Aplikácie jednotlivých foriem kolagénových biomateriálov.

Formy	Aplikácie
Roztoky	kozmetika, viskochirurgia, matrica pre rast buniek, nosič liečiv, plášťovanie materiálov, zubné lekárstvo
Membrány	prekrývanie rán, antiadhézne a priepustné membrány, materiály pre hybridné orgány, nosiče liečiv
Špongie	trojrozmerné materiály vhodné na kultiváciu buniek, prekrývanie rán, hemostatické činidlo, umelá koža, materiály pre hybridné orgány
Vláčna, chirurgické nite	zošívanie rán
Duté vlákna	materiály pre hybridné orgány
Tyčinky	nosiče liečiv
Hydrogély	kontaktné šošovky, tkanivové implantáty, matrice pre kultiváciu buniek
Heteroštepy	kardiovaskulárne implantáty, umelé cievy, antiadhézne membrány

Medzi základné charakteristiky, ktoré zaraďujú kolagénové matrice medzi biologicky aktívny a štruktúrne odlišný materiál, patrí: chemická kompozícia, hustota zosieťovania, rozmery pórov, percento vysoko kryštalickej formy kolagénu, obsah vody a podobne. Od nich sa odvíjajú možnosti tvarovania do želaných foriem (Yannas, 1992) určených pre medicínske aplikácie (tab. 3).

Jedným z typov materiálov sú pórovité membrány, ktoré sa vyznačujú pevnosťou v tahu, elasticitou a rozmerovou stálosťou najmä v prostredí telových tekutín. Nachádzajú uplatnenie prevažne ako podporné materiály pri hojení rán a dočasné prekrytie kože. Kolagénové vlákna dávajú takémuto kompozitu požadovaný tvar a chránia ho pred prípadným mechanickým poškodením (Vizárová a spol., 1993).

Kolagénové matrice špongiového typu s hubovitou štruktúrou uzavretej peny (jednotlivé dutinky vzájomne oddeľuje tenká stena) sú vhodné pre materiály používané ako upchávky (Doillon a spol., 1986).

Požadované vlastnosti kolagénovej špongie, akými sú pružnosť a schopnosť viazať kvapalinu, závisia od dosiahnutia stupňa chemického sietovania kolagénovej matrice (Chvapil, 1983). Spomedzi rôznych špongiovitých materiálov má kolagénová špongia najväčšiu schopnosť viazať kvapalinu (1 g špongie dokáže viazať 40–60 g vody). Je to dôležitý parameter chirurgických tampónov. Suchá stlačená špongia nadobudne po navlhčení pôvodnú pružnosť a geometriu.

Ďalší technologický postup pre dosiahnutie požadovaných vlastností kolagénového materiálu predstavujú rôzne fyzikálno-chemické spôsoby modifikácie.

Kolagén možno čiastočne rozpustiť v kyslom vodnom roztoku. Kolagénové hydrogély so stabilne fixovanými molekulami vody, sa dajú pripraviť čiastočným intramolekulovým zosieťovaním makromolekúl v kyslom prostredí pomocou UV a gamažiarenia. UV žiarenie (254 nm) vyvoláva produkciu radikálov vo forme nespárených elektrónov lokalizovaných prevažne na jadre aromatických zvyškov, akými sú tyrozín a fenylalanín (Miyata a spol., 1992). Zosieťovanie reprezentuje rekombinácie medzi týmito radikálmi. Z 3156 zvyškov v molekule kolagénu je iba relatívne nízky počet aromatických zvyškov (51) vhodných pre uvedený mechanizmus zosieťovania. Doba ožiarovania dlhšia ako 5 hodín môže spôsobiť rozpad štruktúry kolagénovej molekuly. Tento jav je dosť nevýhodný, pretože hustota zosieťovania výrazne narastá až po 5 hodinách ožarovania.

Metóda zosieťovania aplikácie (gamažiarenia je efektívna pri príprave kolagénových šošoviek s vysokým obsahom vody (94 %) vyznačujúcich sa veľkou pevnosťou v tahu a dobrou priepustnosťou kyslíka. Okrem toho je vhodnou metódou pre sterilizáciu vláknitých kolagénových prípravkov. Po sterilizácii (gamažiarením sa nezaznamenali žiadne zmeny štruktúrnej stability a teploty zmrštenia kolagénových implantátov.

Kolagén sa v tkanive in vivo absorbuje katabolickými procesmi, vrátane enzymatickej degradácie. V terapeutických postupoch zameraných na regeneráciu tkaniva je preto potrebné zabezpečiť prenosné charakteristiky a kontrolovanú resorpciu podmienenú stupňom chemického zosieťovania kolagénovej matrice. Na určenie stupňa resorpcie sa využíva riadená biologická a fyziologická

degradácia bakteriálnou kolagenázou. So zvyšovaním stupňa chemického zosieťovania sa resorpcia in vivo spomaľuje, zvyšuje sa odolnosť materiálu voči enzýmom a znižuje sa stupeň napučania. Chemicky modifikovaný materiál musí byť cytotoxický a fyziologicky nezávadný (Srivastava a spol., 1990).

Pri prekrytových biomateriáloch sa ako sieťovadlá používajú bifunkčné činidlá, ktoré obsahujú reaktívne skupiny vytvárajúce mostíky medzi dvoma aminokyselinovými zvyškami prilahlých proteínových molekúl. Takýmito činidlami sú aldehydy, izokyanáty, alkylhalogenidy a acylhalogenidy, imidoestery, karbodiimidy, N-substitúované maleinimidy a acylované zlúčeniny (Vizárová a spol., 1994).

Odvetvie vedy a výskumu zaoberajúce sa problematikou štúdia a tvorby kolagénových materiálov sa označuje kolagénové inžinierstvo (Miyata a spol., 1992).

Biosyntetické náhrady kože na báze kolagénu

V medicínskej praxi, predovšetkým v plastickej chirurgii existuje veľa situácií, keď terapeutické postupy pri pacientoch s rozsiahlymi stratami kožného tkaniva a ťažkými popáleninami zahŕňujú popri využití jeho vlastných kožných implantátov aj využitie náhradných materiálov. Ako dočasný kožný kryt môže slúžiť transplantát z mŕtveho darcu, prípadne plodové obaly. Na povrchové popáleniny stačí použiť ako dočasné prekrytie — alotransplantát — aj bravčovú dermálnu náhradu. Napriek imunitnej reakcii umožní pacientom vo väčšine prípadov ľahšie prekonať kritické obdobie, získať čas na hojivé procesy a postupnú náhradu vlastným transplantátom — autotransplantátom.

Problémy s imunitnými potransplantačnými reakciami viedli nasmerovali pozornosť na nebunkové biologické materiály zabudovateľné do tkaniva rany a nestimulujúce imunitné mechanizmy. Predmetom štúdia sa stali biopolyméry, akými sú fibrín, fibronektín, kyselina hyalurónová, chitozan a predovšetkým kolagén. Tento polymér, enzymaticky čistený a rekonštruovaný do membrán, vyznačujúci sa vynikajúcimi biologickými vlastnosťami a vysokou pevnosťou, je ideálny na výrobu implantátov.

Biosyntetická náhrada kože (implantát kože) predstavuje v podstate jednoduchý chemický analóg matrice nahrádzaného tkaniva s úlohou do určitej miery nahradiť, predovšetkým dobrou priľnavosťou, kryciu funkciu kože, a to najmä v zmysle komplexnej bakteriálnej ochrany obnaženého tkaniva rany. Priľnavosť implantátu ako podmienka splynutia s okolím závisí nielen od vlastnej štruktúry materiálu, jeho tvarovej prispôbovosti a hydrofilnosti, ale aj od jeho biokompatibility a biodegradability. To znamená, že materiál sa ľahko vaskularizuje, prerastá kultivovanými bunkami alebo bunkami z okolitých tkanív, a tak sa s hojením rany pomocou enzýmov týchto buniek súčasne rozkladá. Dôležitou vlastnosťou materiálu sú transportné a bariérové vlastnosti zabezpečujúce rovnováhu vlhkosti a celkovo vhodnú priepustnosť plynov a vodných pár (Yannas, 1992).

Ako „syntetická derma“ najčastejšie slúžia kultúry fibroblastov kultivované in vitro na matrici z kolagénu. Fibroblasty sa v kolagénovej matrici najprv množia a neskôr syntetizujú, až napokon rekonštruujú svoju vlastnú kolagénovú matricu. Takto možno pripraví veľké plochy syntetickej dermy z malej biopsie tkaniva. Použitie vlastných buniek z kože pacienta umožní okamžité prijatie kultivovanej dermy organizmom. Iným typom materiálu je kolagénová matrica vo forme gélu, ktorý vzniká miešaním roztoku

kolagénu s fibroblastami v zriedenej kyseline s následnou neutralizáciou zásady. Gélová forma má rovnako pozitívny vplyv na migráciu a rast fibroblastov.

Pri riešení problému reparácie rany použitím dermálnych krytov a dermálnych náhrad s nasadenými bunkami sa zvyčajne postupuje vo viacerých krokoch, z ktorých posledný predstavuje prekrytie vrstvou buniek epitelu. Epitel v niektorých prípadoch, pri plytkých ranách, alebo ranách vyplnených novým dermálnym tkanivom, spontánne migruje cez dermu. Urýchlenie migrácie možno dosiahnuť znížením straty vlhkosti z rany, a to použitím syntetických alebo prírodných polymérových vrstiev (Silver, 1994).

„Syntetická epiderma“ predstavuje kombináciu epidermálnych buniek rastúcich v kultúre so syntetickým alebo biologickým substrátom. Pre rast epidermálnych buniek na podklade zo syntetického polyméru sa používajú rôzne techniky. Z malého kúska epidermy (1 cm²) môže narásť v kultúre až 6000 cm² epidermálnych buniek, ktoré sa pomocou enzýmov bez porušenia vrstvy uvoľnia z polymérového podkladu, prenesú na gázu alebo kolagénový film (transportné médiá) a implantujú na ranu, pričom v kontakte s ranou je vždy iba vrstva epidermálnych buniek.

Iné techniky používajú ako podporný materiál pre rast buniek kolagénové materiály vo forme špongiózných štruktúr výrazne podporujúcich diferenciáciu buniek. Výhodou implantácie epidermálnych buniek na vopred aplikovanú kolagénovú špongiu je skvalitnenie uchytenia implantátu v rane vrastaním jej tkaniva do materiálu. Spevnenie kolagénovej matrice sa môže dosiahnuť aj komplexáciou s kyselinou hyalurónovou (Reháková a spol., 1996).

Väčšinu implantátov kože tvorí kombinácia dvoch alebo viacerých materiálov. Vonkajšia vrstva, slúžiaca ako epiderma, je konštituovaná z hľadiska trvanlivosti, elasticity a prípadnej možnosti uchytenia stehom na okraji rany. Vnútorňa vrstva sa projektuje pre maximálnu priľnavosť a elasticitu tak, aby nahradila funkciu dermy.

Kompozitné syntetické materiály sa zvyčajne skladajú z redšej tkaniny (bavlnená gáza, polyester) prilepenej na syntetický polymérový film. Napríklad komerčný kompozitný materiál „Bio-brane“ má vrstvu zo silikónového kaučuku spojenú s pletenou nylonovou tkaninou, ktorá obsahuje peptidy z bravčového kolagénu. Vďaka biologickej zložke sa zlepší adhézia k rane a kompatibilita k bunkám spojivového tkaniva. Takého polymérne prekryvy sa používajú iba pri plytkých ranách a v tých prípadoch, keď bunky epitelu môžu migrovať cez ranu.

Prvú komplexnú kompozitnú náhradu kože „Integra“ vyvinuli v Massachusetts Institute of Technology (Yannas a Burke, 1980) a iba pred dvoma rokmi získala certifikát FDA. Tvorí ju kolagén pochádzajúci z hovädzích šliach viazaný s molekulami glykoaminoglykán (chondroitín-6-sulfát) extrahovaného z hovädzej chrupky. Tento komplex nahrádzajúci dermu je navyše presieťovaný glutaraldehydom. Vrchnú vrstvu kompozitu tvorí silikónová membrána s ochrannými a bariérovými vlastnosťami. Materiál sa vyznačuje kontrolovanou rýchlosťou biodegradácie. Tkanivo vrastá do poréznej štruktúry vrstvy kolagénového komplexu, ktorý postupne, v čase dlhšom ako jeden mesiac degraduje. Spontánne odlupovanie silikónovej vrstvy (asi po 15 dňoch) je synchronne s dynamikou epitelizácie. Kompozit však slúži iba ako dočasný kryt, zabezpečujúci tvorbu dermálneho tkaniva. Pre pokrytie veľkých plôch epidermou neskôr treba aplikovať kožný implantát, alebo použiť vrstvy vykultivovaných buniek.

Úplná náhrada kože by musela pozostávať z bunkovej dermy a epidermy a matrice spojivového tkaniva obsahujúceho krvné cievy a žľazy. Napriek dostupnosti výrobných techník v súčasnosti takýto kompozit neexistuje. Dostupné sú len matrice s kultúrami fibroblastov a epidermálnych buniek.

Napriek tomu kolagénový materiál prerastený fibroblastmi, na povrchu ktorého sa kultivujú epidermálne bunky, je ideálnou náhradou kože pri terapeutických riešeníach strát poškodenia kožného krytu. Hoci sa súčasný stav vo vývoji kožných náhrad javí zdanlivo uspokojivý, rozvoj bioinžinierstva tkanív v ostatných rokoch výrazne akceleruje. Súvisí to s vývojom nových typov derivátov biopolymérov v nových kombináciách s vhodnými biologickými a mechanickými vlastnosťami urýchľujúcimi proces hojenia. Napríklad pri kultivácii biosyntetickej epidermy sa na uchytenie epidermálnych buniek používajú fólie z esteru kyseliny hyalurónovej, jemne perforované laserom „Laser Skin“ (Fidia, Taliansko).

Kompozitné membrány kolagénu s hydroxyapatitom

Rekonštrukčná kostná chirurgia, či stomatochirurgia sa dnes rovnako nezaobídu bez použitia náhradných biomateriálov. Široké spektrum kostných náhrad zahŕňa viacero druhov kostných implantátov odlišujúcich sa technológiou úpravy, stupňom modifikácie a biologickým pôvodom. V súčasnosti však pri zvýšenom záujme o biomateriály, aj v prípade kostných náhrad a výplní, rastie záujem o syntetické materiály na báze biokeramiky v kombinácii s bioaktívnou polymérou zložkou. V klinických aplikáciách sa pri takýchto materiáloch zvyčajne kombinujú dobré mechanické vlastnosti jedného materiálu s chemickými a biologickými charakteristikami iného materiálu, pričom tieto kompozity musia zabezpečiť priaznivú odozvu organizmu. Dôležitou požiadavkou kladenou na biomateriál je jeho dlhodobá funkčnosť v organizme.

Pre implantát z kompozitnej biokeramiky je kľúčovou požiadavkou, aby sa v prípadoch strát častí kostného tkaniva v dôsledku chirurgického výkonu alebo po úraze stal náhradnou súčasťou pôvodného organického tkaniva. Tradičné spôsoby reparácie najčastejšie využívajú kostnú náhradu odobratú z iného miesta toho istého pacienta, čo znamená chirurgický výkon navyše.

Výskum sa už takmer 20 rokov zameriava na syntetické výplne kostí, ktorých základom sú fosforečnany vápenaté (De Groot, 1980). V súčasnosti sa všeobecne prijíma názor, že štruktúra týchto materiálov by mala vychádzať zo štruktúry prirodzenej kosti s trabekulárnou štruktúrou podobnou špongii. Takýto typ štruktúry majú korály (chemicky uhličitan vápenatý) využívané pre prípravu implantačnej keramiky. Po chemickej úprave jeho otvorená poróznosť umožňuje kosti vrásť do implantátu, a tak zabezpečiť dobrú fixáciu v defekte. Medzi technológie prípravy syntetických makroporéznych hydroxyapatitových štruktúr patrí napríklad postup, pri ktorom sa sublimujúca zložka (amónne soli), alebo polymérna látka (agar) mieša s hydroxyapatitovým práškom a makroporóznosť budúceho materiálu sa dosiahne po vyžlhaní tvarovanej zmesi. Zvýšenie konzistencie špongióznej štruktúry sa dosiahne impregnáciou polymérnej peny koncentrovanou disperziou hydroxyapatitu a vypálením organickej zložky. Aj keď uvedenými postupmi dostávame chemicky ten istý materiál, jeho odlišná biologická aktivita je podmienená predovšetkým jeho makroštruktúrou (Ravaglioli a Krajewski, 1992).

Hydroxyapatit vo forme granúl používaný na výplň kostných defektov môže nežiaduco migrovať z výplne prekrytej iba prirodzeným tkanivom. Preto vývoj smeruje k tvorbe kompozitného materiálu, v ktorom sú granule hydroxyapatitu zakotvené v matrici biokompatibilného a biodegradovateľného polyméru. Vychádzajúc znova z modelu kosti obsahujúcej vo svojej štruktúre značné množstvo kolagénu je preto prirodzené, že sa tento vláknitý polymér v testovaných kompozitných štruktúrach objavuje najčastejšie (Marouf a spol., 1990). Ukazuje sa, že použitie kolagénu s odstránenými telopeptidmi z koncov retazcov ako matrice má viaceré výhody, akými sú: rýchlejšie prerastanie implantátu na novú kosť a potláčanie vytvárania fibróznej vrstvy na rozhraní medzi kosťou a implantátom a lepšia tvarovateľnosť pri zachovaní jeho kompaktnosti.

Výskum v oblasti biomateriálov v prevažnej miere rieši problémy biokompatibility. Vo vývoji biomateriálov možno v súčasnosti identifikovať niektoré orientácie. Jednou z nich je snaha čo najvernejšie (mimeticky) napodobňovať prírodu, napríklad cez vytváranie kompozitných štruktúr, podľa možnosti s využitím identických alebo chemicky podobných zložiek. Záujem sa sústreďuje aj na používanie biopolymérov, ktoré v porovnaní so syntetickými materiálmi organizmus viac toleruje, pričom sa často využíva ich biodegradabilita. Horšie mechanické vlastnosti biopolymérov možno zlepšiť napríklad presieťovaním syntetickými zložkami. Určitou obdobou je chemická modifikácia povrchu syntetických materiálov biopolymérmí (heparinácia povrchu, nanosenie kolagénovej vrstvy na syntetický inertný materiál a podobne).

Spomedzi biopolymérov, ktoré sa používajú samy ako biomateriály alebo na modifikáciu syntetických materiálov, či pri mimitickom kopírovaní biologických materiálov, sa síce najčastejšie stretávame s kolagénom, no stredobodom záujmu sú v súčasnosti i ďalšie biopolyméry. Sú nimi glykozaminoglykány (kyselina hyalurónová, chondroitínsulfáty, heparín), deriváty celulózy, algináty, chitozan, mikrobiálne polyestery (poly- β -hydroxyalkanoáty), bioadhezíva (fibrín) a ďalšie.

Podľa Peepasa a Langer (1994) sa biomateriály nachádzajú v 2700 druhoch implantátov a iných liečebných prípravkoch, 2500 diagnostických výrobkoch a v 39 000 druhoch liekov.

Údaje v SR nie sú spracované, ale situáciu v USA zhodnotil Smith (1994) zo správy FDA (Center for Devices and Radiologic Health) odhadujúcej, že okolo 11 miliónov Američanov má implantovanú nejakú formu biokompatibilného materiálu. V príkladoch sa uvádzajú kardiostimulátory, náhrady bedrových kĺbov, silikónové prsníkové implantáty, cievne protézy a podobne.

V októbri 1994 sa konala konferencia „Biomaterials and Medical Devices in Clinton Era“, ktorej cieľom bolo spoločné stretnutie výrobcov biomateriálov a liečebných prípravkov, používateľov, dodávateľov surovín, tvorcov legislatívy a zástupcov príslušných administratívnych orgánov z oblasti zdravotníctva. Okrem iného sa tu konštatoval obrovský záujem a nárast obchodu s biomateriálmi odhadovaný na medziročný nárast 15–17 %. Najväčší medziročný nárast predaja bol v kardiovaskulárnom a dentálnom sektore. V USA sa roku 1993 uskutočnilo 120 000 transplantácií srdcových chlopní a aplikoval sa 1 milión dentálnych implantátov. V tom čase dosiahol obrat v predaji biomateriálov 97 miliárd USD.

Dostupný je zaujímavý materiál vypracovaný externými konzultantmi pre bioinžinierstvo pre Department of Health and Hu-

man Service (USA) ako ohlas na vládnu štúdiu „Support for Bioengineering Research“, ktorá sa zaoberá financovaním výskumu a hodnotením bioinžinierskych inovácií v oblasti medicíny. Materiál poukazuje na potrebu lepšieho rozdelenia prostriedkov z National Institutes of Health (NIH) ako hlavného federálneho sponzora, ktorých výška roku 1993 bola 300 miliónov dolárov, z čoho menej ako 80 miliónov určených pre základný výskum sa považovalo za nedostatočné. Okrem iného autori naliehali na potrebu udržania vedúceho postavenia priemyslu s biomateriálmi a liečivými prípravkami v USA, ktorý tvoril roku 1993 49 % celkovej svetovej výroby.

Z novších štúdií možno uviesť prácu „The World Market for Advanced Biomaterial-based Product“ (PJB Publications, 1996), ktorá hovorí o očakávanom náraste svetového obchodu s progresívnymi výrobkami na báze biomateriálov ročne o 13,6 % pri dosiahnutí obratu 15,2 miliardy USD koncom storočia. Medzi hlavné oblasti tohto rastu sú zahrnuté: kontrolované uvoľňovanie liečiv, syntetické kožné náhrady, chrupka a iné časti organizmu, aktivity v ortopédii a pri ošetrovaní rán, ako aj aktivity v kardiovaskulárnej oblasti a oblasti inkontinencie. Niektoré z uvedených oblastí sa môžu rozvíjať rýchlejšie ako iné. Predpokladá sa napríklad až 24 % nárast absorbovateľných a erózií podliehajúcich biomateriálových produktov pri cenovom vyčíslení predaja 466 miliónov USD roku 1994, s predpokladom 2,1 miliardy USD roku 2001. Táto skupina biomateriálov zahŕňa výrobky na báze kolagénu, kyseliny hyaluronovej, výrobky zo želatíny a biodegradovateľné polyméry, ako je polymliečna a polyglykolová kyselina (Biotech Equipment Update, 1995).

Možno všeobecne hovoriť o mimoriadnom záujme o celkové dianie v oblasti biomateriálov, kde sa výsledky rýchlo komercializujú a kde sa predpokladajú obrovské zisky, ktoré sú porovnateľné so ziskami farmaceutického priemyslu (Bakoš, 1998).

Využívanie kolagénových biomateriálov v zdravotníctve v SR

Pri hodnotení využívania biomateriálov na báze kolagénu v zdravotníctve v Slovenskej republike možno konštatovať, že v lekárskej praxi nie je o nich dostatočný prehľad. Osvedčené je použitie pri chirurgickej tamponáde, kde sa využíva čistý kolagénový biomateriál vo forme vrstvy s poréznu penovitou štruktúrou s výborným hemostatickým efektom. Uvedené materiály propagované firmami zo zahraničia sú cenovo pre nemocnice pomerne náročné, čo môže byť jednou z príčin, prečo sa ich používanie bežne nerozšírilo. Nepoužíva sa ani analogický výrobok firmy Hypro (ČR) aj napriek jeho cenovej dostupnosti. Jednou z príčin môže byť nedostatočná propagácia v SR. Ďalšiu príčinu možno hľadať v pomerne cenovo prístupnejšej tamponáde na báze celulózy, aj keď s menej výhodnými vlastnosťami.

Z dosiaľ nerealizovaných koncepcií rozvoja výroby farmaceuticky čistého kolagénu pre uvádzanú aplikáciu, predkladaných z Chemickotechnologickej fakulty STU už v minulosti (Galatík, 1991) vyplývajú ďalšie úvahy a kroky, ktoré by viedli k výrobe kvalifikovanejších prípravkov tkanivového inžinierstva a ktoré by ešte podstatne vyššie zhodnotili kolagénový materiál v SR.

Na kolagén v biomateriálových aplikáciách je potrebné pozerať ako na základnú významnú zložku rôznych kompozícií s inými polymérnymi, alebo nízkomolekulovými bioaktívnymi zložkami, z ktorých každá plní svoju špecifickú funkciu a navyše ich účinok je často synergický. V tomto smere sa orientuje aj výskum

biomateriálového inžinierstva, a tým je aj predznamenávaný nárast biomateriálových produktov pre rôzne oblasti medicíny, ktoré sa už vo výskumných laboratóriách, ale postupne i na trhu začínajú objavovať.

Stav výskumu a vývoja biomateriálov v SR

Výskum a vývoj biomateriálov v SR je v začiatkoch a hoci sa niektoré vedecké tímy zaoberajú parciálne základným výskumom biopolymérov, najmä chémiou polysacharidov (Chemický ústav SAV) a ich prípravou v biotechnologických procesoch, komplexnejšie sa problémom biomateriálového inžinierstva venuje pozornosť iba na Chemickotechnologickej fakulte STU. Tu sa postupne prepájajú záujmy biotechnologických laboratórií v hľadani zamerania výskumu, ktoré by viedlo k zhodnoteniu výsledkov vedeckej práce v spoločenskej praxi. Plnenie programu vypracovania technologických postupov výroby nových biomateriálov podstatnou mierou závisí od efektívnej a úzkej kooperácie s teoretickými i klinickými pracoviskami LFUK v Bratislave (Kukurová, 1997), kde sa realizuje biologické testovanie materiálov so zabezpečením potrebnej spätnej väzby pri ich ďalšom vývoji. Spolupráca zameraná na komplexné riešenie biomateriálov vyústila do úspešného ukončenia vývoja novej implantačnej biokeramiky Biovan K predstavujúcej kompozit hydroxyapatitu s atelokolagénom. Tento implantačný materiál určený pre výplne rôznych kostných defektov úspešne prešiel klinickými skúškami na viac ako 80 pacientoch a osvedčil sa najmä v stomatológii, v maxilofaciálnej chirurgii, v ortopédii a traumatológii, no jeho aplikácie sú oveľa širšie. Ide o originálny materiál, ktorého obdobu zatiaľ u nás na trhu nie je.

Druhým materiálom, ktorého štúdium sa úspešne realizuje, je kompozitný materiál na báze kolagénu konjugovaného s kyselinou hyaluronovou, ktorý vo forme membrány bude slúžiť ako syntetická derma pre biosyntetickú náhradu kože.

Cieľom riešenia je príprava biosyntetickej náhrady kože, ktorá by bola schopná sa trvalo prihojiť v organizme a kryť defekty po strate kožného krytu. Biosyntetická kožná náhrada bude pozostávať z dvoch hlavných vrstiev: epidermálnej, tvorenej in vitro kultivovanými autológnymi keratinocyty, a dermálnej, tvorenej biokompozitným materiálom na báze atelokolagénu s kyselinou hyaluronovou prerastenej kultivovanými fibroplastmi. Výsledky riešenia sa využijú pri liečbe rozsiahlych popálenín a stratových poranení kožného krytu.

Ďalší výskum a vývoj biomateriálov pre tkanivové inžinierstvo by preto nemal zostať len na uvažovaných dvoch typoch biopolymérov — kolagéne a kyseline hyaluronovej. Pozornosť by sa mala venovať aj ďalším typom biopolymérov, ktorých zdroje sú u nás dostupné. Zo živočíšnych tkanív by bolo možné vypracovať technológiu získavania vysoko čistého elastínu, chondroitínsulfátu, fibrínu z krvnej plazmy, technológiu výroby citozanu, biotechnologickou cestou výrobu ďalších typov polysacharidov, prípadne polyhydroxyalkanoátov. Súbežne by sa mal rozpracovať program syntetických polymérov, ktoré sa dajú v oblasti biomateriálov využiť. Veľmi žiadané by boli biodegradovateľné polyméry vysokej čistoty, ako je polymliečna kyselina a polyglykolová kyselina. Z ďalších syntetických polymérov by išlo najmä o vysokočistý polyetylén a vysokočisté polyetylénglykoly. Na takejto surovinovej báze by bolo možné vybudovať v Slovenskej republike veľmi

atraktívne odvetvie výroby biomateriálov, ktoré by ovplyvnilo aj rozvoj farmaceutického priemyslu.

V krajinách, ako USA, Veľká Británia, Japonsko, je oblasť biomateriálov a biomateriálového výskumu vyčlenená ako samostatne sa rozvíjajúci odbor, za ktorým stojí silný priemysel. V menších krajinách sa s biomateriálmi uvažuje v biotechnologických projektoch, čo vyplýva hlavne z potreby koncentrovania prostriedkov pre výskum do vybraných progresívnych smerov. Prepojenie biomateriálového a biotechnologického výskumu vyplýva aj z využívania biomateriálov ako nosičov pre imobilizáciu biomolekúl, buniek, prípadne mikroorganizmov. Takéto biofunkčné systémy môžu mať v biomedicínskej a biotechnologickej oblasti rôzne využitie. Aplikácie imobilizovaných enzýmov sa využívajú napríklad v bioreaktoroch (priemyselných alebo medicínskych), pri bioseparáciách, biosenzoroch, diagnostických setoch a podobne. Imobilizované bunky nachádzajú uplatnenie v priemyselných bioreaktoroch, pri konštrukcii umelých orgánov alebo pri biosenzoroch.

Literatúra

Bakoš D.: Perspektívy výskumu a vývoja biomateriálov v SR. Bioprospect, 8, 1998, č. 2–3, s. 9–13.

De Groot K.: Bioceramics consisting of calcium phosphate salts, Biomaterials, 1, 1980, s. 47–50.

Doillon C.S., Whyne C.F., Brandwein S., Silver F.H.: Collagen-based wound dressing. Control of the pore structure and morphology. J. Biomed. Mat. Res., 20, 1986, s. 1219.

Galatík A., Kuběna K., Blažej A.: Biocompatible collagenous material and method of its preparation. CS Pat. 269 196, 1991.

Chvapil M., Kronenthal R.L., Winkel W.V.: Medical and surgical applications of collagen. S. 1–6. In: Hall D.A., Jackson D.S. (Eds.): International Review of Connective Tissue Research. Vol. 6. New York, Academic Press 1973.

Chvapil M., Speer P., Mora W., Eskelson C.: Effect of tanning agent on tissue reaction to tissue implanted collagen. J. Surg. Res., 35, 1983, s. 402–409.

Kukurová E.: Advances in medical physics, biophysics and biomaterials. Bratislava, Malé Centrum 1997, 212 s.

Marouf H.A., Quayle A.A., Sloan P.: In vitro and in vivo studies with collagen/hydroxyapatite implants. Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 5, 1990, s. 148–154.

Melish D.R., Taylor T.D., Leibold D.G., Hiatt R., Waite P.D., Laskin D.M., Smith S.T., Koretz M.M.: Evaluation of collagen/hydroxyapatite

for augmenting deficient alveolar ridges: Twelve months clinical data. J. Oral Maxillofac. Surg., 46, 1988, s. 839–845.

Miyata T., Taira T., Noishiki Y.: Collagen engineering for biomaterial use. Clin. Mat., 9, 1992, s. 139.

Nimni M.E., Harkens R.D.: Molecular structure of collagen. Chap. 1. S. 1–77. In: Nimni M.E. (Ed.): Boca Raton, FL, CRC Press 1988.

Peppas N., Langer R.: New Challenger in Biomaterials. Science, March 25, 1994.

PJB Publications (1994) “World Market for Advanced Biomaterial-based Products”. Clin. Reports, Surry, UK, January 1996.

Ravaglioli A., Krajewski A.: Bioceramics Materials. Properties and Applications, London, Chapman and Haall 1992, 422 s.

Reháková M., Bakoš D., Vizárová K., Soldán M., Juríčková M.: Properties of collagen and hyaluronic acid composite materials and their modification by chemical crosslinking. J. Biomat. Med. Res., 30, 1996, s. 369–372.

Silver F.H.: Biomaterials, medical devices and tissue engineering. London, Chapman Hall 1994, 303 s.

Smith M.: Biomaterials for Artificial Joints, Organs, is Potential Growth Industry. Biotechnology Newswatch, June 6, 1994.

Srivastava S., Gorham S.D., French D.A., Shivas A.A., Courtney H.M.: In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. Biomaterials, 11, 1990, s. 155–161.

Trus B.I., Piez K.A.: Compressed microfibril models of the native collagen fibril. Nature, 286, 1980, s. 300–301.

Vizárová K., Reháková M., Bakoš D., Vaňo I.: Biomaterials based on collagen, Brat. lek. listy, 94, 1993, s. 633–637.

Vizárová K., Bakoš D., Reháková M., Macho V.: The modification of layered atelocollagen by UV irradiation and chemical crosslinking: Structure stability and mechanical properties. Biomaterials, 15, 1994, s. 1082–1086.

Williams D.F.: Biofunctionality and Biocompatibility. S. 1–27. In: Cahn Haasen R.W.P., Kraemer E.J. (Eds.): Material Science and Technology. Vol. 14. Weinheim 1992.

Yannas I.V.: Materials for skin and nerve regeneration, biologically active analogs of extracellular matrix. S. 179–208. In: Cahn Haasen R.W.P., Kraemer E.J. (Eds.): Material Science and Technology. Vol. 14. Weinheim 1992.

Yannas I.V., Burke J.F.: Design of artificial skin I. Basic design principles. J. Biomed. Mat. Res., 14, 198, s. 65–81.

Received April 8, 1999.

Accepted September 10, 1999.