

Uniwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Chemii



Magdalena Jarosz

***Nanoporowaty tlenek tytanu(IV) jako materiał na implanty
kości***

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Promotorzy:

Prof. dr hab. Marian Jaskuła
Prof. dr hab. Marcin Majka

Kraków, 2015

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu pn. Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Wraz z rozwojem cywilizacji nastąpiło polepszenie i wydłużenie czasu życia ludzi. Równocześnie człowiek jest narażony na coraz więcej urazów, chorób cywilizacyjnych, także tych związanych z podeszłym wiekiem. Dużym problemem, dotyczącym 90% populacji po 40 roku życia, jest osteoporoza, czyli choroba charakteryzująca się postępującym ubytkiem masy kostnej i związanej z tym większej podatności na złamania. W związku z tym znacząco wzrosła konieczność wykonywania operacji wszczepiania implantów kostnych. Naturalną kolejną rzeczą był więc rozwój nowych materiałów implantacyjnych i metod ich produkcji.

Tytan i jego stopy należą do najczęściej stosowanych materiałów do produkcji implantów kostnych. Zawdzięczają to bardzo korzystnym właściwościom, takim jak biokompatybilność, niski moduł Younga, dobra odporność na korozję, a także odpowiednie właściwości mechaniczne. Długoterminowy sukces kliniczny implantów tytanowych zależy jednak od trwałości połączenia implantu z tkanką kostną. Niestety w dalszym ciągu nie udaje się uniknąć trudności związanych z tą integracją, między innymi luzowaniem się endoprotez. W celu polepszenia jakości stosowanych implantów, obecnie pokrywa się je bioaktywnymi powłokami, np. hydroksyapatytowymi, które pozwalają na wydłużenie czasu funkcjonalności takiego materiału. Kolejnym problemem związanym z operacjami wszczepienia implantów są zakażenia bakteryjne. Obecnie zwalczanie infekcji bakteryjnych prowadzi się stosując antybiotykoterapię, jednak z powodu wielu problemów związanych ze sposobem podania leku i jego efektywnym działaniem wciąż poszukuje się nowych metod podania leków pacjentowi. Dobrym rozwiązaniem zdaje się być lokalna terapia antybiotykowa, która powinna zapewnić aplikację leku w miejscu infekcji, a także odpowiednie jego stężenie bez toksyczności dla innych organów. Niestety, zarówno w przypadku niestabilności implantu, jak i długotrwałych zakażeń bakteryjnych, istnieje często konieczność reoperacji, a także wymiany implantu, co z kolei wiąże się z ogromnymi kosztami, ale przede wszystkim dyskomfortem pacjenta związanym z długotrwałą hospitalizacją.

Rzeczywisty rozwój nanotechnologii przyniósł wiele nowych rozwiązań związanych z możliwością pokrycia implantów m.in. warstwami nanoporowatymi. Jednym z takich materiałów jest nanoporowaty tlenek tytanu(IV) wytworzony na powierzchni tytanu, który swoją strukturą imituje porowatą strukturę tkanki kostnej. W ostatnich latach materiałem, który może znaleźć potencjalne zastosowanie w implantologii jest TiO_2 w postaci nanorurek powstałych na drodze elektrochemicznego utleniania folii Ti. Zaletą tych struktur jest łatwość ich otrzymania bezpośrednio na metalu. Proces anodyzacji pozwala także na precyzyjną kontrolę średnicy nanorurek, czy odległości między nimi. Głównym problemem tak

uzyskiwanych warstw nanorurek TiO_2 jest jednak ich niestabilność na powierzchni tytanu i łamliwość, co w kontekście potencjalnego zastosowania jako pokrycia implantu jest wysoce niepożądane. Synteza porowatej warstwy tlenku, dobrze przylegającej do powierzchni metalicznego tytanu, stworzyłaby więc nową ścieżkę rozwoju badań nad nanostrukturalnymi biomateriałami. Ponadto, możliwość wzbogacenia nanoporowatego tlenku tytanu(IV) cząsteczkami leków przeciwzapalnych, bądź antybiotyku, a także osadzenia na powierzchni, np. substancji antybakteryjnych, takich jak nanocząstki srebra znacząco zwiększa potencjał aplikacyjny takiego materiału.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była synteza nanoporowatego tlenku tytanu(IV) metodą anodyzacji, modyfikacja i charakterystyka jego struktury, a także sprawdzenie otrzymanego materiału pod kątem aktywności biologicznej.

W pierwszym etapie uzyskano nanoporowaty tlenek tytanu(IV) (anodic titanium oxide, ATO) o różnych parametrach charakterystycznych struktury. Stosując metodę kontrolowanej elektrolizy w elektrolicie na bazie glikolu etylenowego, zawierającego jony fluorkowe, uzyskano warstwy ATO o średnicach porów od 65 do 130 nm i grubości tlenku w przedziale 1,5 – 2,2 μm odpowiednio dla zastosowanych potencjałów z przedziału 40 – 70 V. Otrzymane warstwy tlenku na substracie tytanowym scharakteryzowano stosując skaningowy mikroskop elektronowy oraz programy do analizy zdjęć SEM. Wykazano, że uporządkowanie najbardziej zbliżone do heksagonalnego wykazują próbki anodyzowane przy potencjale 40 V. Ponadto stwierdzono, że zastosowanie potencjałów 60 i 70 V skutkuje uzyskaniem struktur warstwowych o większej średnicy porów w warstwie zewnętrznej i obecności zdecydowanie mniejszych porów w warstwach wewnętrznych. Badania zwilżalności tlenków wykazały hydrofilowość tych struktur niezależnie od średnicy porów. Wartości kąta zwilżania oscylowały w granicach 60°. Badania korozyjne nie potwierdziły lepszej odporności korozyjnej warstw tlenkowych w porównaniu do czystego tytanu.

Drugi etap polegał na modyfikacji struktury i powierzchni otrzymanych warstw ATO. Wygrzewając nanoporowaty tlenek tytanu(IV) w temperaturach z zakresu 400 – 1000 °C uzyskano struktury krystaliczne różniące się zawartością anatazu i rutylu. Przeprowadzono szczegółowe badania strukturalne stosując metody dyfrakcyjne i spektroskopowe w celu sprawdzenia jakie fazy krystaliczne otrzymano. Wykazano, że w wyniku wygrzewania próbek w temperaturze 400 °C otrzymuje się praktycznie czystą fazę anatazu, natomiast dla temperatur powyżej 800 °C czysty rutyl. Okazało się także, że wygrzewanie warstw ATO w wysokich temperaturach powoduje zniszczenie struktury porowatej spowodowane

znaczącym wzrostem rozmiarów kryształów rutylu. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano mechanizm przejścia anataz-rutyl w nanoporowatych strukturach TiO_2 . Udowodniono również, że w wyniku wygrzewania anodowego tlenku tytanu(IV) usunięte zostają z warstw tlenkowych wbudowane w wyniku procesu anodyzacji jony fluorkowe.

Powierzchnię tlenku tytanu(IV) zmodyfikowano osadzając nanocząstki (NP) srebra. Przetestowano trzy metody osadzania Ag NP, w tym dwie chemiczne i jedną elektrochemiczną. Celem tych badań było uzyskanie równomiernie rozłożonych na powierzchni, a także zaadsorbowanych w porach nanocząstek, które nie powodowałyby zatykania porów tlenku. Spośród wybranych metod tylko metoda redukcji chemicznej z zastosowaniem cytrynianu sodu okazała się spełniać te wymagania.

Sprawdzono także, czy nanoporowaty tlenek tytanu(IV) może zostać wykorzystany jako nośnik do kontrolowanego uwalniania leków. Przeprowadzono uwalnianie dwóch modelowych leków, nierozpuszczalnego w wodzie niesteroidowego leku przeciwzapalnego ibuprofenu, oraz rozpuszczalnego w wodzie antybiotyku z grupy aminoglikozydów, gentamycyny. Wykazano, że oba leki uwalniają się w czasie w dwuetapowym procesie – szybkiej desorpcji z powierzchni, a następnie wolnej i długotrwałej dyfuzji leku z głębi porów. Zaproponowano również nowy model matematyczny opisujący profile uwalniania badanych leków z nanoporowatego tlenku tytanu(IV), który zdecydowanie lepiej opisuje zachodzący proces niż modele dotychczas opisane w literaturze.

Przeprowadzone badania mikrobiologiczne wykazały, że niemodyfikowane warstwy ATO nie wykazują właściwości antybakteryjnych w stosunku do szczepów bakterii *Staphylococcus aureus*. Wzbogacenie warstw nanoporowatego tlenku tytanu(IV) nanocząstkami srebra i gentamycyną zdecydowanie poprawiają właściwości antybakteryjne tych warstw. Próbkę wzbogaconą antybiotykiem wykazują działanie bakteriobójcze w stosunku do szczepów bakterii *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* zarówno po 48, jak i 120 h testów. Nanocząstki srebra osadzone na powierzchniach ATO nie wykazywały aż tak znaczącego działania bakteriobójczego, jednak uniemożliwiały adhezję bakterii do powierzchni tlenku.

W ostatniej części badań potwierdzono brak cytotoksyczności otrzymanych materiałów, a ponadto udowodniono, że komórki osteoblastopodobnej linii MG-63 wykazują lepszą adhezję do powierzchni porowatych niż do czystego tytanu. Zbadano także morfologię zaadherowanych komórek i wykazano, że komórki najbardziej zbliżone morfologicznie do komórek osteoblastycznych uzyskano na amorficznych powierzchniach ATO otrzymanych

w procesie anodyzacji folii tytanowej przy potencjałach 40 i 70 V. Badania zasiedlenia w czasie także potwierdziły, że komórki lepiej proliferują na materiałach porowatych niż na czystym tytanie. Spośród przebadanych materiałów najkorzystniejsze do hodowli komórkowej wydają się być amorficzne nanoporowate warstwy tlenku tytanu(IV) o średnicy porów 65 oraz 130 nm.

Podsumowując, w ramach badań przeprowadzonych w przedstawionej pracy doktorskiej uzyskano szereg nanoporowatych warstw tlenku tytanu(IV) na folii tytanowej różniących się parametrami struktury. Zoptymalizowano proces wygrzewania warstw ATO w celu uzyskania różnych struktur krystalicznych tlenku, a także zaproponowano mechanizm przejścia fazowego anataz-rutyl w uporządkowanych warstwach TiO_2 . Zbadano właściwości antybakteryjne nanocząstek Ag osadzonych na powierzchni i w porach tlenku tytanu(IV). Określono kinetykę uwalniania modelowych leków z warstw ATO oraz zaproponowano nowy model matematyczny opisujący proces uwalniania tych leków. Wykazano długotrwałe działanie bakteriobójcze gentamycyny w stosunku do dwóch szczepów bakterii. Udowodniono, że otrzymane warstwy ATO nie są cytotoksyczne względem linii komórkowej MG-63, a komórki lepiej proliferują i adherują na warstwach porowatych niż na czystym tytanie.