



Wpływ błękitu metylenowego i zieleni metylenowej na skuteczność fotoutleniania kolagenu tkanek wieprzowych

Ewa M. Koźma¹, Andrzej Głowacki¹, Krystyna Olczyk¹, Grzegorz Wisowski¹, Paweł Olczyk¹, Agnieszka Jura-Półtorak¹, Zbigniew Nawrat²

¹Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec

²Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii, Instytut Protez Serca, Zabrze

The influence of methylene blue and methylene green on the effectiveness of photooxidation of porcine collagen

Summary

Photooxidation is a method of tissue fixation in the construction of bioprostheses. This process leads to the tissue protein crosslinking under light and dye. In the present study, the influence of methylene blue and methylene green on the effectiveness of pulmonary valve and aorta collagen modification was evaluated on the basis of photooxidized tissues sensitivity to pepsin digestion. The components of tissue hydrolysates were characterized electrophoretically. The tissues photooxidized in the presence of employing dyes showed increased resistance to enzymatic degradation in comparison to the unfixed ones. However, methylene green was more effective in valve and aorta collagen crosslinking. Hydrolysates of the tissues fixed in the presence of mentioned dye displayed decrease in collagen α chains and their aggregates' content.

Key words:

photooxidation, collagen, pulmonary valve, aorta.

1. Wstęp

Bioprotezy, stosowane w kardiochirurgii, otrzymuje się ze zwierzęcych tkanek układu sercowo-naczyniowego (najczęściej

Adres do korespondencji

Ewa M. Koźma,
Katedra i Zakład Chemii
Klinicznej i Diagnostyki
Laboratoryjnej,
Śląska Akademia
Medyczna,
ul. Jagiellońska 4,
41-200 Sosnowiec;
e-mail:
chem_klin@farmant.slam.
katowice.pl

z aorty, osierdzia lub zastawek), poddanych procesowi utrwalania. Proces ten zwiększa trwałość bioprotezy (1), w wyniku modyfikacji zawartych w niej białek, w tym, białka włóknistego, kolagenu (2).

Kolagen jest zewnątrzkomórkowym białkiem strukturalnym, stanowiącym około jednej trzeciej wszystkich białek ustroju ssaków (3). Białko to wchodzi w skład łącznotkankowego utkania wszystkich narządów, zapewniając im utrzymanie właściwej architektury (4,5).

Charakterystyczną cechą kolagenów wszystkich typów jest obecność co najmniej jednej domeny o strukturze potrójnej helisy (6), składającej się z łańcuchów polipeptydowych, zbudowanych z powtarzającej się sekwencji aminokwasowej Gly-X-Y, gdzie X to najczęściej reszta proliny, zaś Y – hydroksyproliny (7). Kolageny wszystkich typów cechują się ponadto zdolnością do polimeryzacji w różnorodne, supramolekularne struktury, które to w przypadku kolagenów tworzących włókna przybierają postać wielkocząsteczkowych agregatów (8). Te ostatnie, złożone z podstawowej podjednostki – tropokolagenu, stabilizowane są przez międzyłańcuchowe, kowalencyjne wiązania poprzeczne (9).

Najczęściej stosowanym, chemicznym związkiem utrwalającym tkanki, jest aldehyd glutarowy. Utworzone za jego pośrednictwem dodatkowe wiązania poprzeczne wewnątrz agregatów kolagenowych, stabilizują tkankę i zwiększają jej oporność na chemiczną i enzymatyczną degradację (2,10). Tkanki utrwalone aldehydem glutarowym wykazują jednak mniejszą elastyczność niż tkanki natywne, przejawiając przy tym skłonność do wzmożonej kalcyfikacji (11) oraz cytotoksyczność (2,12,13). Niepożądane właściwości bioprotez utrwalonych aldehydem glutarowym stały się przyczyną poszukiwań innych sposobów stabilizacji tkanek.

Alternatywną w stosunku do metod chemicznego utrwalania tkanek zwierzęcych jest technika fotoutleniania (14). Polega ona na modyfikacji białek tkankowych przy zastosowaniu energii świetlnej, w obecności światłoczułego barwnika, jako katalizatora (14,15). Poddane tej procedurze tkanki stają się odporne na degradację enzymami proteolitycznymi, nie wykazują działania cytotoksycznego, hemolitycznego i mutagennego, posiadając przy tym giętkość i łącznotkankowe utkanie zbliżone do tych, jakimi cechują się tkanki natywne (13,14,16). Efektywność fotoutleniania tkanek zależy jednak od wielu czynników, stąd – ciągle trwają prace nad doбором optymalnych warunków prowadzenia tego procesu. Dlatego też, celem tej pracy była ocena skuteczności sieciowania kolagenu wieprzowej zastawki pnia płucnego oraz wieprzowej aorty, stabilizowanych metodą krótkoterminowego, czterogodzinnego fotoutleniania światłem białym, przy zastosowaniu dwóch różnych fotokatalizatorów – błękitu metylenowego i zieleni metylenowej. Oceny tej dokonano poprzez oszacowanie podatności wspomnianych tkanek na trawienie pepsyną.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał biologiczny

Wieprzowe zastawki pnia płucnego oraz aorty zostały pobrane bezpośrednio po uboju zwierząt. Po mechanicznym odtłuszczeniu umieszczono je w schłodzonym, 0,025 M buforze fosforanowym o pH 6,5, zawierającym 0,13 M NaCl (*phosphate buffered saline*, PBS). Wymienione próbki tkankowe podzielono na grupy w sposób opisany w tabeli.

Tabela

Charakterystyka sposobu traktowania tkanek

| Nazwa i liczebność grupy | Procedura fotoutleniania |
|--------------------------|--|
| kontrolna n = 10 | zastawki pnia płucnego oraz aorty nie poddane działaniu barwnika i nie naświetlane |
| odniesienia 1 n = 10 | zastawki pnia płucnego oraz aorty poddane działaniu 0,1% roztworu błękitu metylenowego w 0,025 M buforze fosforanowym o pH 6,5, zawierającym 0,13 M NaCl, bez naświetlania |
| odniesienia 2 n = 10 | zastawki pnia płucnego oraz aorty poddane działaniu 0,1% roztworu zieleni metylenowej w 0,025 M buforze fosforanowym o pH 6,5, zawierającym 0,13 M NaCl, bez naświetlania |
| badana 1 n = 10 | zastawki pnia płucnego oraz aorty poddane fotoutlenianiu w obecności 0,1% roztworu błękitu metylenowego w 0,025 M buforze fosforanowym o pH 6,5, zawierającym 0,13 M NaCl |
| badana 2 n = 10 | zastawki pnia płucnego oraz aorty poddane fotoutlenianiu w obecności 0,1% roztworu zieleni metylenowej w 0,025 M buforze fosforanowym o pH 6,5, zawierającym 0,13 M NaCl |

Wszystkie próbki tkankowe traktowane barwnikami były uprzednio inkubowane przez 1 godz., w 50% roztworze sacharozy, w temp. 37°C, w celu zwiększenia tkankowej penetracji fotokatalizatorów. Fotoutlenianie zastawek i aort prowadzono światłem białym, o natężeniu 8000 luksów, w roztworze PBS, zawierającym barwnik, w ciągu 4 godz., w temp. 7°C, przy ciągłym napowietrzaniu próbek (17). Po zakończeniu tego procesu, próbki tkankowe przechowywano w 50% etanolu, w temp. 4°C. Przed rozpoczęciem badań biochemicznych, próbki tkankowe zhomogenizowano w acetonie, (homogenizator nożowy, temp. 15°C), po czym, po odtłuszczeniu acetonem (2 godz., temp. 20°C), wysuszono do stałej masy, w temp. 37°C, i zważono.

2.2. Badanie podatności kolagenu wieprzowych zastawek pnia płucnego i wieprzowych aort na enzymatyczną degradację

Do badania podatności zastawek i aort wieprzowych na enzymatyczną degradację zastosowano pepsynę. Enzym ten hydrolizuje niekolagenowe białka tkankowe

i nie zmodyfikowane, pozahelikalne fragmenty kolagenu. Regiony pozahelikalne cząsteczek kolagenowych, zmodyfikowane obecnością wiązań poprzecznych oraz domeny trihelikalne są odporne na proteolizę (18).

2.2.1. Trawienie próbek zastawek i aort pepsyną

Do badań pobrano po 10 mg każdej ze zhomogenizowanych i odfuszczonych próbek zastawek i aort. W celu usunięcia frakcji kolagenu rozpuszczalnego oraz pozostałości błękitu metylenowego lub zieleni metylenowej, mogących wpłynąć na aktywność pepsyny, wszystkie próbki płukano trzykrotnie w 0,5 M roztworze CH_3COOH . Trawienie tkanek pepsyną przeprowadzono, stosując metodę Muraty i wsp. (18). Skrawki badanych tkanek zawieszono – w proporcji 1:10 – w 0,5 M roztworze CH_3COOH , zawierającym pepsynę w stężeniu 4 mg/ml i inkubowano przy stałym wstrząsaniu, w temp. 4°C , przez 24 godz. Powstałą zawiesinę odwirowano ($15\ 000 \times g$, 4°C , 20 min), supernatant zamrożono, zaś osad tkankowy poddano jeszcze dwukrotnie opisanej procedurze. Supernatanty, uzyskane z każdej próbki tkankowej, połączono i wytrącono z nich białka, przez dodanie trzykrotnej objętości 96% etanolu (4°C , 12 godz.). Osad białkowy, zawierający komponenty kolagenowe, odwirowano przy $15\ 000 \times g$, w 4°C przez 20 min, zaś supernatant odrzucono.

2.2.2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym komponentów hydrolizatów tkankowych

Zastosowano metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, w obecności 0,1% siarczanu dodecylsodowego, bez stosowania czynników redukujących wiązania dwusiarczkowe, według metody Laemmli (19) w celu jakościowej charakterystyki komponentów kolagenowych, uwolnionych działaniem pepsyny z próbek wieprzowych zastawek pnia płucnego oraz aort. Elektroforezę prowadzono w aparacie firmy „Kucharczyk; Techniki elektroforetyczne”, przy napięciu i natężeniu prądu 30 V, 20 mA – w trakcie migracji komponentów tkankowych hydrolizatów w 4% żelu zagęszczającym oraz – przy napięciu i natężeniu prądu 50 V, 30 mA – w trakcie ich wędrówki w 8% żelu preparatywnym. Równocześnie poddano elektroforezie następujące kolageny wzorcowe, otrzymane z firmy Sigma (USA): kolagen typu I ze skóry cielęcej oraz kolagen typu V z ludzkiego łożyska. Żele barwiono przez 12 godz. w 0,125% roztworze błękitu brylantynowego R250, zawierającym 50% CH_3OH i 10% CH_3COOH . Odbarwianie żeli prowadzono w roztworze o podanym składzie, nie zawierającym barwnika. Żele przechowywano w roztworze, zawierającym 5% CH_3OH i 7% CH_3COOH . W celu ilościowego oszacowania komponentów, widocznych na wybarwionych żelach, poddano je analizie densytometrycznej, stosując aparat firmy Hoefer Scientific.

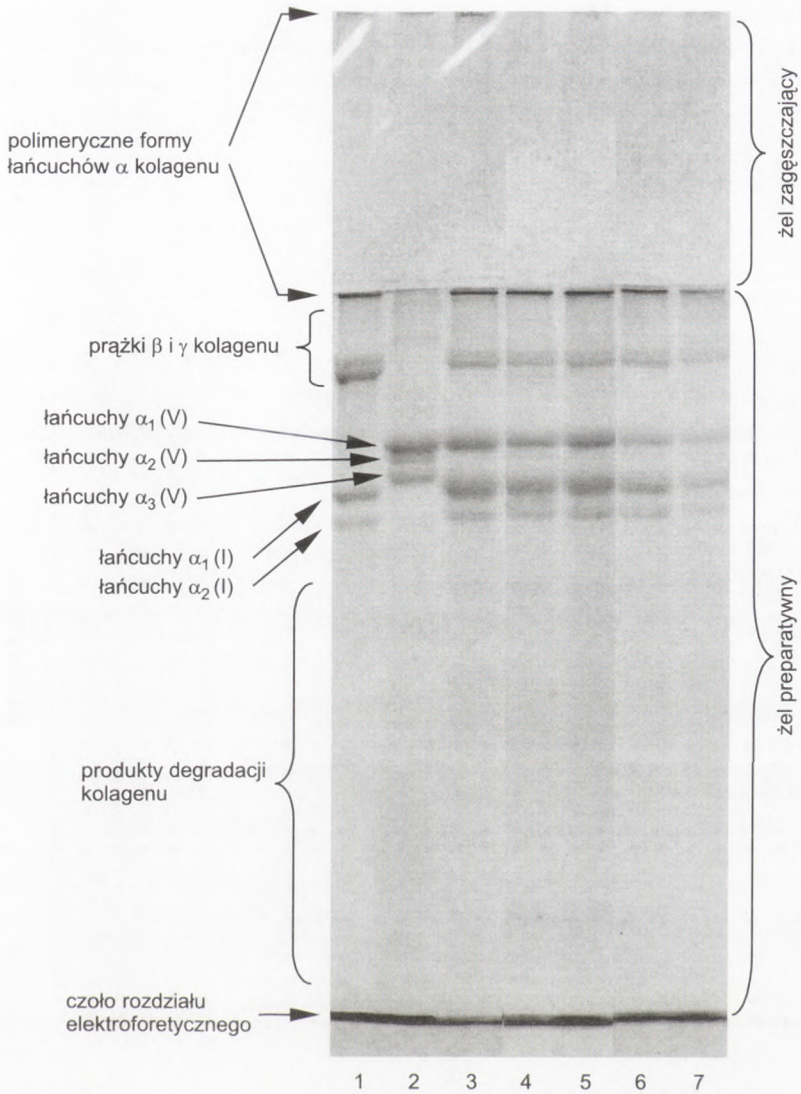
3. Analiza statystyczna wyników

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, obejmującej: eliminację wyników wątpliwych, na podstawie testu Q-Dicksona, wyznaczenie wartości średnich arytmetycznych, wyznaczenie odchylenia standardowego (SD) oraz ocenę zmienności różnic pomiędzy średnimi arytmetycznymi poszczególnych grup tkanek, na podstawie testu *t*-Studenta. Za znamienne statystycznie przyjęto poziom istotności $\alpha < 0,05$.

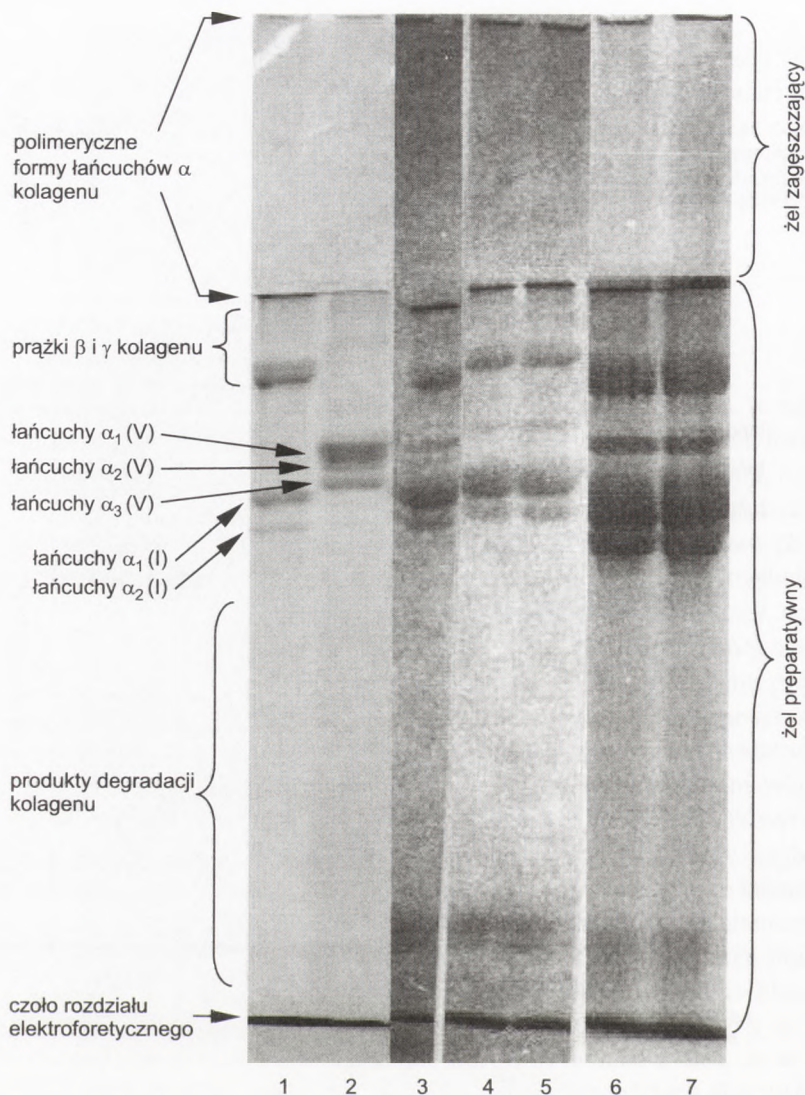
4. Omówienie wyników i dyskusja

Mechanizm fotoutleniania tkanek zwierzęcych energią świetlną, w obecności barwników jako katalizatorów, obejmuje powstawanie reaktywnych form tlenu (17,20-22). Oddziałują one, w naświetlanej tkance, z resztami tryptofanu, histydyny, tyrozyny, cysteiny i metioniny cząsteczek białek, w tym kolagenu, prowadząc do wytworzenia wiązań poprzecznych, siecujących łańcuchy polipeptydowe (20,22-25). Wspomniane modyfikacje dotyczą zarówno N- i C-końcowych, jak i trójhelikalnych regionów kolagenu (17,21,22,24,26,27). Zasięg modyfikacji cząsteczek kolagenowych w procesie fotoutleniania zależy od efektywności wspomnianego sposobu utrwalania. W prezentowanej pracy, oceny efektywności fotoutleniania próbek zastawki pnia płucnego oraz aorty dokonano poprzez określenie podatności, zawartej we wspomnianych tkankach, kolagenu na działanie pepsyny (18). Podatność tego białka na degradację pepsyną jest bowiem zdeterminowana brakiem wiązań poprzecznych w N- i C-końcowych regionach cząsteczek kolagenowych. W wyniku proteolizy uwalniane są, odporne na enzymatyczną degradację, fragmenty trójhelikalne cząsteczek kolagenowych (28), wędrujące w trakcie elektroforezy jako łańcuchy α .

W celu charakterystyki jakościowej, komponenty, uwolnione działaniem pepsyny z próbek zastawek oraz aort nie traktowanych barwnikami, a także poddanych działaniu barwników, bez naświetlania oraz fotoutlenionych, poddano elektroforezie. Elektroforegramy typowych rozdziałów komponentów, obecnych w tkankowych hydrolizatach przedstawiono na rysunkach 1 i 2. Wynika z nich, że w obrębie wszystkich hydrolizatów dominują dwa składniki, o ruchliwościach elektroforetycznych podobnych do ruchliwości łańcuchów $\alpha_2(I)$ i $\alpha_1(I)$ kolagenu wzorcowego (rys. 1 i 2, ścieżka 1). Prócz wspomnianych składników, we wszystkich hydrolizatach stwierdzono także obecność komponentów migrujących z prędkością charakterystyczną dla łańcuchów α wzorcowego kolagenu typu V (rys. 1 i 2, ścieżka 2). Frakcja łańcuchów α nie powinna zawierać podjednostek α kolagenu typu III, obecnego zarówno w zastawkach jak i aortach (29). Uzyskanie takich podjednostek byłoby bowiem możliwe dopiero po zastosowaniu, w trakcie przygotowania próbek do elektroforezy, czynników redukujących wiązania dwusiarczkowe w kolagenie typu III. Obok frakcji łańcuchów α , we wszystkich tkankowych hydrolizatach obserwowano także obec-



Rys. 1. Typowe rozdziały elektroforetyczne komponentów, obecnych w hydrolizatach, otrzymanych działaniem pepsyny na próbki wieprzowych zastawek pnia płucnego, nie poddanych i poddanych fotoutlenianiu. Ścieżka 1 – wzorcowy kolagen typu I, ścieżka 2 – wzorcowy kolagen typu V, ścieżka 3 – komponenty hydrolizatu zastawki nie naświetlanej i nie poddanej działaniu barwnika, ścieżka 4 – komponenty hydrolizatu zastawki, poddanej działaniu błękitu metylenowego, bez naświetlania, ścieżka 5 – komponenty hydrolizatu zastawki poddanej działaniu zieleni metylenowej, bez naświetlania, ścieżka 6 – komponenty hydrolizatu zastawki fotoutlenianej w obecności błękitu metylenowego, ścieżka 7 – komponenty hydrolizatu zastawki fotoutlenianej w obecności zieleni metylenowej.



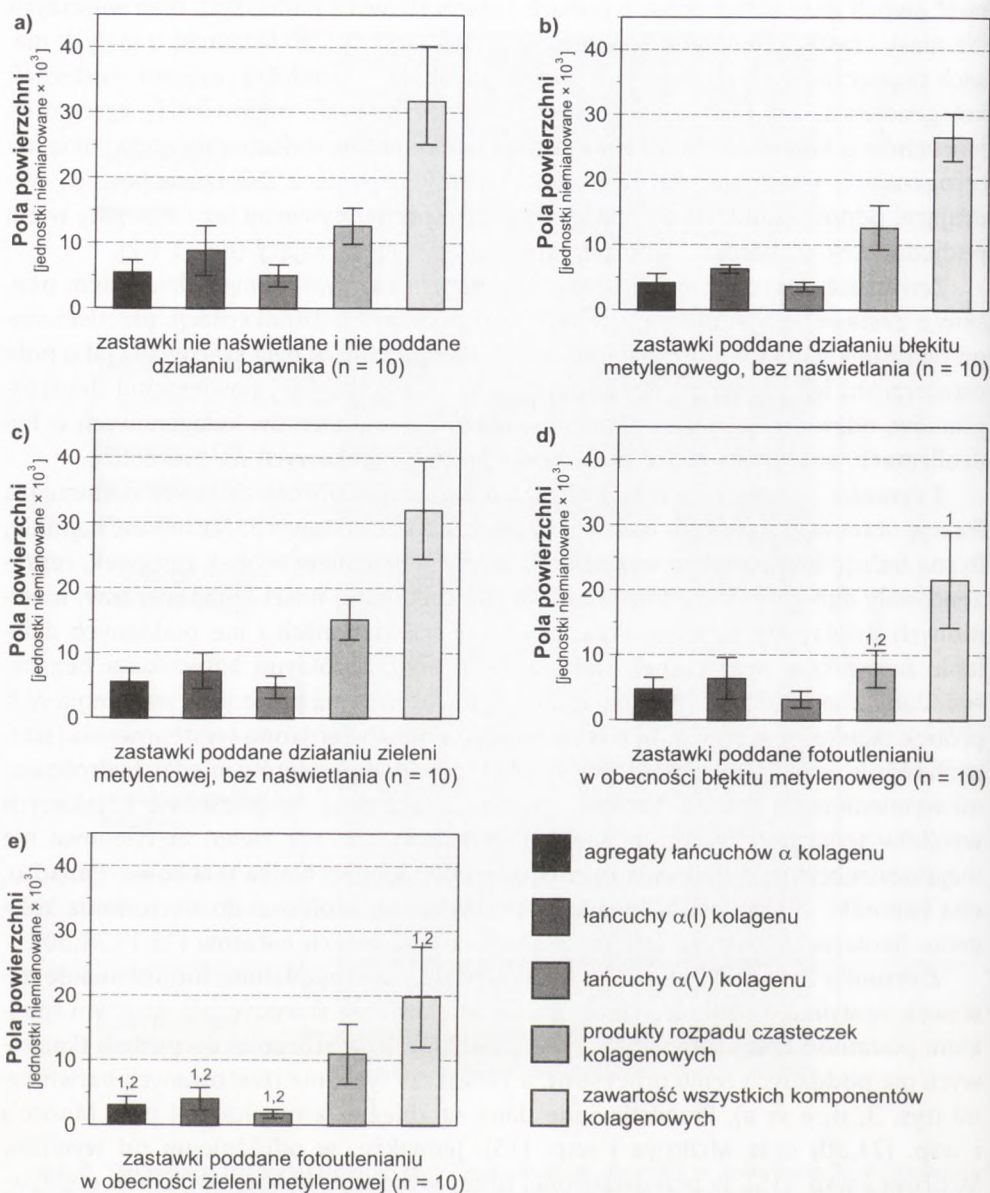
Rys. 2. Typowe rozdziały elektroforetyczne komponentów, obecnych w hydrolizatach, otrzymanych działaniem pepsyny na próbki aort wieprzowych, nie poddanych i poddanych fotoutlenianiu. Ścieżka 1 – wzorcowy kolagen typu I, ścieżka 2 – wzorcowy kolagen typu V, ścieżka 3 – komponenty hydrolizatu aorty nie naświetlanej i nie poddanej działaniu barwnika, ścieżka 4 – komponenty hydrolizatu aorty poddanej działaniu błękitu metylenowego, bez naświetlania, ścieżka 5 – komponenty hydrolizatu aorty poddanej działaniu zieleni metylenowej, bez naświetlania, ścieżka 6 – komponenty hydrolizatu aorty fotoutlenianej w obecności błękitu metylenowego, ścieżka 7 – komponenty hydrolizatu aorty fotoutlenianej w obecności zieleni metylenowej.

ność dwóch grup składników: o masach cząsteczkowych mniejszych oraz większych niż masy cząsteczkowe podjednostek $\alpha(I)$ i $\alpha(V)$ (rys. 1 i 2). Składniki o małych masach cząsteczkowych stanowiły – prawdopodobnie – produkty rozpadu cząsteczek kolagenowych, zaś te o dużych masach cząsteczkowych, odpowiadały agregatom łańcuchów α kolagenu. Ta ostatnia grupa komponentów wykazywała szczególną heterogenność, obejmując zarówno komponenty złożone z 2-3 łańcuchów α , wędrujące, odpowiednio, jako prążki β i γ w żelu preparatywnym, jak i agregaty wielu podjednostek α , bardzo słabo penetrujące żel zagęszczający (rys. 1 i 2).

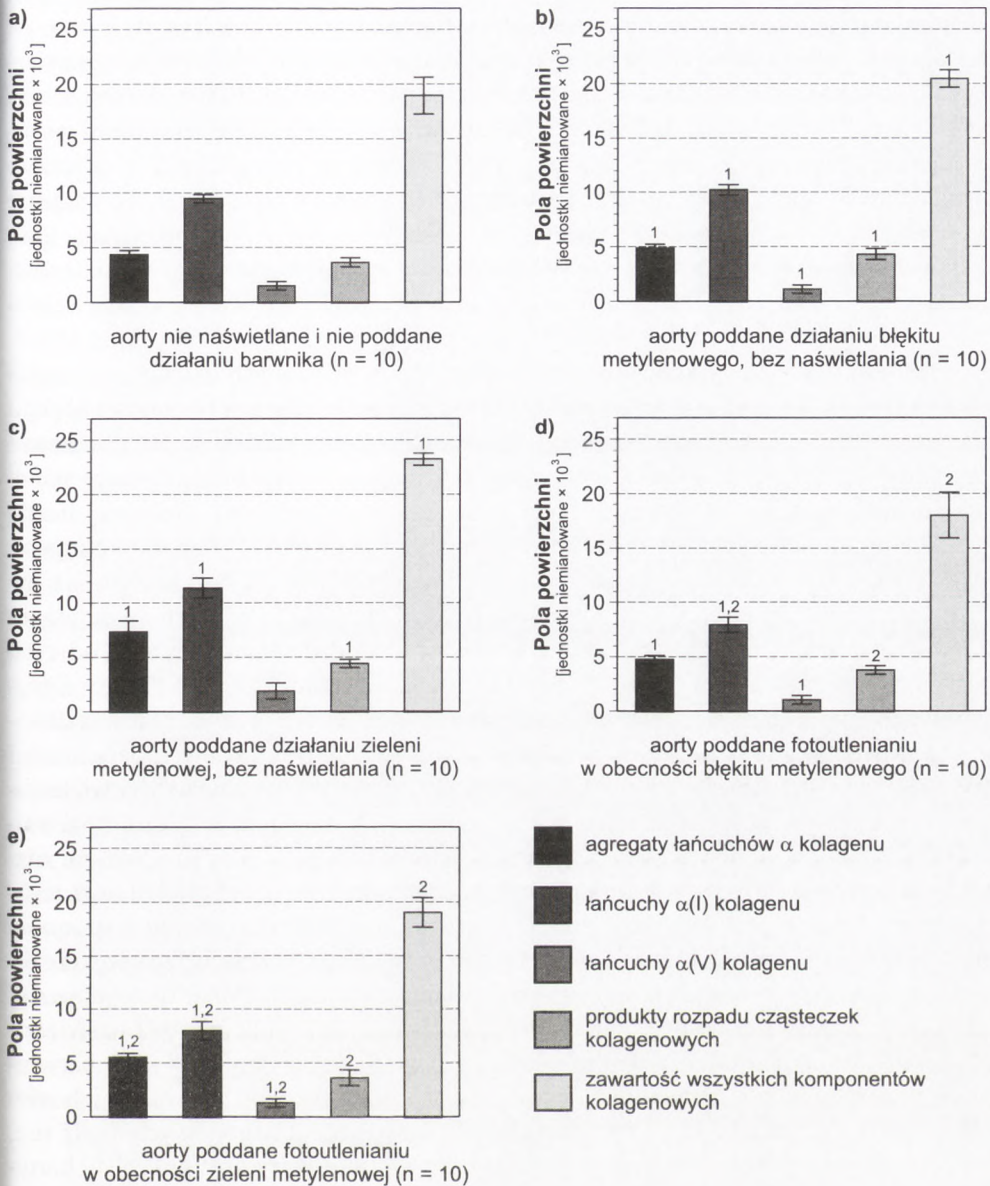
Zawartość poszczególnych typów komponentów, uwolnionych działaniem pepsyny z zastawek i aort nie utrwalonych oraz poddanych fotooksydacji, przedstawiono na rysunkach 3 i 4. Ilość wspomnianych komponentów była szacowana jako pole powierzchni ich pików na densytoqramach. Pole całkowitej powierzchni densytoqramów, odzwierciedlające całkowitą zawartość komponentów kolagenowych w hydrolizatach, stanowiło miarę podatności próbek tkankowych na proteolizę.

Z rysunku 3 wynika, że w hydrolizatach większości próbek zastawek dominującą frakcją stanowiły produkty rozpadu cząsteczek kolagenowych. Natomiast najmniej liczną frakcją hydrolizatów wszystkich, objętych badaniem próbek zastawek, reprezentowały agregaty podjednostek α . Ocena całkowitej ilości komponentów, uwolnionych działaniem pepsyny z zastawek nie naświetlanych i nie poddanych działaniu barwników oraz tkanek traktowanych poszczególnymi barwnikami bez naświetlania nie wykazała istnienia różnic w podatności na proteolizę wspomnianych próbek tkankowych (rys. 3, b, c vs a). Ponadto, nie stwierdzono występowania istotnych różnic w zawartości poszczególnych typów komponentów między hydrolizatami wymienionych próbek tkankowych (rys. 3, b, c vs a). Na podstawie uzyskanych wyników wskazuje się, że ani błękit metylenowy, ani też zielen metylenowa nie mają destrukcyjnego działania przynajmniej na niektóre białka tkankowe. Ponadto, oba barwniki – przy braku światła – nie wykazują zdolności do sieciowania kolagenu. Spostrzeżenia te są zgodne z obserwacjami innych autorów (15,17,21,30).

Z rysunku 3 wynika, że nawet krótkotrwałe, czterogodzinne fotoutlenianie zastawek modyfikuje strukturę kolagenu, co przejawia się statystycznie istotnym spadkiem podatności na proteolizę tkanek utrwalonych, w stosunku do próbek tkankowych nie poddanych temu procesowi, a zwłaszcza tych, nie traktowanych barwnikami (rys. 3, d, e vs a). Przedstawione dane są zbieżne z rezultatami prac Moore'a i wsp. (21,30) oraz McIlroya i wsp. (15). Jednakże, w odróżnieniu od wyników McIlroya i wsp. (15), w przedstawionej pracy wykazano istotne różnice w efektywności modyfikacji kolagenu zastawek, fotoutlenianych w obecności błękitu metylenowego oraz zieleni metylenowej. W przypadku hydrolizatów zastawek, utrwalonych w obecności błękitu metylenowego, w stosunku do hydrolizatów tkanek nie utrwalonych, stwierdzono jedynie znamienne zmniejszenie ilości produktów degradacji kolagenu (rys. 3, d vs a, b). Na podstawie tej obserwacji wskazuje się, że wspomniane komponenty uczestniczyły głównie w tworzeniu wiązań poprzecznych. Tymczasem, proces fotooksydacji zastawek w obecności zieleni metylenowej dotyczył



Rys. 3. Zawartość komponentów kolagenowych w hydrolizatach, otrzymanych działaniem pepsyny na próbki wieprzowych zastawek pnia płucnego, nie poddanych oraz poddanych procesowi fotoutleniania, wyrażona jako pola powierzchni pod pikami tych komponentów na densytogramach. 1 – różnice statystycznie istotne w stosunku do próbek zastawek nie naświetlanych i nie traktowanych barwnikiem ($p < 0,05$), 2 – różnice statystycznie istotne w stosunku do próbek zastawek traktowanych barwnikiem, bez naświetlania ($p < 0,05$).



Rys. 4. Zawartość komponentów kolagenowych w hydrolizatach, otrzymanych działaniem pepsyny na próbki aort wieprzowych, nie poddanych oraz poddanych procesowi fotoutleniania, wyrażona jako pola powierzchni pod pikami tych komponentów na densytogramach. 1 – różnice statystycznie istotne w stosunku do próbek aort nie naświetlanych i nie traktowanych barwnikiem ($p < 0,05$), 2 – różnice statystycznie istotne w stosunku do próbek aort traktowanych barwnikiem, bez naświetlania ($p < 0,05$).

także łańcuchów α , co odzwierciedlało się w istotnym spadku zawartości tych składników i ich agregatów w hydrolizatach tkanek utrwalonych (rys. 3, e vs a, c). Natomiast, brak zmian w ilości produktów rozpadu kolagenu, obecnych w opisywanych hydrolizatach, w stosunku do hydrolizatów tkanek nie utrwalonych (rys. 3, e vs a, c), należy raczej tłumaczyć współwystępowaniem – w trakcie fotoutleniania – dwóch przeciwstawnych sobie zjawisk: tworzenia wiązań poprzecznych z udziałem produktów rozpadu kolagenu oraz uszkodzania (rozpadu) łańcuchów α . To ostatnie zjawisko może być związane z wolnorodnikowym mechanizmem fotooksydacji i/lub pojawianiem się licznych naprężeń kolagenowego utkania zastawek w wyniku równoczesnego tworzenia dużej liczby wiązań poprzecznych. Nasilenie procesu degradacji kolagenu w trakcie fotooksydacji obserwowali także inni autorzy (23,24,31).

Dane, dotyczące charakterystyki komponentów, uwolnionych działaniem pepsyny z próbek aort nie utrwalonych oraz poddanych fotooksydacji w obecności błękitu metylenowego i zieleni metylenowej przedstawiono na rysunku 4. Na podstawie tego rysunku wynika, że szacowane łącznie, łańcuchy $\alpha(I)$ i $\alpha(V)$ były głównym składnikiem hydrolizatów wszystkich objętych badaniem próbek aort. Najmniej liczną grupę komponentów tych hydrolizatów stanowiły zaś produkty rozpadu kolagenu. Hydrolizaty aort cechowały się zatem odmiennym profilem cząsteczkowym niż hydrolizaty zastawek (rys. 3 i 4). Ponadto, stwierdzono także różnice w działaniu barwników na nie naświetlane zastawki i aorty. W odróżnieniu bowiem od tych pierwszych tkanek (rys. 3 b, c vs a), aorty poddane działaniu zarówno błękitu metylenowego jak i zieleni metylenowej, bez naświetlania, wykazywały wzrost wrażliwości na proteolizę w stosunku do próbek tkankowych nie traktowanych barwnikami (rys. 4, b, c vs a). Zjawisko to manifestowało się zwiększeniem zawartości większości komponentów w hydrolizatach tkanek poddanych działaniu wyłącznie barwników (rys. 4, b, c vs a). Jednakże, wzajemne ilościowe relacje między produktami rozpadu kolagenu a pozostałymi komponentami hydrolizatów w przypadku aort traktowanych barwnikami, bez naświetlania, oraz nie poddanych działaniu wspomnianych fotokatalizatorów były zbliżone. Fakt ten potwierdza wcześniejsze spostrzeżenie, że barwniki nie mają destrukcyjnego działania na kolagen. Ponadto, wydaje się, że wzrost podatności na proteolizę aort traktowanych barwnikami, bez naświetlania (rys. 4, b, c), jest tylko pozorny. Może on być spowodowany wpływem barwników, pozostających w niewielkich ilościach w próbkach tkankowych, mimo ich wielokrotnego płukania, bądź na rozpuszczalność cząsteczek kolagenowych, bądź też, co bardziej prawdopodobne, na wyniki oznaczeń densytometrycznych. Wpływ barwników na wielkość pola całkowitej powierzchni densytogramów zaznaczył się zwłaszcza w przypadku stosowania zieleni metylenowej (rys. 4 c), która szczególnie słabo wypłukiwała się z próbek aort. Można także przypuszczać, że różnice w działaniu barwników na nie naświetlane zastawki i aorty spowodowane są najprawdopodobniej odmiennym odpłukiwaniem się fotokatalizatorów z próbek tkankowych, będącym wynikiem różnic w grubości oraz budowie biochemicznej tych struktur. Ponadto, zasadne jest, jak się wydaje, przypuszczenie, że obecność pozostałości barw-

ników w próbkach aort utrwalonych fotoutlenianiem jest także przyczyną obserwowanego braku różnic w podatności na proteolizę tych próbek w stosunku do aort nie traktowanych barwnikami (rys. 4, d, e vs a). Jednocześnie, aorty poddane fotoutlenianiu wykazują znamienny spadek wrażliwości na enzymatyczną degradację w stosunku do próbek tkankowych traktowanych barwnikami, bez naświetlania (rys. 4, d vs b, e vs c). Jednakże, podobnie jak w przypadku utrwalania zastawek, także przy fotoutlenianiu aort występowały różnice w przebiegu wymienionego procesu, w zależności od użytego barwnika. W tworzeniu wiązań poprzecznych, w trakcie fotoutleniania aort w obecności błękitu metylenowego, uczestniczyły głównie łańcuchy $\alpha(I)$ i produkty rozpadu kolagenu, co przejawiało się spadkiem zawartości tych komponentów w hydrolizatach tkanek utrwalanych, w stosunku do hydrolizatów tkanek traktowanych barwnikiem, bez naświetlania (rys. 4, d vs b). Tymczasem, stosowanie w procesie utrwalania aort zieleni metylenowej prowadziło do zmniejszenia ilości wszystkich typów komponentów, obecnych w tkankowych hydrolizatach (rys. 4, e vs c). Wskazuje to na zdolność omawianego barwnika do katalizowania tworzenia wiązań poprzecznych między większą liczbą różnych typów reszt aminokwasowych, co umożliwia sieciowanie zarówno podjednostek $\alpha(I)$ oraz $\alpha(V)$ i przyczynia się prawdopodobnie do szybszego tworzenia wielkocząsteczkowych agregatów.

Inni autorzy (14,15,17,21,25,30) wykazali, że efektywność stosowanego fotokatalizatora w modyfikacji białek tkanek utrwalanych metodą fotoooksydacji, zależy zarówno od fizykochemicznych warunków prowadzenia wspomnianego procesu, jak i budowy biochemicznej materiału biologicznego, podlegającego utrwalaniu. W przedstawianej tu pracy wykazano, że zieleń metylenowa wykazuje większą skuteczność niż błękit metylenowy w utrwalaniu, zwłaszcza wieprzowych zastawek pnia płucnego, ale także wieprzowej aorty. Ponadto, jak się wydaje, stosowanie zieleni metylenowej w procesie utrwalania wspomnianych tkanek zapewni tak przygotowanym bioprotezom nie tylko dłuższą trwałość, lecz także lepsze parametry biomechaniczne, ze względu na wzrost liczby wiązań poprzecznych, wytworzonych między łańcuchami α , w stosunku do liczby wiązań z udziałem produktów rozpadu kolagenu.

Literatura

1. Reardon M. J., O'Brien M. F., (1997), *Curr. Opin. Cardiol.*, 12, 114-122.
2. Khor E., (1997), *Biomaterials*, 18, 95-105.
3. Burgeson R. E., Nimni M. E., (1992), *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 282, 250-272.
4. Barnes M. J., (1988), *Biochemistry. Collagen*, vol. 1, Ed. Nimni E.M., 275-290, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
5. Dostal D. E., (2001), *Hypertension*, 37, 841-844.
6. Gogiel T., Bańkowski E., (2001), *Post. Hig. Med. Dośw.*, 55, 133-156.
7. Persikov A. V., Ramshaw J. A., Brodsky B., (2000), *Biopolymers*, 55, 436-450.
8. Bailey A. J., (2001), *Mech. Ageing Dev.*, 122, 735-755.
9. Prockop D. J., Kivirikko K. I., (1995), *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 403-434.

10. Golomb G., Schoen F. J., Smith M. S., Linden J., Levy R. J., (1987), *Am. J. Pathol.*, 127, 122-130.
11. Thoma R. J., Phillips R. E., (1995), *J. Heart Valve Dis.*, 4, 214-221.
12. Jayakrishnan A., Jameela S. R., (1996), *Biomaterials*, 17, 471-484.
13. Schmidt C. E., Baier J. M., (2000), *Biomaterials*, 21, 2215-2231.
14. Moore M. A., (1997), *J. Heart Valve Dis.*, 6, 521-526.
15. Mcllroy B. K., Robinson M. D., Chen W.-M., Moore M. A., (1997), *J. Heart Valve Dis.*, 6, 416-423.
16. Bengtsson L. A., Philips R., Haegerstrand A. M., (1995), *Ann. Thorac. Surg.*, 60 (Suppl. 2), S365-S368.
17. Mechanic G. L., United States Patent, patent number 5,332,475, Date of Patent Jul. 26, 1994.
18. Murata K., Motoyama T., Kotake C., (1986), *Atherosclerosis*, 60, 251-262.
19. Laemmli U. K., (1970), *Nature*, 227, 680-685.
20. Liu K.-X., Yamamoto F., Sekine S., Goto Y., Seki K., Kondoh K., Fu Y., (1999), *Ann. Thorac. Surg.*, 68, 84-88.
21. Moore M. A., Bohachevsky I. K., Cheung D. T., Boyan B. D., Chen W.-M., Bickers R. R., Mcllroy B. K., (1994), *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 611-618.
22. Spikes J. D., Shen H.-R., Kopeckova P., Kopecek J., (1999), *Photochem. Photobiol.*, 70, 130-137.
23. Miles C. A., Sionkowska A., Hulin S. L., Sims T. J., Avery N. C., Bailey A. J., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 33014-33020.
24. Ohan M. P., Weadock K. S., Dunn M. G., (2002), *J. Biomed. Mater. Res.*, 60, 384-391.
25. Adams A. K., Talman E. A., Campbell L., Mcllroy B. K., Moore M. A., (2001), *J. Biomed. Mater. Res.*, 57, 582-587.
26. Hikichi A., Ueno N., Trempe C. L., Chakrabarti B., (1994), *Biochem. Mol. Biol. Internatl.*, 33, 497-504.
27. Ryu A., Naru E., Arakane K., Masunaga T., Shinmoto K., Nagano T., Hirobe M., Mashiko S., (1997), *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 45, 1243-1247.
28. Zimmermann B. K., Pikkarainen J., Fietzek P. P., Kuhn K., (1970), *Eur. J. Biochem.*, 16, 217-225.
29. Bashey R. I., Jimenez S. A., (1988), *Biochemistry. Collagen*, vol. 1, Ed. Nimni E. M., 275-290, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
30. Moore M. A., Phillips R. E., Mcllroy B. K., Walley V. M., Hendry P. J., (1998), *Ann. Thorac. Surg.*, 66, S245-S248.
31. Monboisse J. C., Braquet P., Randoux A., Borel P., (1983), *Biochem. Pharmacol.*, 32, 53-58.