

## SKROBIA ZIEMNIACZANA JAKO BIOMATERIAŁ DO WYTWARZANIA RUSZTOWAŃ NA POTRZEBY INŻYNIERII TKANKOWEJ

### POTATO STARCH AS A BIOMATERIAL FOR THE PRODUCTION OF SCAFFOLDS FOR THE NEEDS OF TISSUE ENGINEERING

dr inż. Adrian Chlanda, dr inż. Ewa Kijeńska  
Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Materiałowej  
ul. Wołoska 141, 02-507 Warszawa, e-mail: adrian.chlanda@inmat.pw.edu.pl

#### Streszczenie

Skrobia ziemniaczana jest naturalnym biodegradowalnym polimerem, który może być wykorzystywany jako składnik struktur wspomagających regenerację uszkodzonych tkanek. Wytworzone na potrzeby inżynierii tkankowej biomateriałowe rusztowania powinny charakteryzować się m.in.: zgodnością właściwości fizycznych i mechanicznych z właściwościami tkanek pacjenta, trwałością i stabilnością właściwości fizyko mechanicznych w ściśle określonym przedziale czasu, stabilnością wymiarów oraz łatwością sterylizacji i wyjaławiania. Publikacja stanowi krótkie podsumowanie prac naukowych opisujących próby wytworzenia i charakteryzacji rusztowań wyprodukowanych z wykorzystaniem skrobi ziemniaczanej.

**Słowa kluczowe:** inżynieria tkankowa, rusztowanie tkankowe, skrobia ziemniaczana

#### Abstract

Potato starch is a natural biodegradable polymer that can be used as an ingredient in structures supporting the regeneration of damaged tissues. The biomaterial scaffolds produced for the needs of tissue engineering should be characterized, among others, by the compatibility of physical and mechanical properties with the patient's tissue properties, durability and stability of physico mechanical properties in a strictly determined time interval, dimensional stability, and simplicity of sterilization. The re-

view presents a short summary of scientific papers describing the attempts to create and characterize scaffolds produced using potato starch.

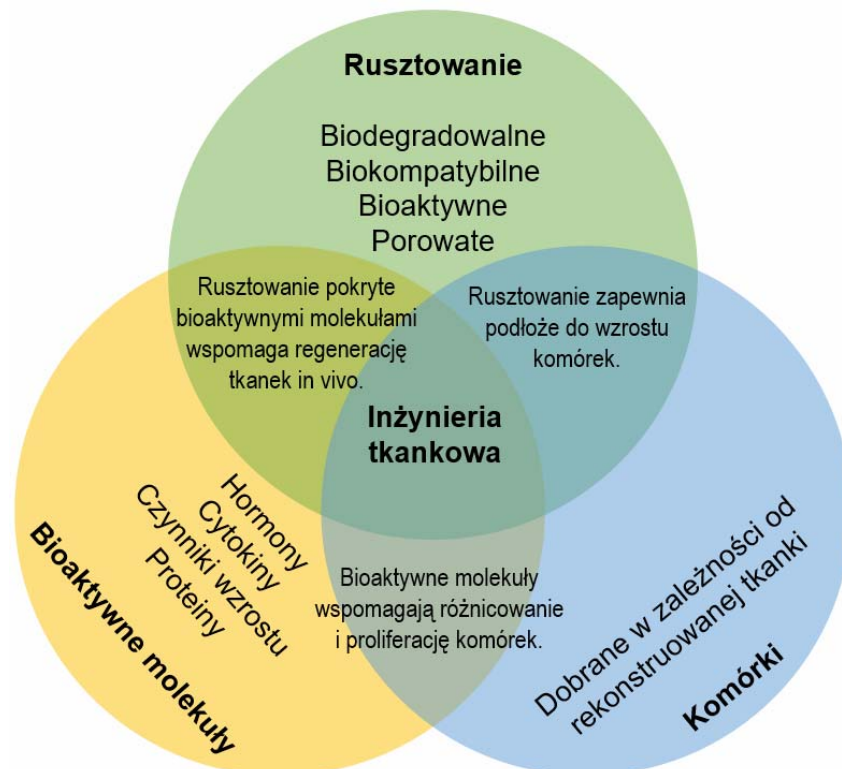
**Keywords:** potato starch, tissue engineering, tissue scaffold

### Inżynieria tkankowa

Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Nałęcz, Błażewicza i Stocha: „Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, zajmującą się wykorzystaniem wiedzy medycznej oraz metod inżynierii materiałowej do wytwarzania funkcjonalnych zamienników uszkodzonych tkanek lub całych narządów” (Nałęcz i in. 2003). Zadania inżynierii tkankowej realizowane są poprzez wspomaganie i stymulowanie komórek do rozwoju oraz do wytwarzania własnej macierzy zewnątrzkomórkowej, co umożliwia powstanie nowych tkanek lub narządów. W ten sposób eliminuje się konieczność przeszczepów od innych dawców, które są obarczone ograniczeniami związanymi z brakiem dostępności materiału biologicznego lub ryzykiem odrzucenia przeszczepu.

Jednym z kluczowych elementów inżynierii tkankowej jest biomateriałowe podłoże – rusztowanie, do którego przyczepiają się

komórki. Do budowy takiego rusztowania często wykorzystuje się materiały pochodzenia biologicznego i ma ono zapewnić komórkom stabilny fundament, do którego mogą się przyczepić, a potem dzielić. Połączenie biomateriałowego podłoża, wyhodowanych in vitro komórek i stymulacja ich rozwoju poprzez dobranie odpowiednich czynników wzrostu w jeden skutecznie działający system imitujący przestrzeń zewnątrzkomórkową stanowi fundament triady inżynierii tkankowej (rys. 1). Bioaktywne rusztowanie, tzw. na miarę, o złożonej nano- i mikrostrukturze, zasiedlone komórkami oraz dodatkowo dostarczające czynniki biologiczne mogące wspomagać procesy adhezji, namnażania, różnicowania się komórek oraz formowania się nowej tkanki poprzez odtworzenie rozległych jej ubytków, stanowi produkt nowoczesnej inżynierii tkankowej możliwy do zaimplantowania do ciała pacjenta.

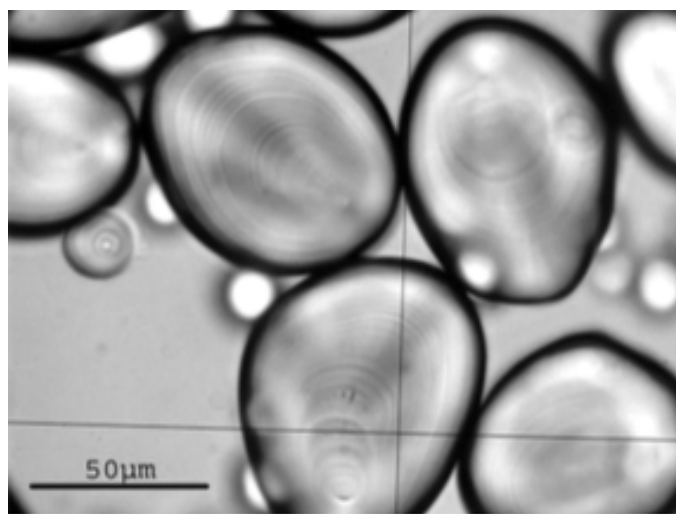


Rys. 1. Schemat idei inżynierii tkankowej (Smith, Grande 2015)

Rusztowanie tkankowe, tzw. skafold (ang. scaffold), może być wytworzone z materiałów syntetycznych, naturalnych lub z kompozycji obu typów materiałów. Pozwala to na dopasowanie właściwości rusztowania i stworzenie w ten sposób optymalnych warunków dla przetrwania, wzrostu komórek i wynikającego stąd formowania się żywej tkanki (Idaszek i in. 2016, Kijeńska i in. 2016, Witecka i in. 2016). Jednym z naturalnych biodegradowalnych materiałów, jakie mogą być wykorzystywane w tym kontekście, jest skrobia ziemniaczana.

### Skrobia ziemniaczana

Skrobia jest polisacharydem powstającym podczas fotosyntezy z dwutlenku węgla i wody w trakcie wieloetapowego procesu sterowanego enzymatycznie, składającego się z polimeryzacji, depolimeryzacji i w końcu wtórnej repolimeryzacji jednostek glukozy (Orłowska 2003). Występuje w roślinach i stanowi materiał zapasowy odkładany w postaci ziaren (granulek – rys. 2), których kształt i rozmiar zależy od ich biologicznego pochodzenia – rodzaju rośliny (Mączyński 2015). Rozmiar granulek skrobi ziemniaczanej mieści się w granicach 10-100  $\mu\text{m}$  (Orłowska 2003).



Rys. 2. Granulki skrobi ziemniaczanej (Nakamatsu i in. 2006)

Ziarna skrobi są zbudowane z dużych agregatów krystalicznych (trichidów) oraz mniejszych struktur amorficznych. Struktury krystaliczne zbudowane są z amylopektyny, faza amorficzna natomiast tworzona jest przez amylozę (Mączyński 2015). Amyloza i amylopektyna są polimerami zbudowanymi z połączonych w długie łańcuchy cząstek D-glukozy. Ponieważ D-glukoza jest jedynym monomerem wchodzącym w skład obu wielocukrów, są one homopolimerami D-glukozy. Amyloza jest to polimer o budowie liniowej (rys. 3), składający się z monomerów D-glukozy, powiązanych wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi i tworzących lewoskrętną helisę stabilizowaną wiązaniami wodorowymi. W amylopektynie, posiadającej podobną strukturę szkieletową do amylozy, występują dodatkowo rozgałęzienia w miejscach wiązań  $\alpha$ -1,6-glikozydowych (Zgoda i in. 2009).

W łańcuchach skrobi występuje wiele grup hydroksylowych, co powoduje, że jej granulki mają właściwości hydrofilowe oraz specyficzne powinowactwo (reaktywność) do alkoholi. Proporcje amylozy do amylopektyny w skrobi są zmienne i charakterystyczne dla rośliny, z której pochodzą (Lu i in. 2009). Zawartość amylozy i amylopektyny w skrobi ziemniaczanej wynosi kolejno 21 oraz 79%/s.m. (Mączyński 2015).

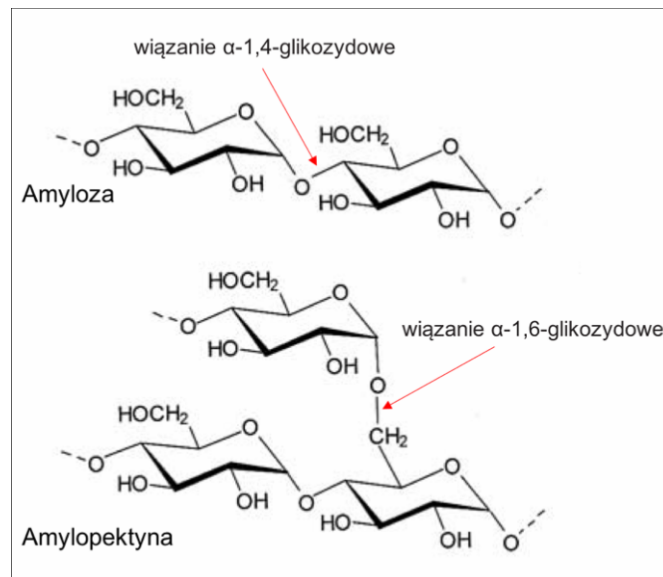
### Rusztowania tkankowe na bazie skrobi ziemniaczanej

W ostatnich latach opracowano kilka strategii wytwarzania rusztowań o różnej zawartości skrobi, mieszczącej się w zakresie 0,5-50% wagowo (Nakamatsu i in. 2006, Torres i in. 2007, Yang i in. 2014). Postulowano m.in. wykorzystanie technik opartych na termicznie wspomaganą separacji faz (ang. TIPS –

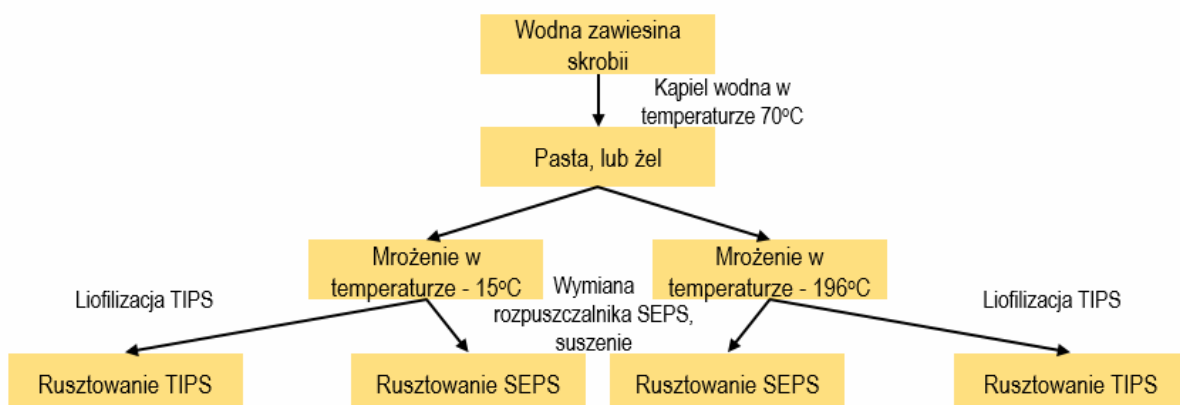
Thermally Induced Phase Separation) lub separacji faz na drodze wymiany rozpuszczalnika (ang. SEPS – Solvent Exchange Phase Separation) – rysunek 3.

Rusztowania wytworzone za pomocą proponowanych metod mają porowatą architekturę o kontrolowanej wielkości porów (rys. 5), co jest szczególnie istotne z uwagi na ich docelowe zastosowanie. W początkowej fazie, po implantacji, pory umożliwiają komórkom wnikanie w głąb rusztowania oraz – na późniejszym etapie – pełnią rolę kanałów dostarczających składniki odżywcze i odbierających produkty metaboliczne do i z komórek. Wykazano, że porowata mikrostruktura

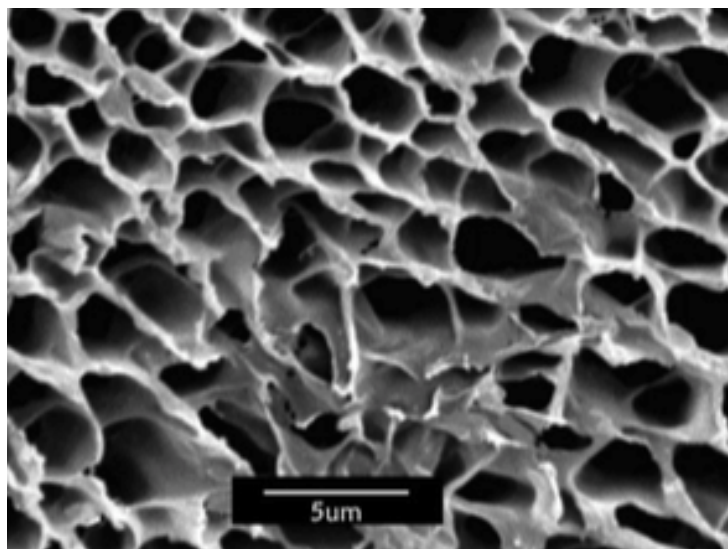
rusztowań jest zależna od szybkości mrożenia pasty ze skrobi (rys. 4) – większa szybkość mrożenia skutkuje mniejszymi kryształkami lodu i mniejszymi porami w rusztowaniu. Należy pamiętać, że rusztowania o zbyt małej wielkości porów nie spełniają wymagań stawianych nowoczesnym produktom medycyny spersonalizowanej, ponieważ wielkość porów jest jednym z czynników definiujących zdolności adaptacyjne komórek, ich wzrost i proliferację (Boccaccini, Maquet 2003). Pomimo tego ograniczenia nano-porowate rusztowania mogą znaleźć zastosowanie jako systemy kontrolowanego dostarczania leków (Garg i in. 2012).



Rys. 3. Budowa skrobi (Lu i in. 2009)



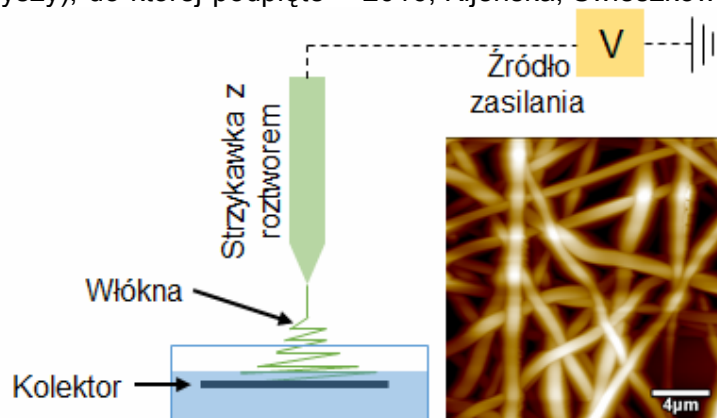
Rys. 4. Przykład zastosowania technik SEPS i TIPS do wytworzenia rusztowania tkankowego o różnej zawartości skrobi ziemniaczanej (Nakamatsu i in. 2006)



Rys. 5. Porowate rusztowanie uzyskane ze skrobi ziemniaczanej metodą TIPS (Nakamatsu i in. 2006)

Inną metodą wytwarzania rusztowań tkankowych zawierających skrobię ziemniaczaną jest elektroprzędzenie z roztworu (Cárdenas i in. 2016). Jest to relatywnie tania technika, umożliwiająca wykorzystanie różnego rodzaju polimerów biodegradowalnych. Układ do elektroprzędzenia składa się ze zbiornika na roztwór polimeru (często w postaci strzykawki), elektrody (w postaci metalowej igły lub dyszy), do której podpięte

jest stałoprądowe źródło wysokiego napięcia (w zależności od polimeru i docelowej architektury włókniny stosuje się napięcie w zakresie od kilku do kilkudziesięciu kilowoltów) oraz uziemionego kolektora (zazwyczaj w postaci płyty dla włókien nieukierunkowanych, lub obracającego się cylindra dla włókien ukierunkowanych), na którym gromadzą się włókna tworzące włókninę (Kijeńska i in. 2016; Kijeńska, Swieszkowski 2017).



Rys. 6. Schemat aparatury do elektroprzędzenia z roztworu z przykładowym obrazem włóknistego rusztowania (Źródło: niepubl. materiały autorów)

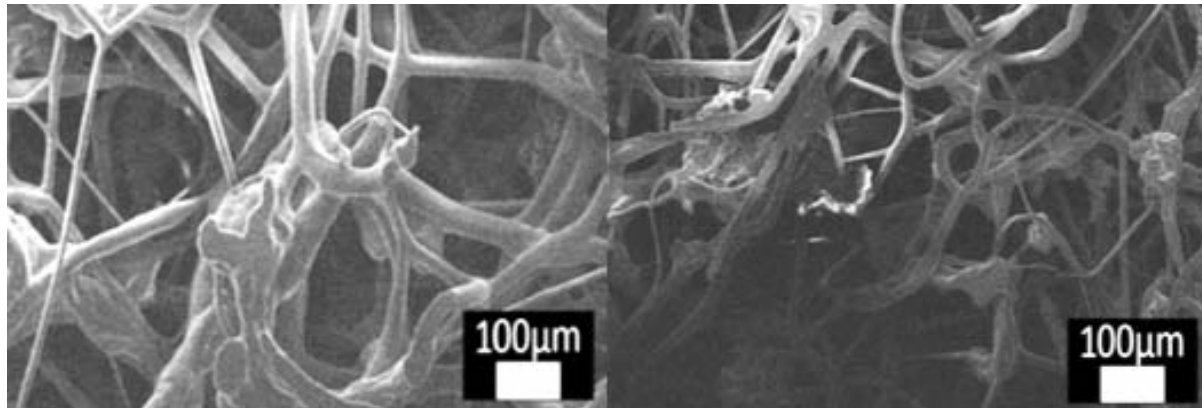
W pracy Cardenas i innych (2016) opisano procedurę wytwarzania i charakterystycję elektroprzędzonej włókniny z roztworu skrobi ziemniaczanej i dimetylosulfotlenku. Układ do elektroprzędzenia poddano modyfikacji polegającej na zanurzeniu płyty kolektora w wodnym roztworze etanolu (rys. 6). Celem modyfikacji było wymycie pozostałości rozpuszczalnika, którego obecność może

mieć szkodliwy wpływ na komórki po implantacji.

Wykazano, że za pomocą elektroprzędzenia możliwe jest wytworzenie z roztworu skrobi ziemniaczanej jednorodnych włókien o kontrolowanej wielkości średnic w zakresie 10-35  $\mu\text{m}$  (rys. 7). Uzyskane w ten sposób włókna mają dużą elastyczność, co jest spowodowane najprawdopodobniej wysokim współczynnikiem długości do średnicy włó-

kien. Otrzymane przez ww. autorów wyniki doświadczalne sugerują również wysoką wytrzymałość termiczną badanych włókien, która pozwala na ich użytkowanie w tempe-

raturze do 250°C (Cárdenas i in. 2016). Umożliwia to ich zastosowanie nie tylko w inżynierii tkankowej, ale również w innych gałęziach przemysłu.



Rys. 7. Włókna uzyskane z roztworu skrobi ziemniaczanej podczas procesu elektroprzędzenia (Cárdenas i in. 2016)

Ważnym czynnikiem warunkującym potencjalne aplikacje rusztowania tkankowego są jego właściwości mechaniczne. Jest to spowodowane faktem, że rusztowanie pełni rolę podłoża dla komórek i przenosi obciążenia powstające w tkance. Dodatkowo, opracowania literaturowe dowodzą, że sztywność powierzchni rusztowań wpływa na adhezję i różnicowanie się komórek (Reilly, Engler 2010, Yang i in. 2008). Z tego powodu rusztowania wytworzone z udziałem skrobi ziemniaczanej poddaje się ocenie właściwości mechanicznych.

W specjalistycznej literaturze można znaleźć doniesienia opisujące badanie indentacji trójwymiarowych porowatych rusztowań o wielkości porów w zakresie 100-1000 µm (Torres i in. 2007). Badanie polega na ocenie twardości materiału poprzez kontakt wgłębniaka (indentera) z powierzchnią badanego materiału. Rusztowania wytworzono ze skrobi z dodatkiem wody jako plastyfikatora (wagowa zawartość skrobi wynosiła 30-50%). W odróżnieniu od technik SEPS i TIPS po żelowaniu mieszaniny skrobia-woda pominięto etap mrożenia i uzyskaną pastę wystawiono na działanie mikrofal o częstotliwości 2450 MHz. Z uwagi na specyfikę próbek badanie prowadzono wgłębniakiem o średnicy 2,38 mm do głębokości indentacji 1 mm. Przedstawione wyniki indentacji mieszczą się w zakresie 4-11 MPa i wskazują na możliwość zastosowania tego typu rusztowań u pacjentów z ubytkami kostnymi.

Wniosek ten jest uzasadniony z uwagi na podobną wartość wytrzymałości na ścisnienie uzyskanej dla naturalnej kości ludzkiej 1-10 MPa (Mow, Hayes 1991) oraz wielkości porów požądanej dla rusztowań stosowanych w inżynierii tkankowej (200-900 µm).

W literaturze dostępne są również publikacje wyników badań biologicznych z zastosowaniem rusztowań o różnej zawartości skrobi w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* (Nakamatsu i in. 2006, Torres i in. 2007, Yang i in. 2014). Badania *in vitro* trójwymiarowych porowatych rusztowań wytworzonych techniką TIPS i SEPS, przeprowadzone w symulowanym środowisku fizjologicznym, nie wykazały ich bioaktywności. Może to skutkować słabszą reakcją otaczającej tkanki po implantacji rusztowania. Bioaktywność rusztowań można modyfikować, np. w kontekście odtworzenia tkanki kostnej, wykorzystywać w tym celu m.in. pokrycia z biocerami, np. hydroksyapatytu (Auclair-Daigle i in. 2005).

Opisane badania *in vivo* obejmowały implantację porowatych rusztowań (wytworzonych metodą *in situ* przez zmieszanie różnych ilości skrobi ziemniaczanej, w zakresie 0,5-4,0% wagowo, z celulozą) do organizmu rocznej samicy psa (Yang i in. 2014). Grupę kontrolną stanowiły rusztowania bez dodatku skrobi. Po tygodniu od implantacji wszczepy zostały usunięte i poddane dalszym badaniom. Wyniki nie wykazały typowych reakcji zapalnych organizmu (takich jak czerwień,

wysięki lub obrzęk). Stwierdzono również lepszą odpowiedź komórkową na porowate rusztowania kompozytowe (celuloza/skrobia) w porównaniu z rusztowaniami wykonanymi z samej celulozy. Komórki fibroblastów wrażliwy głębiej w rusztowanie kompozytowe, zaobserwowano również świeżo utworzone naczynia krwionośne. Badania *in vitro* dowiodły, że skrobia znajdująca się w kompozytowym rusztowaniu może łagodzić odpowiedź immunologiczną organizmu (Yang i in. 2014).

Zebrane w niniejszej publikacji wyniki badań opisanych w fachowej literaturze pozwalają stwierdzić, że rusztowania, których składnikiem jest skrobia ziemniaczana, mogą w przyszłości zostać wykorzystane jako nowoczesny produkt medycyny spersonalizowanej. Takie rusztowania mogą znaleźć zastosowanie jako sztuczna skóra lub materiał do opatrywania ran. Dodatkowo, łatwo dostępny i tani materiał, jakim jest skrobia ziemniaczana, pozwala na implementację opracowanych rozwiązań laboratoryjnych do produkcji na dużą skalę.

#### Literatura

- Auclair-Daigle C., Bureau M. N., Legoux J. G., Yahia L. 2005.** Bioactive hydroxyapatite coatings on polymer composites for orthopedic implants. – *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 73A; **2. Boccaccini A. R., Maquet V. 2003.** Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. – *Compos. Sci. Technol.* 63: 2417-2429; **3. Cárdenas W., Gómez-Pachon E. Y., Muñoz E., Vera-Graziano R. 2016.** Preparation of potato starch microfibrils obtained by electro wet spinning. – *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 138: 12001; **4. Garg T., Singh O., Arora S., Murthy R. 2012.** Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. – *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 29: 1-63; **5. Idaszek J., Kijeńska E., Łojkowski M., Swieszkowski W. 2016.** How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. – *Appl. Surf. Sci.* 388: 762-774; **6. Kijeńska E., Swieszkowski W. 2017.** 2 General requirements of electrospun materials for tissue engineering: Setups and strategy for successful electrospinning in laboratory and industry [In:] *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications*: 43-56; **7. Kijeńska E., Zhang S., Prabhakaran M. P., Ramakrishna S., Swieszkowski W. 2016.** Nanoengineered biocomposite tricomponent polymer based matrices for bone tissue engineering. – *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 65: 807-815; **8. Lu D. R., Xiao C. M., Xu S. J. 2009.** Starch-based completely biodegradable polymer materials. – *Express Polym. Lett.* 3: 366-375; **9. Mączyński M.** Budowa i właściwości fizykochemiczne skrobi | Skrobia [WWW Document], n.d. URL <http://skrobia.pl/artykuly/budowa-i-wlasciwosci-fizykochemiczne-skrobi/> (accessed 3.13.18); **10. Mow V. C., Hayes W. C. 1991.** Basic orthopaedic biomechanics. Raven Press; **11. Naka-matsu F., Torres O. P., Yuan M. L., Boccaccini A. R. 2006.** Processing and Characterization of Porous Structures from Chitosan and Starch for Tissue Engineering Scaffolds. – *Biomacromolecules* 7(12): 3345-3355; **12. Nałęcz, M., Błażewicz S., Stoch L. 2003.** Biomateriały. Akad. Oficyna Wydaw. Exit Warszawa; **13. Orłowska M. 2003.** Budowa i właściwości skrobi w świetle najnowszych badań. Cz. 2. Wewnętrzna organizacja granulek skrobi. – *Przegl. Piek. i Cukier.* 56; **14. Reilly G. C., Engler A. J. 2010.** Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. – *J. Biomech.* 43: 55-62; **15. Smith B. D., Grande D. A. 2015.** The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. – *Nat. Rev. Rheumatol.* 11: 213-222; **16. Torres F. G., Boccaccini A. R., Troncoso O. P. 2007.** Microwave processing of starch-based porous structures for tissue engineering scaffolds. – *J. Appl. Polym. Sci.* 103: 1332-1339; **17. Witecka A., Yamamoto A., Idaszek J., Chlanda A., Świeszkowski W. 2016.** Influence of biodegradable polymer coatings on corrosion, cytocompatibility and cell functionality of Mg-2.0Zn-0.98Mn magnesium alloy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 144; **18. Yang J., Lv X., Chen S., Li Z., Feng C., Wang H., Xu Y. 2014.** In situ fabrication of a microporous bacterial cellulose/potato starch composite scaffold with enhanced cell compatibility. *Cellulose* 21, 1823-1835. Yang, L., Fitié; **19. Zgoda M., Kołodziejczyk M., Nachajski M. 2009.** Skrobia i jej pochodne jako substancje pomocnicze w technologii doustnej i parenteralnej postaci produktu farmaceutycznego. – *Polim. Med.* 39: 31-45