



Nanostrukturalne materiały hybrydowe dla potrzeb regeneracyjnej terapii ortopedycznej

Streszczenie

Lidia Libowicz-Nadobny

Promotorzy:

Prof. dr hab. Maria Nowakowska

Prof. dr hab. med. Tadeusz Niedźwiedzki

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii

Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii

Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów

Kraków 2015



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



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

This PhD thesis was completed thanks to the financial support from the project Interdisciplinary PhD Studies "Molecular sciences for medicine" (co-financed by the European Social Fund within the Human Capital Operational Programme)



Problem regeneracji tkanki kostnej jest poważnym wyzwaniem zarówno dla praktyków, lekarzy ortopedów i traumatologów jak i dla specjalistów prowadzących szeroko zakrojone, interdyscyplinarne badania naukowe dotyczące tego zagadnienia. Urazy i choroby, takie jak np. osteoporoza, choroby zwyrodnieniowe stawów, wrodzona łamliwość kości czy choroba Pageta, upośledzają normalne funkcje kości, prowadzą do ich złamań uniemożliwiając lub utrudniając poruszanie, niejednokrotnie powodując silny ból i kalectwo. 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.

Głównym celem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie funkcjonalnych układów hybrydowych zbudowanych z matrycy polimerowej z rozproszonymi w nich nanocząstkami hydroksyapatytu opłaszczonymi polimerem oraz nano/mikro cząstkami polimerowymi zawierającymi inkorporowane substancje biologicznie aktywne, potencjalnie przydatnych w terapii regeneracyjnej tkanki kostnej. W pierwszym etapie badań podjęto prace zmierzające do opracowania dobrze zdefiniowanych nanocząstek hydroksyapatytu, których właściwości pozwoliłyby na zastosowanie ich jako stabilnego dodatku do rusztowań przeznaczonych do hodowli komórek w regeneracyjnej terapii ortopedycznej. W kolejnym etapie skoncentrowano się na otrzymaniu polimerowych nośników substancji biologicznie aktywnych. Zdecydowano, że funkcję tę pełnić będą mikrosfery otrzymane na bazie alginianu i hydroksypropylocelulozy, lub samoorganizujące się nanocząstki modyfikowanego chitozan i siarczanu chondroityny. W kolejnym kroku skupiono się na syntezie rusztowań komórkowych na bazie naturalnego polisacharydu, jakim jest chitozan, sieciowanego genipiną. W ostatnim etapie otrzymano hybrydowe rusztowania polimerowe zawierające zarówno stabilne cząstki nanohydroksyapatytu jak i nano/mikrosfery z fosfatazą alkaliczną. Takie materiały przebadano pod kątem ich aktywności biologicznej w kierunku mineralizacji. Wszystkie uzyskane materiały były poddane testom pozwalającym określić ich cytotoksyczność.

Cząstki hydroksyapatytu są niestabilne w roztworach wodnych i ulegają agregacji. Podobne zjawisko można zaobserwować po wprowadzeniu takiego materiału do matrycy polimerowych. Z czasem cząstki ulegają separacji fazowej, co jest zjawiskiem wysoce niepożądanym. Podczas projektowania ścieżki syntezy stabilnych nanocząstek założono ich stabilizację przy użyciu głównie pochodnych naturalnych polisacharydów. Obecnie na dużą skalę stosuje się niemodyfikowane polisacharydy, zarówno jako matrycę polimerową tworzącą rusztowanie komórkowe, jak i środowisko syntezy nanocząstek hydroksyapatytu. Rozwiązanie to jest jednak niezadowalające, ponieważ polimery nieobdarzone trwałym ładunkiem nie wykazują interakcji na nieorganicznymi cząstkami w dłuższej skali czasowej. Zdecydowano zatem o zastosowaniu bardziej innowacyjnego układu, którego podstawą jest zastosowanie pochodnych jonowych polisacharydów posiadających trwały ładunek w szerokim przedziale pH. W niniejszej pracy modyfikacje te objęły wprowadzenie ugrupowań jonowych do naturalnych polisacharydów tj. chitozanu, hydroksypropylocelulozy.

Nanostrukturalny hydroksyapatyt otrzymano stosując standardową metodę syntezy polegającą na współstrącaniu jonów wapnia i fosforanu w środowisku zasadowym. W celu zapewnienia stabilności wodnej dyspersji nanocząstek w tym układzie, na etapie tworzenia do układu wprowadzono kationową pochodną chitozanu. Pochodna chitozanu pozwoliła na uzyskanie warstwy opłaszczającej powierzchnię HAp, silnie z nią związanej, dzięki występowaniu wiązań wodorowych i koordynacyjnych pomiędzy grupami aminowymi chitozanu a jonami wapnia nanocząstki. Oddziaływania elektrostatyczne opłaszczonych nanocząstek przeciwdziałają ich agregacji. W ten sposób otrzymano stabilną, jak pokazały pomiary zeta-potencjału, zawiesinę CKHAp o ładunku powierzchniowym dodatnim. W celu otrzymania nanocząstek o ładunku powierzchniowym ujemnym, zastosowano technikę „warstwa po warstwie” (LbL) i zaadsorbowano warstwę anionowej pochodnej chitozanu na powierzchni HAp o ładunku dodatnim. Adsorpcję anionowej pochodnej również potwierdzono pomiarami zeta-potencjału, z których wynika, iż otrzymana zawiesina nanocząstek jest stabilna, a układ wciąż charakteryzuje się nanometrycznymi rozmiarami. Podobne zależności zaobserwowano przy zastosowaniu pochodnych hydroksypropylocelulozy do opłaszczania nanocząstek.

W celu zwiększenia bioaktywności rusztowań polimerowych wprowadzono do ich matrycy mikrosfery zawierające fosfatazę alkaliczną lub insulinę. Fosfataza alkaliczna to białko uczestniczące w procesie mineralizacji kości. Insulina zaś synergicznie z białkiem morfogenetycznym reguluje procesy różnicowania komórek. Kluczowym zatem było

stworzenie dobrze zdefiniowanych nośników tych białek, a następnie sprawdzenie procesu ich uwalniania po umieszczeniu w matrycy chitozanej sieciowanej genipiną. Takie dostarczenie leku w materiale implantacyjnym gwarantuje nie tylko dostarczenie białka w określonym przedziale czasu poprzez dyfuzję z wnętrza nośnika, ale i w późniejszym czasie, w trakcie procesu degradacji całej matrycy. Do syntezy mikrosfer polimerowych wykorzystano technikę emulsyjną.

Rusztowania polimerowe były wytwarzane techniką liofilizacji hydrożeli chitozanych sieciowanych genipiną. Proces ten pozwolił uzyskać sztywny materiał o dużej liczbie otwartych porów, co zapewnia swobodny dopływ substancji odżywczych do komórek hodowanych na takim podłożu. Ponadto materiał hydrożelowy stanowi idealne środowisko do hodowli komórek ze względu na swoje właściwości takie jak: zwilżalność, stopień pęcznienia, antybakteryjność i nietoksyczność. Podstawowy materiał został zmodyfikowany poprzez wprowadzenie do jego składu trzech substancji: pektyny, hydroksypropylocelulozy lub kolagenu. Ponadto na powierzchni rusztowania osadzono polisacharydy odpowiedzialne za procesy różnicowania i proliferacji komórek. Wszystkie przebadane rusztowania są nietoksyczne i z powodzeniem mogą znaleźć zastosowanie biomedyczne.

W ostatnim etapie sprawdzono czy otrzymane materiały hybrydowe, zawierające nanocząstki hydroksyapatytu i nano/mikrosfery z inkorporowanymi białkami, sprzyjają mineralizacji takiego układu. W tym celu materiały inkubowano w sztucznym osoczu (SBF) a proces mineralizacji obserwowano wykorzystując techniki mikroskopowe, głównie SEM. Obserwacje potwierdzają pozytywny wpływ dodatku fosfatazy, na proces mineralizacji badanych układów.

Zrealizowano założone cele pracy, a otrzymane materiały posiadają potencjał biomedyczny.