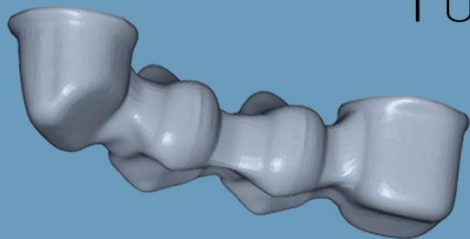


I OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA NAUKOWA



IMPLANTY 2018

OD IDEI DO KOMERCJALIZACJI

28 CZERWCA 2018

Nowe alifatyczne poliuretany biomedyczne

Justyna Kucińska-Lipka, Iga Gubańska,
Agnieszka Przybytek, Alicja Lewandowska,
Helena Janik



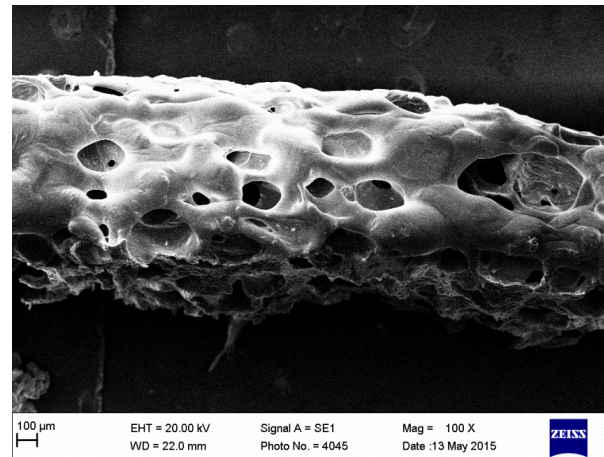
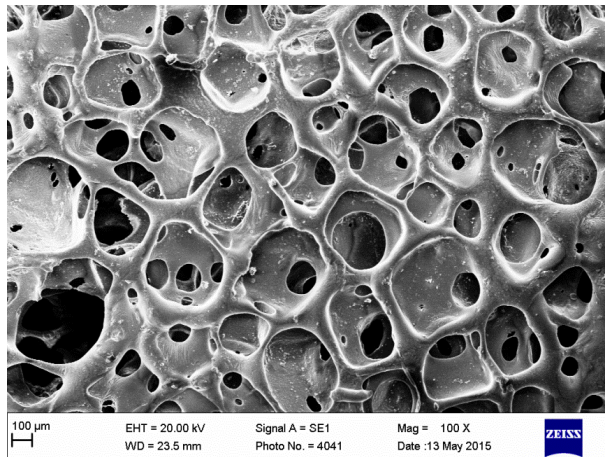
POLITECHNIKA
GDAŃSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Katedra Technologii Polimerów,
Wydział Chemiczny

Rusztowanie tkankowe

Trójwymiarowe, porowate struktury, które są biologicznymi substytutami pozwalającymi na odtworzenie, utrzymanie lub poprawę funkcjonowania tkanki



[Grolik M.: *Inżynieria tkankowa – nowe narzędzie w rekonstrukcji tkanek*; Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe 3 (2011) 33-41.]

[Kucinska-Lipka J., Marzec M., Gubanska I., Janik H., Porosity and swelling properties of novel polyurethane-ascorbic acid scaffolds prepared by different procedures for potential use in bone tissue engineering. JOURNAL OF ELASTOMERS AND PLASTICS. 2016. DOI: 10.1177/0095244316672093]

Rusztowania tkankowe- wymagania

- **biokompatybilne,**
- **nietoksyczne,**
- **powinny pobudzać do tworzenia tkanki**
- **wykazywać właściwości bioaktywne**
- **muszą zapewniać także odpowiednie wsparcie dla odbudowującej się tkanki- właściwości wytrzymałościowe**
- **po wszczepieniu do organizmu człowieka, stopniowo muszą ulegać biodegradacji**

Rusztowania tkankowe- procedura zastosowań

1. Wyizolowanie wyspecjalizowanych komórek na drodze biopsji od pacjenta,
2. Wysianie ich na trójwymiarowym rusztowaniu tkankowym, namnozenie oraz wzrost na tym podłożu w kontrolowanych warunkach
3. Wszczepienie rusztowania tkankowego wraz z komórkami w miejsce uszkodzonej tkanki w organizmie pacjenta, w celu bezpośredniego wytworzenia nowej tkanki w miejscu chorobowo zmienionym.

Tkanka narasta kosztem wszczepionej struktury, która z biegiem czasu ulega degradacji w środowisku organizmu ludzkiego.

Wada- wymagane kilka operacji

Alternatywa

wszczepienie rusztowania tkankowego dla odbudowującej się tkanki *in vivo*, w celu stymulowania do bezpośredniego formowania się tkanki *in situ* w miejscu jej ubytku.

Zaleta - zmniejszona liczba wymaganych operacji, skrócony czas rekonwalescencji pacjenta, eliminacja konieczności przyjmowania leków immunosupresyjnych, - przeszczep autologiczny.

Rusztowania tkankowe- polimery stosowane

1) Naturalne

proteiny i polisacharydy m.in.: chitozan, celuloza, kolagen, elastyna, jedwab, glikozaminoglikany, chityna, skrobia, czy też alginiany i hialuroniany

[Nałęcz M.: *Biocybernetyka I inżynieria biomedyczna 2000 Tom 4 Biomateriały*; Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003.]

2) Syntetyczne

liniowe poliestry alifatyczne - poliglikolid (poli(kwas glikolowy) (PGA) , polilaktyd (poli(kwas mlekowy) (PLA), kopolimery kwasu glikolowego i kwasu mlekowego (PLGA), poli(ϵ -kapolakton) (PCL) i polihydroksymaślan (PHB)
poli(fumaran propylenu) (PPF), polifosfoestry, polifosfazeny (PF) i poliuretany (PU)

[Subia B., Kundu J., Kundu S. C.: *Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*; dostęp online: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/9798.pdf>, (dostęp online: 5. 12. 2014r.).

Mikos A. G., Thorsen A. J., Czerwonka L. A., Bao Y., Langer R., Winslow D. N., et al.: *Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams*; *Polymer* 35 (1994) 1068-1077.].

Tang D., Tare R. S., Yang L-Y., Williams D. F., et al.: *Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration*; *Biomaterials* 83 (2016) 363-382].

Rusztowania tkankowe- metody wytwarzania

Bulk PU

- Solvent casting/salt leaching
Porowatość do 93%, wielkość porów do 500 μm
- Thermally Induced Phase Separation
•Porowatość powyżej 90%, wielkość porów do 200 μm
- Melt Moulding
•Porowatość do 88%, wielkość porów do 500 μm
- Emulsion Freeze-drying
•Porowatość do 97%, wielkość porów do 300 μm
- Electrospinning
- 3D printing

PU Scaffold

Dlaczego PU?? - zalety

- Możliwość zmiany właściwości fizyko-chemicznych i mechanicznych poprzez zmianę i stosunek molowy surowców użytych do syntezy
- Bikompatybilne, biodegradowalne- użycie odpowiednich surowców
- Możliwość modyfikacji w celu poprawy właściwości

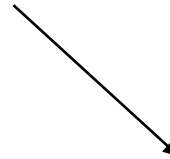
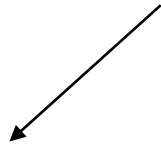
PU - wyzwania

**PU nie są materiałami aktywnymi biologicznie-
konieczna **modyfikacja!!****

Oligomer	Diizocyjanian	Katalizator	Przedłużacz
PU- tkanki miękkie			
PCL, 2,2'-ditiolietanol (DiT)/(L-Arabinitol), Diol poli(d,l-kwasu mlekowego), Makrodiol (MD) na bazie poliwęglanu	HMDI, HDI, IPDI, LDI	DBTL, Oktanian cyny, 2-etyloheksanian cyny	Woda, glikol etylenowy tert-butanol, L-cysteina dimetylowa (ester), Piperazyna (PP)/ BDO, Kwas dimetylopropionowy (DMPA) DMPA etylenodiamina (EDA) etyloester L-lizyny/ L-ornityny
PU- tkanki sztywne			
PCL, olej rycynowy, kwas winowy, gliceryd oleju słonecznikowego, Kopolimer (poli(glikol etylenowy)-poli(glikol propylenowy)-poli(glikol etylenowy)-poli(ϵ -kapolakton)) ((PEG-PPG-PEG)-PCL), PEG, PTMG	IPDI, HMDI, HDI, TDI, LDI	2-etyloheksanian cyny (II), DBTL,	Cysteamina, L-glutamina/kwas askorbinowy, BDO, 1,4,3,6-dianhydro-D-sorbitol (ISO), kwas maleinowy (MA), EG

Nasze prace badawcze

Biodegradowalne poliuretany jako rusztowania tkankowe

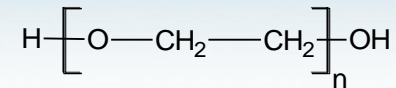
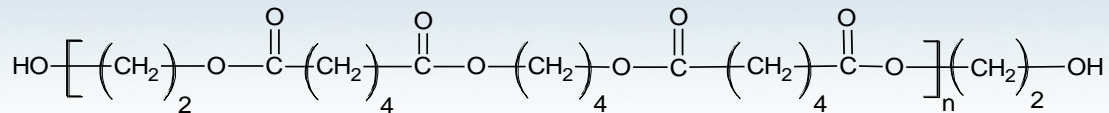


Tkanki miękkie

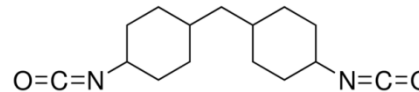
Tkanki kości

Substraty użyte w pracach badawczych

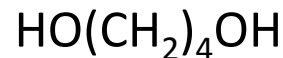
- **Oligomerole: dHEBA, PEG**



- **Diizocyjaniany HDI, HMDI**



- **Przedłużacze DBO**



- **Katalizatory BDTL, DABCO, HMTA, systemy bezkatalizatora**

- **Modyfikatory**

Problemy

- Cytotoksyczność diizocyjanianów??

Aromatyczne diizocyjaniany (TDI, MDI):

Toksyczne aminy wydzielane podczas długo terminowych badań *in vivo* .

Alifatyczne diizocyjaniany– alternatywa:

Ich produkty degradacji (w środowisku organizmu) to nietoksyczne aminy, które są usuwane z organizmu w naturalnym cyklu życiowym.

Szycher M, Siciliano A. *J Biomater Appl* 1991;5:323–36;

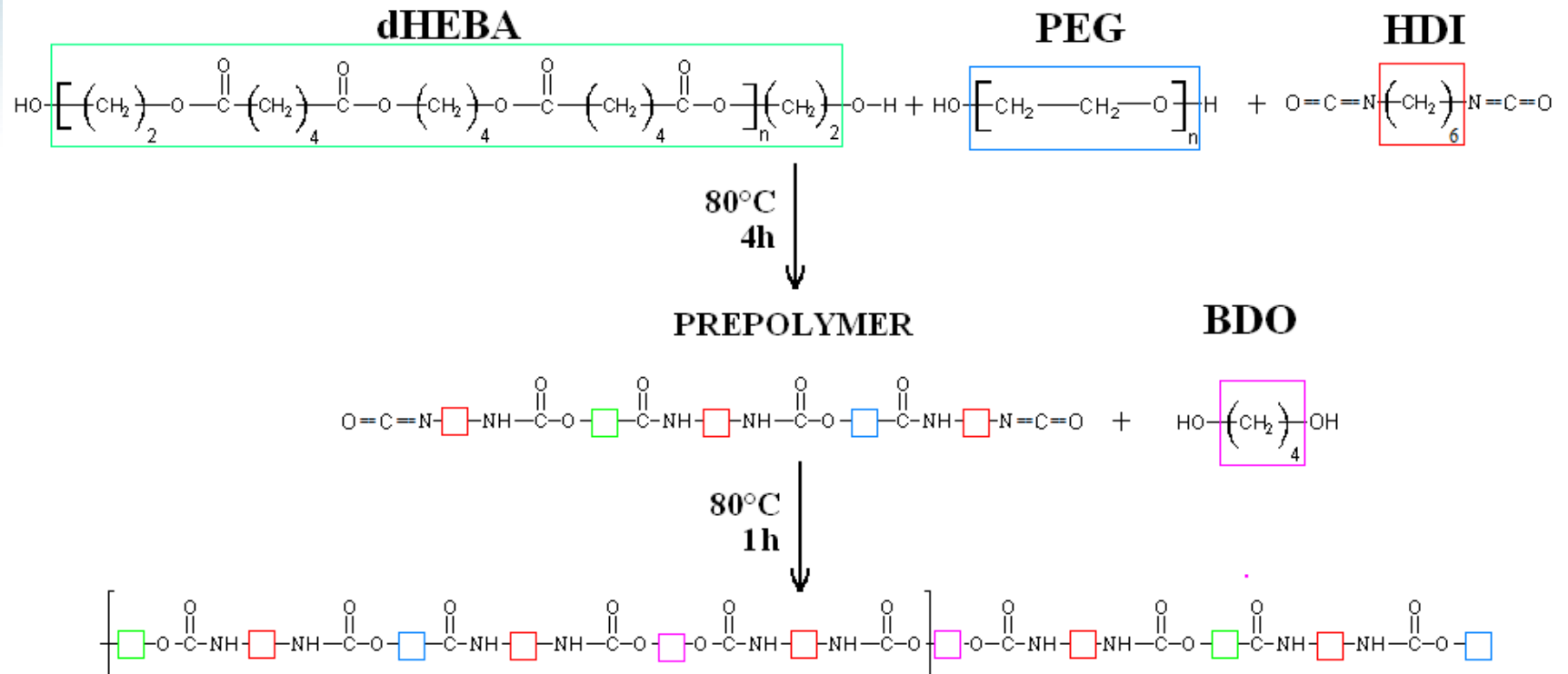
Coury A. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Boston: Elsevier Academic Press; 2004. p. 411–30;

Blais P. Letter to the editor. *J Appl Biomater* 1990;1:197;

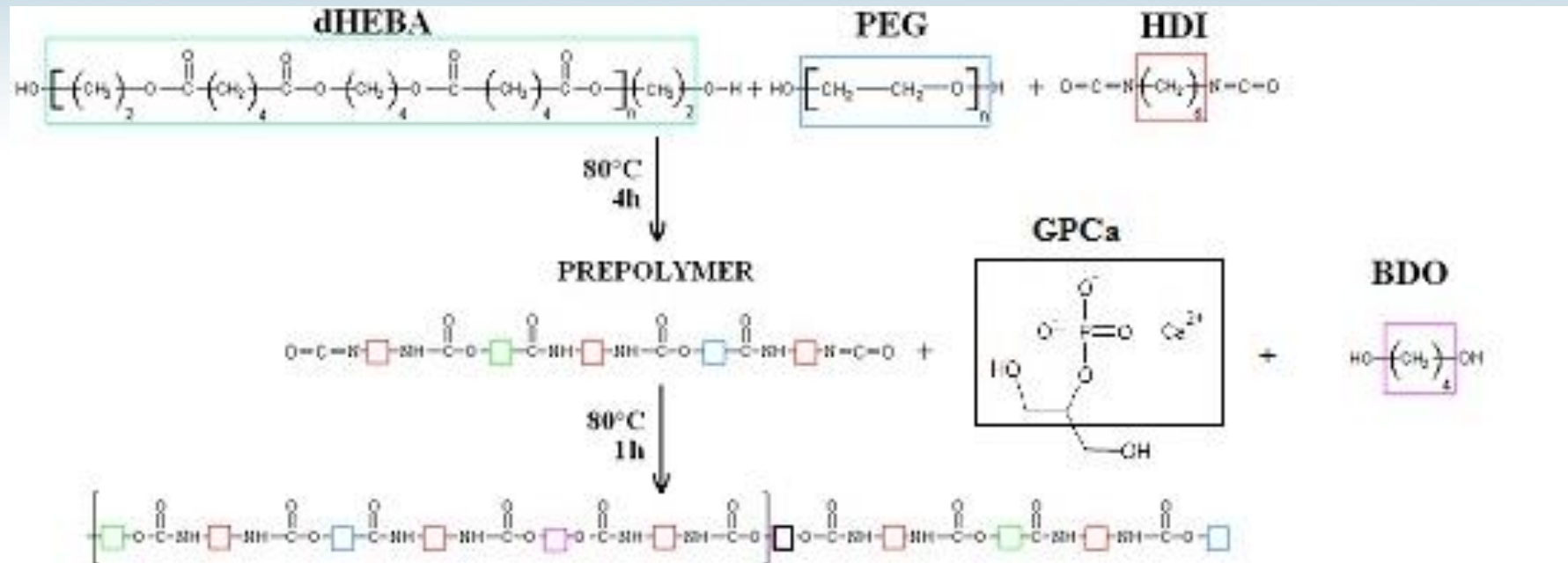
Caracciolo PC, Thomas V, Vohra YK,. *J Mater Sci Mater Med*. 20 (2009) 2129-2137;

Guelcher SA, Gallagher KM, Didier E. *Acta Biomater*. 2005; 1: 471-484.

Synteza PUR

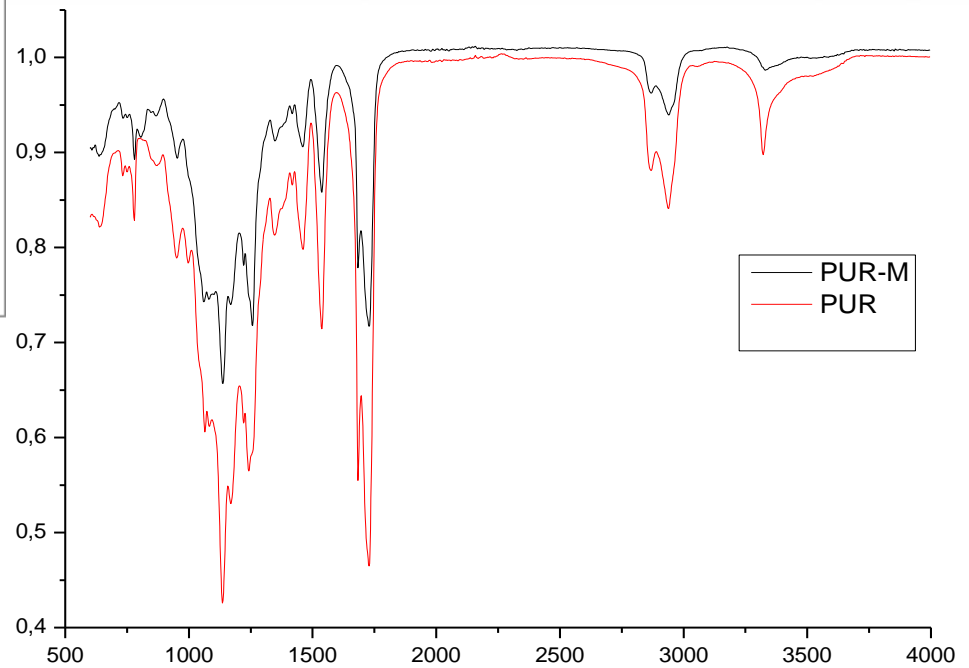
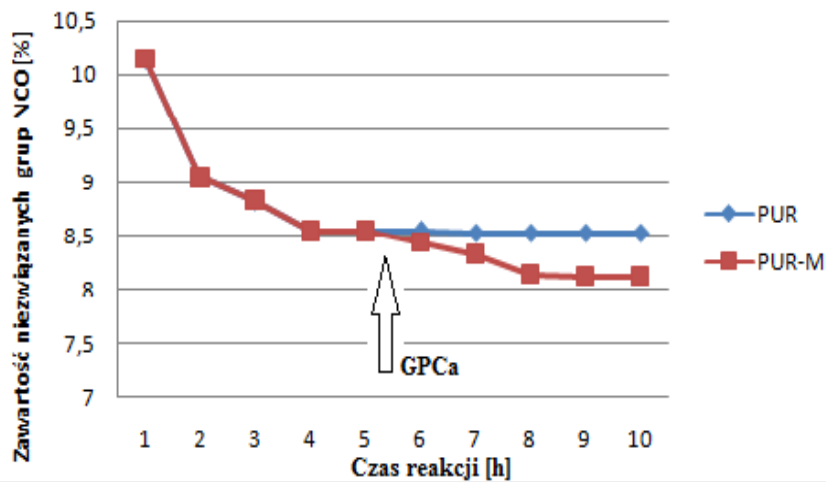


Synteza PUR-M



Synteza PUR, PUR-M

Kinetyka reakcji



Problemy

- **Cytotoksyczność katalizatorów???**

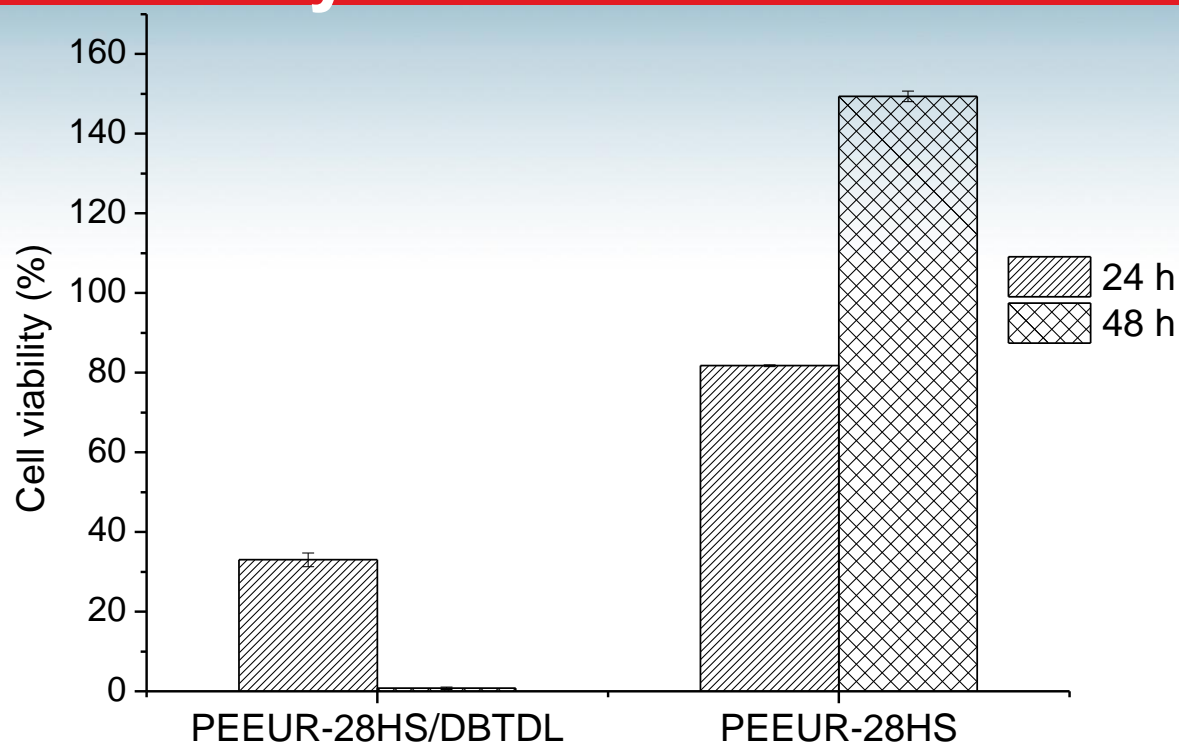
Tanzi et al. in 1994 wykazał efekt cytotoksyczny powszechnie używanych katalizatorów do syntezy poliuretanów testami 3T3 cells and HEC :

DABCO < TMBDA < Sn(Oct)₂ < DBTDL

DBTDL – najczęściej stosowany katalizator w syntezie biomedycznych PU

To były badania na katalizatorach a nie na PUR katalizowanych

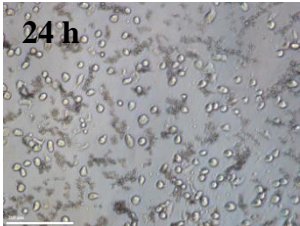
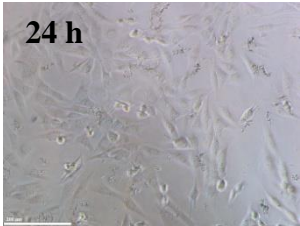
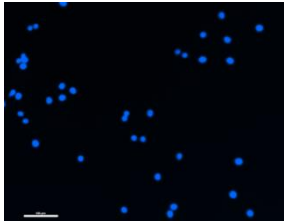
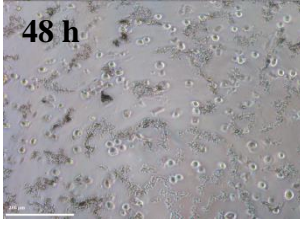
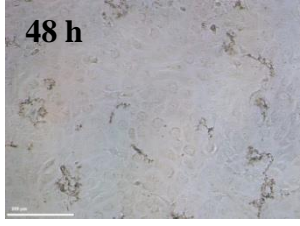
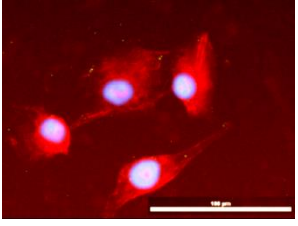
Wpływ PUR syntezowanych z użyciem katalizatora na żywotność komórek



Wyniki testu XTT przeprowadzono po 24 i 48 godzinach hodowli komórkowej

Problemy

Obrazy testu cytotoksyczności przeprowadzonych po 24 i 48 godzinach hodowli i adhezji komórek

CYTOTOXICITY		CELL ADHESION
 <p>24 h</p>	 <p>24 h</p>	
 <p>48 h</p>	 <p>48 h</p>	
PU-28HS/DBTDL	PU-28HS	

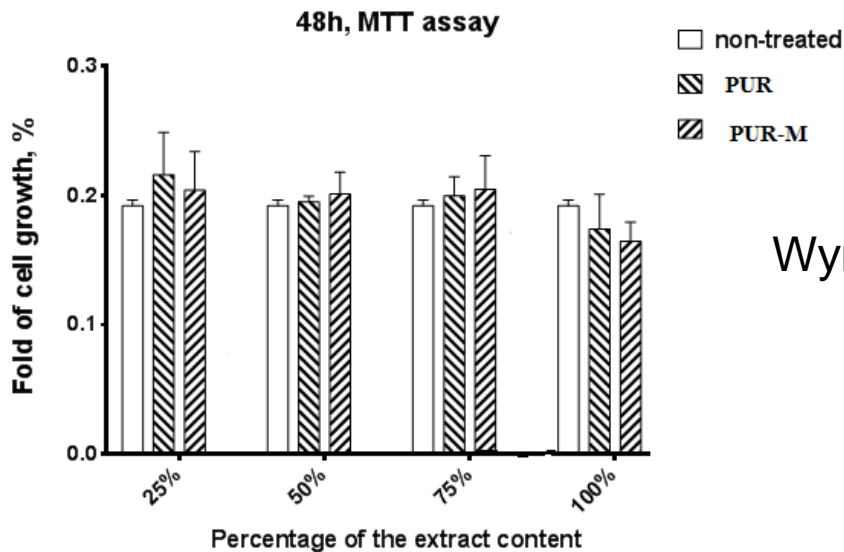
Żywotność komórek PUR otrzymanych bez użycia katalizatora jest wyższa

Modyfikacja PUR- właściwości mechaniczne

Tab. 1 Właściwości mechaniczne PUR i PUR-M

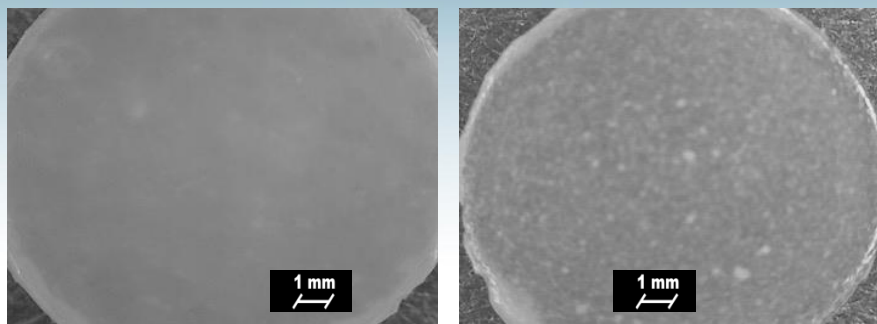
Symbol	T _{SB} (MPa)	Er (%)	Hardness (°ShD)
PUR	12,3±0,2	390±13	31±0,3
PUR-M	18±0,3	280±15	35±2

Modyfikacja PUR- cytotoksyczność



Wyniki testu MTT przeprowadzono po 48 godzinach hodowli komórkowej

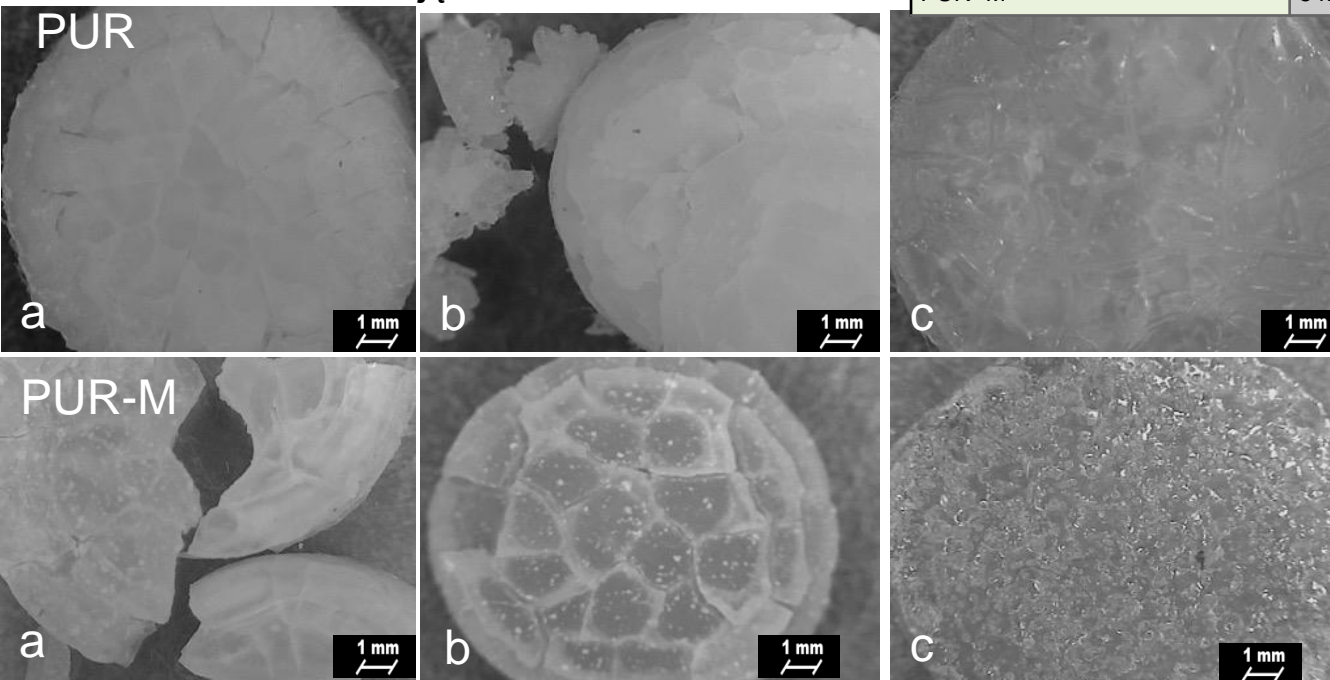
Modyfikacja PUR- oddziaływanie w wybranych mediach



Obraz powierzchni PUR i PUR-M przed inkubacją

Tab. 2 Ubytek masy PUR i PUR-M w wybranych mediach

	medium		
	5 M NaOH	2N HCl	0,1 M CoCl ₂ 20 % H ₂ O ₂
Sample	Ubytek masy[%]		
PUR	50.9± 0.2	38.62± 0.14	4.25± 0.08
PUR -M	54.7± 0.1	35.81± 0.11	2.03± 0.12



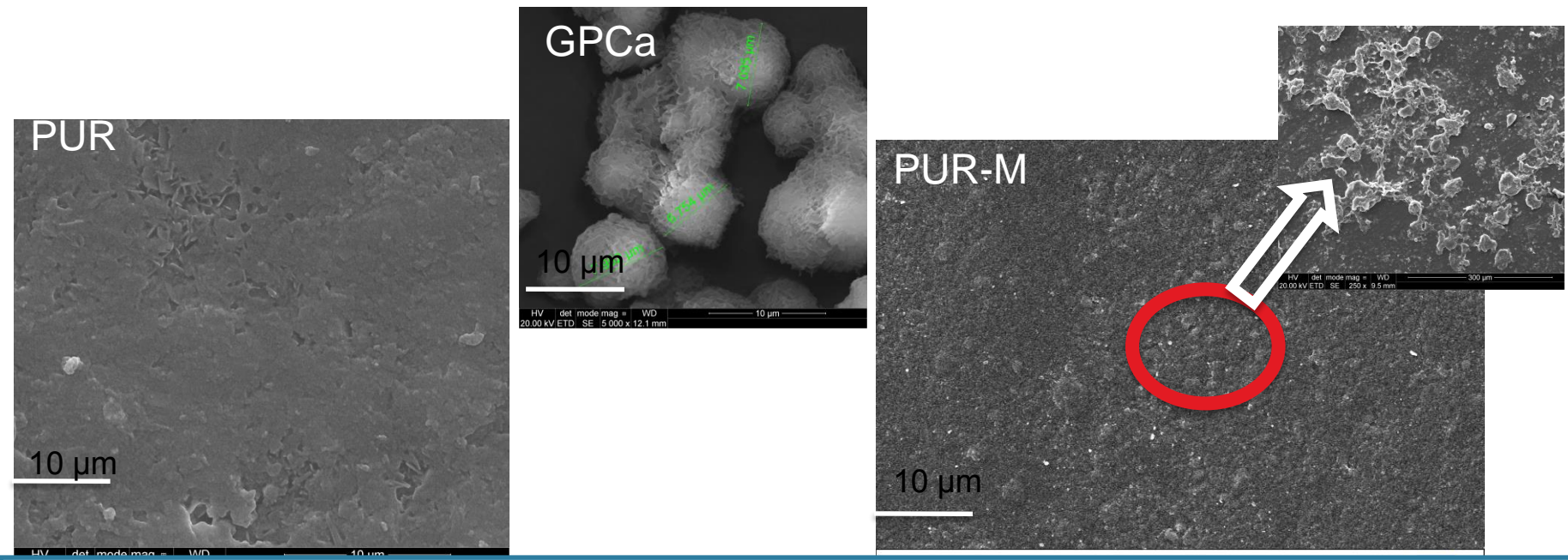
Obraz powierzchni PUR i PUR-M po inkubacji

- a) 5M NaOH,
b) 2N HCL,
c) 0,1M CoCl₂ 20 % H₂O₂

Modyfikacja PUR- SEM powierzchni

Jak przyspieszyć kalcynację??

Modyfikacja PUR: wprowadzenie glicerofosforanu wapnia do łańcucha PUR



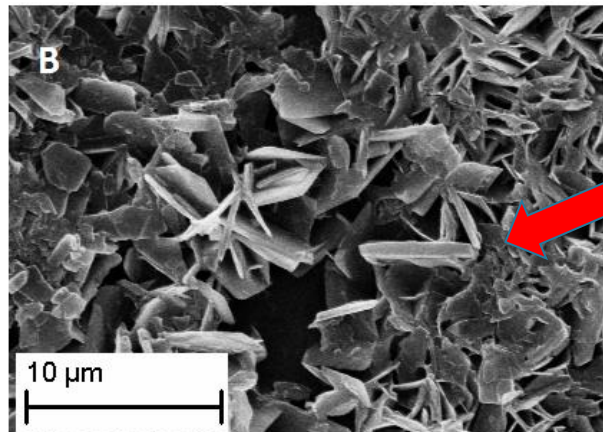
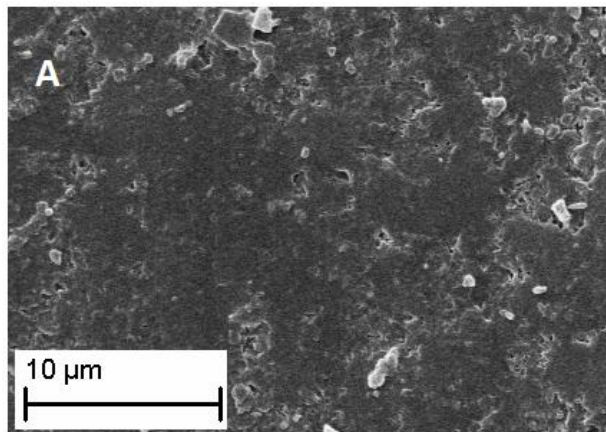
SEM- PUR, PUR-M, GPCa- powierzchnia

Kalcyfikacja PUR

Jak przyspieszyć kalcyfikację??

Modyfikacja PU: wprowadzenie związków wapnia w łańcuch PUR

SEM - powierzchnia PU



Zarodki krystalizacji
fosforanów wapnia

A – PUR,

B – PUR-M

po 16 dniach inkubacji w roztworze Glomba i Wagnera .

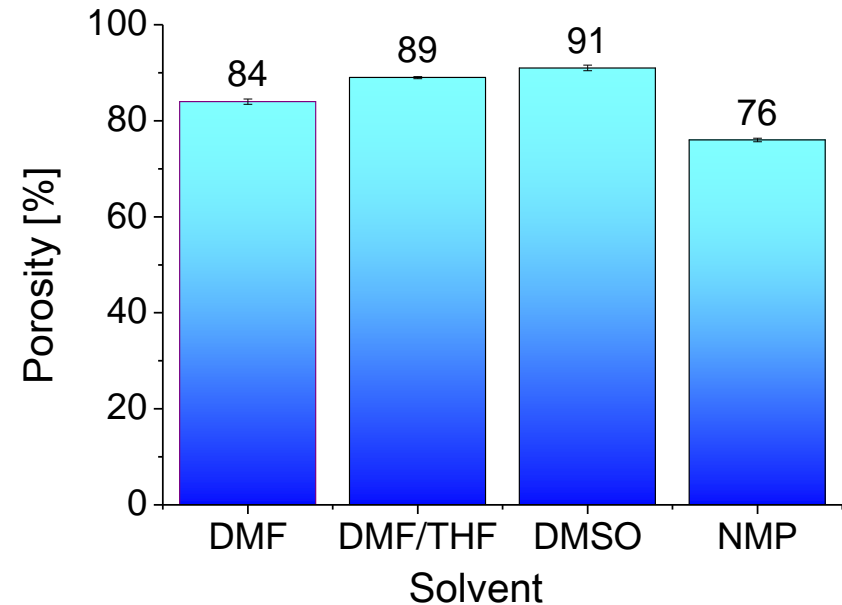
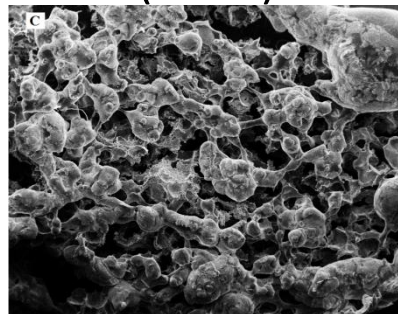
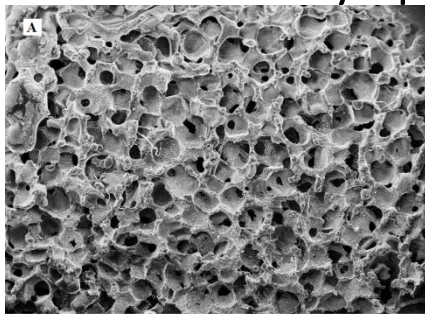
Obecność glicerofosforanu wapnia przyspiesza kalcyfikację.

Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na porowatość rusztowań

PUR: HDI/dHEBA/PEG/BDO rusztowanie otrzymane techniką **SC/PL**.

Rozpuszczalniki:

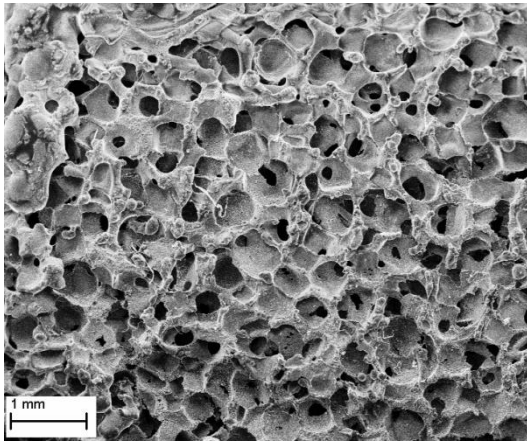
- Dimetyloformamid (DMF),
- Tetrahydrofuran (THF),
- Dimetylosulfotlenek (DMSO),
- N-metylopirolidon (NMP)



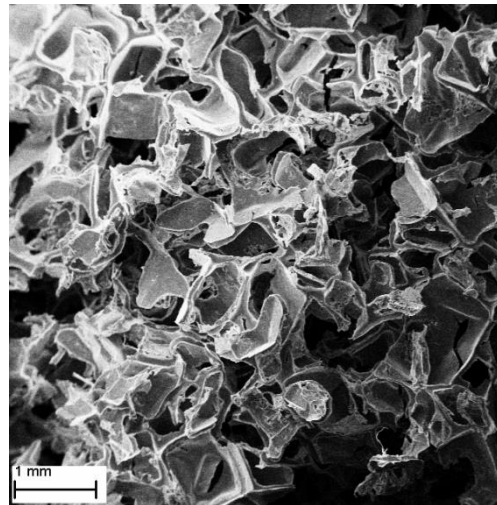
Wpływ typu porogenu na porowatość rusztowań

PU rusztowania tkankowe otrzymano techniką **SC/PL**

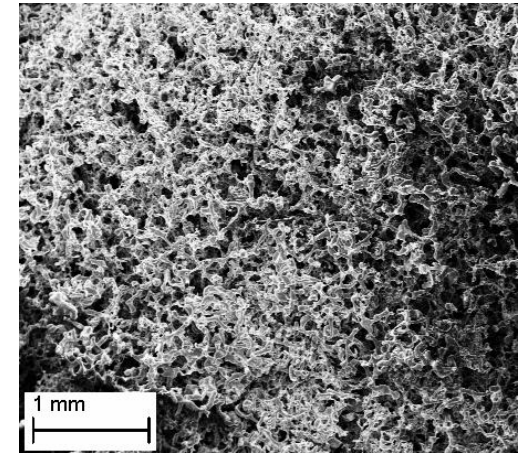
Obrazy SEM rusztowań tkankowych otrzymanych z użyciem różnych poroforów



Cząsteczki NaCl



Cząsteczki sacharozy

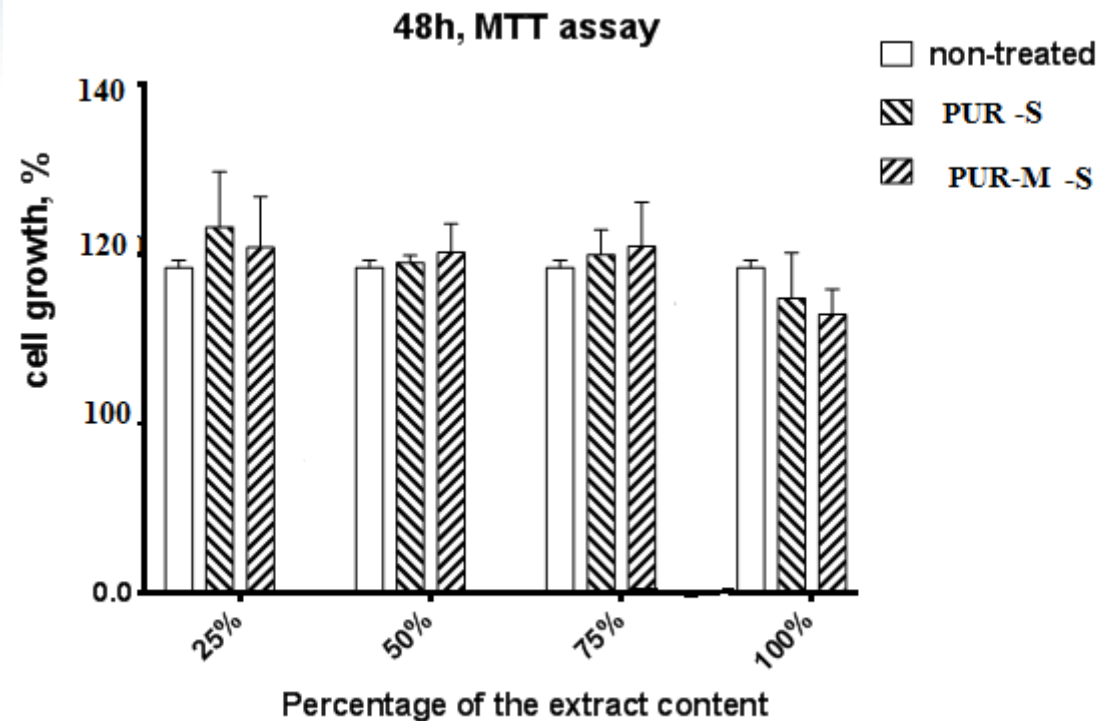
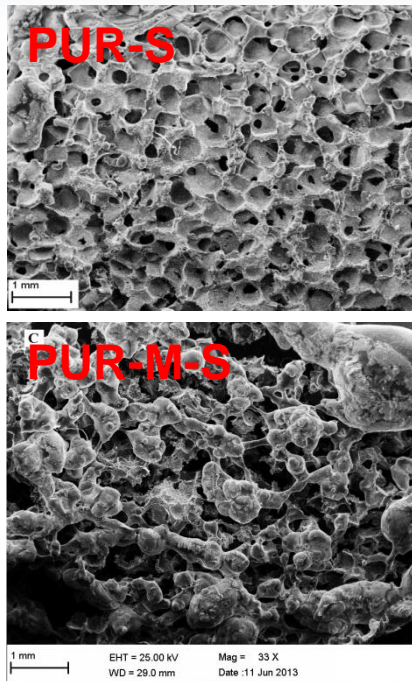


Cząsteczki węgla sodowego

Porowatości i wielkości porów zależy głównie od rodzaju stosowanego porogenu.

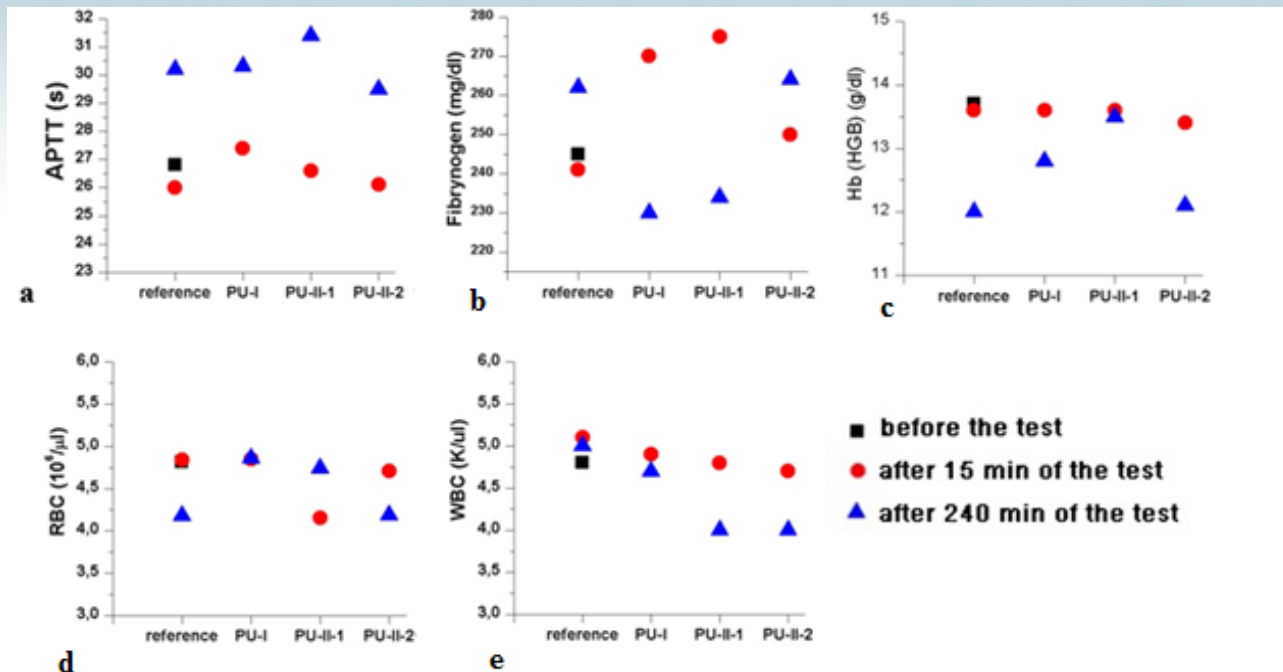
Rusztowania tkankowe- cytotoksyczność

PUR rusztowania tkankowe otrzymano techniką **SC/PL**



Porowate rusztowania tkankowe nie są toksyczne dla komórek ludzkich

Hemokompatybilność krótkoterminowa



PUR-M-S

APTT (a), Fibrinogen (b), Hb (c), RBC (d) and WBC (e).

Brak wpływu na parametry krwi

Wykazano, że PUR syntezowane na rusztowania tkankowe mogą być otrzymywane bez katalizatora, co poprawia żywotność komórek

PU modyfikowane GPCa posiadają właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne odpowiednie dla materiałów stosowanych w inżynierii tkankowej.

Wprowadzenie GPCa do struktury PUR powoduje znaczne przyspieszenie kalcyfikacji (korzystne na rusztowania kości)

Wykazano, że możliwe jest sterowanie porowatością (do konkretnych zastosowań) poprzez wybór odpowiedniego rozpuszczalnika w technologii formowania rusztowań metodą odlewania

Modyfikowane PUR otrzymane w naszym zespole mogą mieć zastosowanie jako rusztowania do hodowli tkanek kostnych i obecnie przechodzimy do etapu badań in vivo

Podziękowania

- Prof. dr hab. inż Helena Janik
- dr inż. Iga Gubańska

doktoranci

- mgr inż. Alicja Lewandowska
- Mgr inż. Agnieszka Przybytek

dyplomanci

- mgr inż. Kamila Błazek,
- mgr inż. Ada Araszekiewicz
- mgr inż. Daria Kowalkowska

Podziękowania

- dr hab. inż Hubert Cieśliński
- dr Olexaner Korchynski
- dr inż. Anna Skwarska
- dr Marta Pokrewczyńska
- prof. Tadeusz Drewa
- prof. Szumiel-Lewandowska
- dr Ilona Kalaszczyńska

Nasze publikacje

- 1. Kucinska-Lipka, J.; Gubanska, I.; Sienkiewicz, M. Thermal and mechanical properties of polyurethanes modified with L-ascorbic acid. *J THERM ANAL CALORIM*. 2016. DOI 10.1007/s10973-016-5743-9.
- 2. Kucinska-Lipka J., Marzec M., Gubanska I., Janik H., Porosity and swelling properties of novel polyurethane-ascorbic acid scaffolds prepared by different procedures for potential use in bone tissue engineering. *JOURNAL OF ELASTOMERS AND PLASTICS*. 2016. DOI: 10.1177/0095244316672093
- 3. Kucinska-Lipka, J.; Gubanska, I.; Janik, H.; et al. L-ascorbic acid modified poly(ester urethane)s as a suitable candidates for soft tissue engineering applications *REACTIVE & FUNCTIONAL POLYMERS* Volume: 97 Pages: 105-115 2015
- 4. Kucinska-Lipka, J.; Gubanska, I.; Janik, H. Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future perspectives *POLYMER BULLETIN* Volume: 72 Issue: 9 Pages: 2399-2419 2015
- 5. Kucinska-Lipka, J.; Gubanska, I.; Janik, H.; et al. Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS* Volume: 46 Pages: 166-176 1 2015
- 6. Janik, Helena; Marzec, Michalina Materials used for the production of bone implants *PRZEMYSŁ CHEMICZNY* Volume: 94 Issue: 2 Pages: 182-185 2015
- 7. Kucinska-Lipka, Justyna; Gubanska, Iga; Janik, Helena Polyurethanes modified with natural polymers for medical application. Part II. Polyurethane/gelatin, polyurethane/starch, polyurethane/cellulose *POLIMERY* Volume: 59 Issue: 3 Pages: 197-200 2014
- 8. Janik, H.; Marzec, M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS* Volume: 48 Pages: 586-591 1 2015
- 9. Janik, Helena; Sienkiewicz, Maciej; Kucinska-Lipka, Justyna Edited by: Dodiuk, H; Goodman, SH Polyurethanes *HANDBOOK OF THERMOSET PLASTICS, 3RD EDITION* Book Series: PDL Handbook Series Pages: 253-295 2014
- 10. Kucinska-Lipka, Justyna; Gubanska, Iga; Janik, Helena Polyurethanes modified with natural polymers for medical application Part I. *POLYURETHANE/CHITOSAN AND POLYURETHANE/COLLAGEN* *POLIMERY* Volume: 58 Issue: 9 Pages: 678-684 2013
- 11. Kucinska-Lipka, Justyna; Gubanska, Iga; Janik, Helena Gelatin-Modified Polyurethanes for Soft Tissue Scaffold *SCIENTIFIC WORLD JOURNAL* Article Number: 450132 2013

I OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA NAUKOWA

IMPLANTY 2018

OD IDEI DO KOMERCJALIZACJI

Justyna Kucińska-Lipka

email: juskucin@pg.edu.pl