



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

**Modyfikowane nanoporowate warstwy
anodowego tlenku tytanu(IV) - charakterystyka
i zastosowania biomedyczne**

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Anna Pawlik

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz D. Sulka

Kraków 2019

Obecnie coraz więcej osób boryka się z problemami układu kostnego, takimi jak np. choroba zwyrodnieniowa stawów czy osteoporoza, które mogą prowadzić m.in. do złamań kości. W niektórych, poważniejszych przypadkach pacjent musi poddać się operacji wszczepienia implantu, który ma pomóc w regeneracji, a konsekwencji również poprawić jakość jego życia. Zgodnie z raportem sporządzonym na podstawie danych zgromadzonych w Centralnej Bazie Endoprotezoplastyk (CBE) Narodowego Funduszu Zdrowia w 2017 r., w Polsce przeprowadzono łącznie ponad 85 000 endoprotezoplastyk, z czego 66% stanowiły operacje stawu biodrowego, 32% - kolanowego, a 2% - pozostałych stawów. Jednak wszczepienie implantu wiąże się z ryzykiem zakażenia bakteriami, które mogą adherować i narastać na powierzchni biomateriału. W konsekwencji może to powodować wydłużenie czasu leczenia, konieczność usunięcia implantu, a w skrajnych przypadkach nawet śmierć pacjenta. Dodatkowo okres trwałości implantu wynosi ok. 15 lat, co sprawia, iż w niektórych przypadkach konieczna jest ponowna operacja w celu wymiany wszczepu.

Materiały implantologiczne powinny wykazywać dobre właściwości mechaniczne oraz charakteryzować się biokompatybilnością. Z tego powodu tytan (Ti) i jego stopy są jednymi z najczęściej stosowanych biomateriałów. Jednakże proces integracji między powierzchnią implantu a otaczającą go tkanką kostną jest długotrwały, gdyż zachodzi przez naturalnie występującą warstwę tlenku tytanu(IV) (TiO_2), która tworzy się na powierzchni biomateriału dopiero po pewnym czasie. Słaba osteointegracja, czyli połączenie między implantem a tkankami, może prowadzić do komplikacji pooperacyjnych, np. do odrzutu wszczepu. Dlatego prowadzi się badania nad potencjalnymi pokryciami biomateriałów na bazie tytanu w taki sposób, by odtworzyć porowatą strukturę kości, a więc poprawić interakcję implantu z komórkami. Jednym z proponowanych rozwiązań jest wcześniejsze pokrycie tytanu warstwą tlenku tytanu(IV) (TiO_2) w procesie elektrochemicznego utleniania (anodyzacji). Anodyzacja tytanu pozwala na uzyskanie nanoporowatych warstw TiO_2 . Takie nanostruktury na powierzchni biomateriału nie tylko polepszają interakcję implantu z komórkami, ale również, dzięki obecności porów, mogą być stosowane jako nośniki do lokalnego dostarczenia leków.

Adhezja, różnicowanie i proliferacja komórek są istotnymi procesami decydującymi o osteointegracji implantu, na które wpływa zarówno (nano)topografia biomateriału, jak i chemia jego powierzchni. Dlatego też prowadzone są badania nad modyfikacją anodowych warstw TiO_2 w celu dalszej poprawy oddziaływania między komórkami a powierzchnią biomateriału, jak również zwiększenia kontroli nad procesem uwalniania leków. Dzięki temu

może nastąpić zmniejszenie ryzyka infekcji pooperacyjnych oraz poprawa biokompatybilności implantu i procesu osteointegracji.

Głównym celem niniejszej pracy była modyfikacja powierzchni nanoporowatych warstw TiO_2 wodorotlenkiem sodu i pochodnymi silanu oraz ich charakterystyka, a także zbadanie wpływu funkcjonalizacji na proces uwalniania modelowych leków i interakcję komórek osteoblastopodobnych z takimi podłożami.

Pierwsza część badań obejmowała modyfikację anodowych próbek tlenku tytanu(IV) za pomocą wodorotlenku sodu i 3 pochodnych silanu: (3-aminopropyl)tri(3-oksopropyl)silanu (APTES), (3-glicydyloksypropyl)trimetoksylsilanu (GPTMS) i (3-merkaptopropyl)trimetoksylsilanu (MPTMS) oraz ich charakterystykę różnymi technikami. Funkcjonalizacja warstw TiO_2 o różnej strukturze krystalicznej (amorficznej, anatazu oraz mieszaniny anatazu i rutylu) wskazała, iż jedynie w przypadku amorficznych podłoży doszło do zmiany morfologii powierzchni, co zostało potwierdzone na mikrofotografiach SEM. Wykazano, iż wydłużenie czasu zanurzenia próbek oraz zwiększenie stężenia roztworu wodorotlenku sodu prowadzi do destrukcji nanoporowatej struktury. Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość wygrzewania tlenku tytanu(IV) po modyfikacji NaOH bez zniszczenia nanoporów lub usunięcia sodu. Wykazano, że funkcjonalizacja warstw TiO_2 w roztworze wodorotlenku sodu o stężeniu $0,5 \text{ mol/dm}^3$ przez 15 min, a następnie, opcjonalnie, ich wygrzewanie w temperaturze $400 \text{ }^\circ\text{C}$ było optymalne w kontekście późniejszych badań. Zmodyfikowane w ten sposób próbki zostały następnie sfunkcjonalizowane za pomocą wspomnianych wcześniej 3 pochodnych silanu. Zarejestrowane widma XPS potwierdziły efektywność procesu. Dla każdej modyfikacji na powierzchni pojawił się krzem oraz w przypadku APTES – również azot, a MPTMS – siarka, czyli pierwiastki występujące w grupach funkcyjnych tych cząsteczek. Pomiar kąta zwilżania pokazał, iż zarówno obróbka termiczna, jak i funkcjonalizacja powierzchni za pomocą badanych związków (NaOH oraz APTES, GPTMS i MPTMS) skutkuje zwiększeniem hydrofilowości podłoży. Jest to pożądane w kontekście zastosowania biomateriału w implantologii, gdyż dobra zwilżalność próbek poprawia adhezję komórek. W przeprowadzonych badaniach zastosowano również technikę osadzania elektroforetycznego do uzyskania pokrycia kompozytowego hydroksyapatytu i chitozanu na warstwach TiO_2 o strukturze anatazu. Analiza próbek takimi metodami jak SEM, EDS, XRD, FTIR potwierdziła efektywność procesu prowadzonego w optymalnych warunkach (przyłożone napięcie – 13 V, czas procesu – 9 min, stężenie hydroksyapatytu – $7,5 \text{ g/dm}^3$). Dodatkowo pokazano, iż obecność kompozytu na nanostrukturach anatazu zwiększa

chropowatość powierzchni bez pogorszenia ich hydrofilowości, co mogłoby polepszyć odpowiedź komórkową biomateriału z powodu zwiększenia powierzchni kontaktu między komórką a podłożem.

Drugi etap badań skupiał się na zastosowaniu modyfikowanych i niemodyfikowanych nanoporowatych warstw TiO_2 jako nośników leków: gentamycyny (aminoglikozydowego antybiotyku) i ibuprofenu (niesteroidowego leku przeciwzapalnego). W ramach pracy doktorskiej zbadano możliwość wspólnego uwalniania obu związków terapeutycznych, biorąc pod uwagę sposób impregnacji próbek lekami oraz strukturę krystaliczną i głębokość nanoporów. Stwierdzono, iż procedura GI, polegająca najpierw na wprowadzeniu gentamycyny, a potem ibuprofenu, pozwala na spowolnienie przechodzenia do roztworu antybiotyku tuż po zanurzeniu nośnika w buforze fosforanowym. W efekcie zmniejszyłoby to ryzyko przekroczenia jego poziomu toksyczności w ciele pacjenta. W oparciu o analizę parametrów modelu desorpcji-desorpcji-dyfuzji stwierdzono, że zastosowanie głębszych nanoporów o strukturze anatazu prowadzi również do spadku ilości gentamycyny dostarczonej w trakcie początkowego, gwałtownego wyrzutu substancji, co jest korzystne z aplikacyjnego punktu widzenia. Zbadano również wpływ stosowanych modyfikacji powierzchni na proces uwalniania jednego ze stosowanych leków. Modyfikowane amorficzne warstwy TiO_2 charakteryzowały się spowolnieniem dostarczania ibuprofenu w porównaniu z niemodyfikowanymi próbkami, co ma swoje odzwierciedlenie w wartościach parametrów modelu DDD, a zwłaszcza f_1 i k_1 , które opisywały proces desorpcji cząsteczek z powierzchni. Stwierdzono także, iż wyraźna zmiana w wyglądzie profilu uwalniania była spowodowana modyfikacją wodorotlenkiem sodu, a dalsza funkcjonalizacja powierzchni nie powodowała zauważalnych różnic w kinetyce procesu. Nie dostrzeżono podobnej zależności dla wygrzewanych próbek. Modyfikacja powierzchniowa nie odgrywa roli w procesie uwalniania ibuprofenu. W przypadku gentamycyny nie zaobserwowano wpływu sposobu funkcjonalizacji próbek na uzyskane profile. Analiza parametrów modelu DDD potwierdziła, że prawie cała ilość wprowadzonej gentamycyny została uwolniona podczas początkowego wyrzutu leku, a szybkość desorpcji antybiotyku z powierzchni nośnika była większa niż ibuprofenu, co mogło być związane z lepszą rozpuszczalnością gentamycyny w wodzie.

W ostatniej, trzeciej, części pracy skupiono się na zbadaniu wpływu modyfikacji powierzchni oraz struktury krystalicznej anodowych warstw tlenku tytanu(IV) na bioaktywność i interakcję podłoża z komórkami. W pierwszej kolejności określono możliwość formowania się apatytu na różnych próbkach tlenku tytanu(IV) po ich zanurzeniu w symulowanym płynie

fizjologicznym. Stwierdzono, iż jedynie warstwy TiO_2 o strukturze anatazu oraz mieszaniny anatazu i rutylu stymulują proces krystalizacji apatytu. Zastosowane modyfikacje powierzchniowe amorficznych próbek polepszają ich bioaktywność w stosunku do niemodyfikowanych podłoży, aczkolwiek nie tak dobrze jak obróbka termiczna. W badaniach komórkowych wykorzystano dwie linie komórkowe różniące się fenotypem: SAOS-2 i MG-63. Dla obu linii stwierdzono korzystny wpływ modyfikacji aminową pochodną silanu (APTES), co świadczy o tym, że taki sposób funkcjonalizacji podłoża poprawia jego interakcję z komórkami o fenotypie dojrzałych (SAOS-2) i niedojrzałych (MG-63) osteoblastów. W przypadku linii MG-63 zbadano również zależność między modyfikacją innymi pochodnymi silanu (z glicydylową i tiolową grupą funkcyjną, odpowiednio GPTMS i MPTMS) oraz obróbką termiczną próbek w temperaturze $400\text{ }^\circ\text{C}$ a odpowiedzią komórkową. Stwierdzono także, że funkcjonalizacja zarówno amorficznych, jak i wygrzewanych warstw TiO_2 za pomocą GPTMS zwiększa aktywność metaboliczną komórek w stosunku do niemodyfikowanych nanostruktur tlenku tytanu(IV). Zbadano również morfologię komórek linii SAOS-2 i MG-63 na badanych podłożach. Zauważono, że na wszystkich rodzajach próbek po 2 godzinach komórki były raczej okrągłe, ale po 24-godzinnej inkubacji doszło do ich rozplaszczenia. Po 72 godzinach hodowli komórki proliferowały i pokryły znaczną powierzchnię każdej próbki. Ponadto zaobserwowano, że przy braku płodowej surowicy bydlęcej w medium hodowlanym zachowanie komórek linii SAOS-2 nie zależało od funkcjonalizacji powierzchni. Biorąc pod uwagę wszystkie wyniki badań komórkowych, można stwierdzić, że modyfikacja warstw TiO_2 za pomocą GPTMS lub APTES powoduje poprawę adhezji i proliferacji komórek osteoblastopodobnych linii MG-63 zarówno w przypadku niewygrzewanych, jak i wygrzewanych próbek. Dlatego też można postulować, iż te sposoby modyfikacji są najkorzystniejsze, gdyż poprawiają odpowiedź komórkową, a także, choć podobnie jak modyfikacja inną pochodną silanu oraz samym wodorotlenkiem sodu, spowalniają proces uwalniania ibuprofenu i nie wpływają na kinetykę dostarczenia gentamycyny.

Podsumowując, można stwierdzić, iż zamieszczone w pracy wyniki pokazały, że nanoporowate warstwy TiO_2 modyfikowane wodorotlenkiem sodu i pochodnymi silanu mogą zostać w przyszłości wykorzystane jako potencjalne wielofunkcyjne materiały implantologiczne.