

Nanosvila – bjelančevine nalik na paukovu svilu za zacjeljivanje rana*

Priredila: Đurđica ŠPANIČEK

Nanosilk – spider silk-type proteins for wound healing

Raw materials as well as non-woven material based on spider silk-type proteins were investigated for their suitability as wound dressings. For this purpose degradability investigations due to wound fluid and body enzymes, cytotoxicity measurements and wound healing model tests were performed.

Uvod

Već su civilizacije Hindu (oko 2800. godine pr. n. e) i stare Kine poznavale svilu dobivenu iz čahure gusjenica. No i drugi kukci te neke vrste paukova proizvode bjelančevine svile za gradnju staništa, mreža, čahura ili kao ljepilo. Kao materijal bjelančevine svile imaju zanimljiva svojstva. Paukova svila mehanički je najizdržljivija. Jedan tip svile vrtnog pauka koji je među sedam vrsta niti odgovoran za sigurnost vlakana i osnovnu mrežu, najstabilniji je tip paukovih vlakana. Takvo se vlakno može u odnosu na svoju masu opteretiti nekoliko puta više od čelika istežući se pritom na trostruku duljinu bez prekida. Osim toga paukova vlakna pokazuju i amfilno ponašanje: lagana su i postojana na vodu, a posjeduju i visoku sposobnost upijanja vode koja se može usporediti s onom vune. Kako ona nisu ugrađena kao strukturna bjelančevina u signalne lance, odlikuju se visokom kompatibilnošću i ne izazivaju nikakve imunostne reakcije. Odolijevaju mikrobiološkim napadima i tijelo ih može enzimski razgraditi.

Već su se u davnim vremenima, zbog mješavine zanimljivih svojstava, paukove mreže primjenjivale kao zavoji za rane s niskim potencijalom za upale. Kada je poslije svila donesena u Europu, zavoji od svile potiskivali su dotadašnje zavoje od vune i pamuka zbog svoje ljekovitosti i dobre podnošljivosti.

Ljekovito djelovanje/zbrinjavanje rana

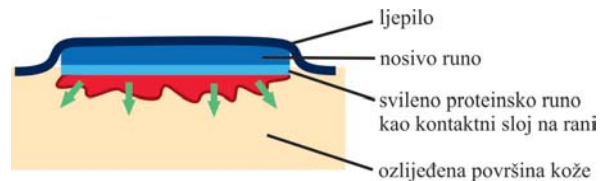
Najvažnija funkcija povoja za rane je zaštita rana od mehaničkih opterećenja i infekcija te upijanje izlučevina iz rane. Pri tome se ne smije zalijepiti za ranu i treba stvoriti optimalnu okolinu za prirodni proces zacjeljivanja. Paukova svila može, uz svoja već opisana svojstva, omogućiti bezbolno mijenjanje zavoja uz povećanje sadržaja arginina. On ima presudnu važnost za gradnju izvanstaničnih matrica i limitirajući je faktor za prirodno zacjeljivanje rana. Pri razgradnji bjelančevina na rani nastaje slobodni dušikov monoksid, koji je poznat kao ključna molekula pri zacjeljivanju rana i osigurava dodatno okruženje za zacjeljivanje.

Opis projekta *Nanosvila*

U sklopu projekta *Nanosvila* ispitivan je potencijal bjelančevina nalik na paukovu mrežu za liječenje kroničnih i teških rana. Trebalo je istražiti biološku podnošljivost povoja za obradu rana na osnovi navedenih bjelančevina kao nanoskalne, elektrospinski dobivene kontaktne podloge koja pospješuje zacjeljivanje rana tijekom biološki usmjerene razgradnje (slika 1).

Konzorcij trogodišnjeg projekta tvore tri industrijska partnera: *BASF SE*, *Freudenberška služba istraživanja SE & Co. KG*, *Lohmann&Rauscher GmbH & Co. KG*. Od paukove svilene bjelančevine, koju proizvodi *BASF*, *Služba istraživanja* iz *Freudenberga* pravi runo koje tvrtka za

medicinske proizvode *Lohmann&Rauscher* pretvara u povoje za rane. Dva sveučilišna partnera, *Katedra za biomaterijale Sveučilište Bayreuth* i *DWT na RWTH Aachen*, stvorili su znanstvenu podlogu koja omogućuje proizvodni *know-how* i mnogobrojne mogućnosti analize.



SLIKA 1 – Sastav obloge za rane s kontaktnom površinom od paukovih bjelančevina koja pospješuje zacjeljivanje

Priprava bjelančevina sličnih paukovoj svili

Proizvodnja paukove svile iz uzgoja paukova obavlja se otežano jer su, za razliku od dudova svilca, pauci skloni kanibalizmu. To je razlog zašto taj materijal, unatoč prednostima, nije do danas našao primjenu. Želi li se pripremiti veća količina paukove svile, potrebna je biotehnička proizvodnja. U bakteriju *domaćina* ugradi se DNK plazmid koji kodira željenu bjelančevinu i potiče bakteriju na proizvodnju bjelančevina (slika 2).



SLIKA 2 – Prirodni proces proizvodnje paukove svile (paučine)

Na taj način dobivenoj tzv. *rekombiniranoj* paukovoj svili može se DNK plazmidom modificirati sastav koji bakterija *domaćin* tolerira i tako postići posebna, željena svojstva.

Bionika – prirodno predenje i njegov surogat

Kako oponašanjem prirodnog procesa predenja pauka dobiti vlakna sličnih mehaničkih svojstava? Predenje pauka kompleksan je proces: svaki tip paukove svile proizvodi se u zasebnoj žlijezdi i sprema kao koncentrirana otopina bez agregacije bjelančevina. Kada je potrebno stvoriti nit svile, otopina se provodi kroz uzak kanal s ionskim izmjenjivačem, pri čemu nastaje manje topiv oblik bjelančevina, zatim dolazi do separacije faza i izvlačenja niti iz paukovih bradavica djelovanjem njegovih stražnjih nogu.

Paukove su bjelančevine zbog svoje strukture slabo topive u vodi. No otapala kao heksafluoroizopropanol ili koncentrirana mravljia kiselina mogu dovesti do kidanja jakih intramolekulnih, hidrofobnih djelovanja i time otpetljati klupko paukovih bjelančevina pa se one mogu dalje prerađivati elektropredenjem. Zbog sigurnosno-zdravstvenih razloga i zaštite okoliša trebalo je proizvesti vlakna iz vodonepropive rekombinirane bjelančevine nalik na paukovu svilu iz vodene otopine. U tu svrhu pripravljena vodotopiva otopina treba biti stabilna do trenutka predenja.

* Heinrich, U., Komp, A.: *Nanosilk-Spinnenseidenähnliche Proteine für die Wundheilung*, GAK, (2013)2, 245-247.

S pomoću kaotropnih soli moguće je otopiti bjelančevine u vodi, ali se tada prije preradbe bjelančevina soli odstranjuju ionskim izmjenjivačima jer inače ometaju stvaranje vlakana pri pređenju. Kako nakon uklanjanja kaotropnih otapala ne bi došlo do aglomeriranja bjelančevina, potreban je neki drugi stabilizirajući dodatak. U sklopu projekta *Nanosvila* uspjeli su u Freudenbergu dobiti stabilnu vodenu otopinu bjelančevina nalik na paukovu svilu sposobnu za pređenje. Vlakna nalik na paukovu svilu pripravljena su postupkom elektrosprednja (e. *electrospinning*), pri čemu se vlakna izvlače iz polimerne otopine u jakom električnom polju u smjeru suprotne elektrode i odlažu se u obliku runa (nj. *Vlies*). U Freudenbergu je smješten pogon za elektrospinsko pređenje u kojem su dobivene površine širine do 20 cm. Postupkom elektrosprednja uspjelo se dobiti runo s

promjerom vlakna od nekoliko stotina nanometara koje se direktno istim postupkom nanosi na tekstilnu matricu.

Dobiveni hibridni materijal odmah je ispitan kao moguća obloga za rane. Ispitivana je razgradljivost pod utjecajem djelovanja izlučevina iz rana i djelovanja tjelesnih enzima, citotoksičnost te utjecaj na zacjeljivanje rana. U jednom je slučaju dokazano znatno poboljšanje stanja svinjskog uha u usporedbi s onim bez ljekovitog obloga. Osim toga dokazano je da se materijal ne lijepi za rane te da ga enzimi razgrade nakon jednog tjedna. Potvrđena je i sterilnost i stabilnost tijekom skladištenja te mogućnost konfekcioniranja. Nakon završenog istraživanja rad je u laboratorijskoj fazi, a materijal sličan paukovoj svilu vjerojatno ima budućnost u liječenju rana.

Znanost o materijalima načinjenima od DNK*

Privedila: Đurđica ŠPANIČEK

Science about Materials made of DNK

Entirely new advanced and adaptive materials might be the route to more active detecting, monitoring and treating the diseases as synthetic biology develops. The hybrid/synthetic materials are still at very early stages, but there are already areas in healthcare where such materials can be used. For example, a device that could report a disease state in the body and trigger drug delivery to that site would revolutionize therapy. At the University of Nottingham, UK, scientists are investigating ways to encode dynamic behaviour into artificial system, drawing inspiration from nature's own responsive materials.

U regenerativnoj medicini dolazi do potpuno nove primjene materijala razvojem sintetske biologije, pa se mogu predvidjeti hibridno-sintetske stanice, tkiva i organi. Takvi napredni materijali još su u ranoj fazi razvoja, ali već postoje područja u zdravstvu gdje se mogu primjenjivati dinamički ili odgovarajući osjetljivi materijali. Kao primjer može se navesti uređaj koji javlja o stanju bolesti u tijelu i ima nosač lijekova s otpuncem za bolesno mjesto, koji će znatno unaprijediti terapiju. To je posebice važno u tretmanu kancerogenih bolesti jer će antikancerogeni lijek djelovati samo na izoliranome mjestu gdje je tumor i time bitno povećati uništenje kancerogenih stanica smanjujući sporedne utjecaje.

Izazovi za uvođenje dinamičkog ponašanja materijala koji se rabe u tijelu su znatni. Zapreke nisu samo znanstvene i tehničke prirode, kao što je npr. kontrola djelovanja materijala prema mjernoj skali ovisno o stanju bolesti, koja može varirati od nekoliko nanometara do nekoliko centimetara. Zapreke mogu biti komercijalne i etičke jer materijal treba biti dostupan cijenom i prije svega mora biti siguran. Na Sveučilištu Nottingham, Velika Britanija, znanstvenici su istraživali načine kodiranja dinamičkog ponašanja u umjetnim sustavima nalazeći uzore u prirodnim odzivajućim materijalima. Posebno su u fokusu biomimetski polimeri, jer postoji enorman raspon prirodnih makromolekula koje mijenjaju konformaciju kao odziv na određeni podražaj i koje pokazuju inteligentno ponašanje. Zanimljivi su polimeri koji oponašaju bjelančevinu elatin, ključnu komponentu vezivnog tkiva, koje može podnijeti opterećenja, kao i materijali koji posjeduju povratno istezanje, odnosno stezanje ovisno o temperaturi, odnosno vrijednosti pH. Cilj je uporaba takvog tipa polimera kao zaštitne obloge za molekulu lijeka tako da je prilikom oralnog uzimanja ili davanja injekcijom kombinacija polimer – lijek inertna na djelovanje tijela te se lijek otpušta tek na ciljanome mjestu.

*Is materials science in your DNA? - advanced and adaptive materials for health, Materials World Magazine, www.iom3.org, 2. 4. 2013.

Posebno su oštri zahtjevi na polimerni nosivi sustav u genskoj terapiji, u kojoj se nukleinska kiselina treba prenijeti na ciljano mjesto. Kako je najčešći način unošenja lijeka injekcijom, nosač lijeka treba biti sposoban kondenzirati nukleinsku kiselinu u česticu koja će joj omogućiti slobodno cirkuliranje u krvotoku bez gubitka stabilnosti, a da opet dopusti otvaranje na ciljanome mjestu. Polimeri na osnovi klasičnog metakrilata, ali s bočnim lancima polietilen-glikola različite duljine mogu se tako sintetizirati da imaju potrebnu stabilnost u krvotoku stvaranjem visoko hidratizirane korone na površini lijeka ili gena koji nosi čestica. Lanac se raskida pri temperaturama upravo iznad normalne tjelesne temperature, što omogućava da se dovedu upravo u ciljanu stanicu. Temperaturni odziv može biti u rasponu od 37 do 42 °C, dostupan vanjski fokusiranom ultrasondom, omogućujući lokalnu koncentraciju sustava dopreme lijeka na bolesno mjesto. Taj je postupak još u fazi ispitivanja *in vitro*. No početni rezultati obećavaju te se nastavljaju ispitivanja učinkovitosti i sigurnosti.

Kombiniranjem odgovarajućih materijala moguće je povisiti funkciju i kodirati višestruka ponašanja. Među najuspješnijim primjerima prirodnih sustava za dostavu nukleinske kiseline su virusi, koje se može smatrati kao modularnu kombinaciju komponenata koje izgrađuju DNK i RNK, umotane u zaštitne obloge sa signalima koji pomažu akumulaciji na njihovu cilju i okidača koji otpuštaju omotače i ispuštaju jezgru kada virus dosegne svoj cilj u stanici domaćina. Moguće je invertirati virus u sintetsku komponentu koja pokazuje slično ponašanje, ali koje nije patogeno. Jedan od načina je povezati sintetske peptide u lanac DNK ili RNK, ali tako da se veze raskinu tek u bolesnoj stanici. Oponašanje komponente virilne ovojnice može se postići materijalima na osnovi polietilen-glikola i njih kombinirati s DNK i biorazgradljivim peptidima u virilno-mimetski sustav dostave gena. Također je moguće dodati ciljnu funkcionalnost oblozi nositelja gena, a to znači dostavu nukleinske kiseline u specifičnu stanicu uz bioinspirirane kaskade za otpuštanje, tako da vanjski omot popušta tek nakon ulaska u stanicu, pri čemu sintetski peptid degradira, DNK je ispušten i kodirani gen je na cilju.

Velik broj objavljenih radova pokazuje da se DNK sekvencije mogu koristiti za kodiranje dinamičkoga i aktivnog djelovanja robota, za osjetila i dostavu lijekova. Jedno od područja je razvoj takvih materijala i kombinacija bogatstva informacija u sekvencijama DNK s polimernim odgovorima radi stvaranja dvojno funkcionalnih materijala.

No dok se znanost razvija, treba voditi računa o mnogim faktorima vezanima uz materijale na osnovi DNK. Cijena sintetskih nukleinskih kiselina trenutačno je previsoka da bi se uključili kao glavni blokovi tvorbe komercijalnih farmaceutskih proizvoda, iako poboljšanja u sintezi mogu sniziti cijenu. Osim toga tu je neizbježno pitanje vezano uz regulaciju i vrednovanje personalizirane dijagnostike i terapeutike.