



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Bioaktywny układ haloizyt-fosfataza alkaliczna jako
składnik rusztowań hydrożelowych do leczenia ubytków
kostnych**

Aneta Pietraszek

Promotor
dr hab. Anna Karewicz

Praca wykonana
w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii UJ

Kraków 2020

Opracowanie, nowych funkcjonalnych materiałów, pozwalających na naprawę lub zastąpienie uszkodzonych tkanek stanowi istotę interdyscyplinarnych badań prowadzonych w ramach inżynierii tkankowej. Obok prac skoncentrowanych na poprawie właściwości wcześniej opracowanych rusztowań, prowadzone są również badania nad zastosowaniem w tym celu całkiem nowych materiałów i technik pozwalających na możliwie najlepsze dopasowanie rusztowania do ubytku - zarówno pod względem kształtu, jak i właściwości mechanicznych, morfologicznych i biologicznych. Modyfikacje biomateriałów zmierzają również do zwiększenia szybkości procesu regeneracji uszkodzonej tkanki. Wśród intensywnie badanych materiałów do regeneracji tkanek ważne miejsce zajmują bioaktywne kompozyty hydrożelowe. W porównaniu z innymi standardowo stosowanymi materiałami kościozastępczymi (np. metalami czy ceramiką), hydrożele polimerowe cechują się znacznie lepszą biogodnością, co umożliwia ograniczenie efektów niepożądanych, takich jak stan zapalny, czy odczyny alergiczne. Domieszkowanie hydrożeli polimerowych pochodzenia naturalnego materiałami nieorganicznymi (np. bioszkiełem, nanoglinką) pozwala na uzyskanie rusztowań o zdecydowanie lepszych właściwościach mechanicznych, strukturalnych i biologicznych.

Głównymi celami niniejszej pracy było otrzymanie i scharakteryzowanie bioaktywnej nanoglinki zawierającej enzym, fosfatazę alkaliczną (ALP) oraz zastosowanie tego układu jako elementu nowych, bioaktywnych, porowatych rusztowań hydrożelowych, sprzyjających stopniowej odbudowie tkanki kostnej.

Substancją aktywną wykorzystywaną w niniejszej pracy była fosfataza alkaliczna (ALP). Jest to enzym, który bierze aktywny udział w procesie biomineralizacji, prowadzącym do odnawiania tkanki kostnej, i jest uznawany za istotny marker osteogenezy. Jego rola polega na katalizie procesów defosforylacji prowadzących do uwalniania nieorganicznych fosforanów, które w połączeniu z jonami wapnia tworzą podstawowy budulec kostny – hydroksyapatyt (HA). W celu poprawy stabilności enzymu, ALP immobilizowano w nanorurkach haloizytu (HAL). Budowa HAL pozwala na selektywne umieszczanie związków bioaktywnych, obdarzonych ładunkiem ujemnym wewnątrz nanorurek, na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych. Nanorurki HAL wykazują ponadto dużą trwałość i odporność termiczną, a rozmiary ich wnętrza nie są dużo większe od średnicy białka, stąd też zakłada się, że powinny mu zapewnić bardzo dobrą ochronę i stabilizację.

W części literaturowej pracy przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące HAL, ALP, a także rusztowań hydrożelowych i ich zastosowania w inżynierii tkankowej. Część doświadczalna pracy została podzielona na trzy główne części.

W pierwszej części badań opracowano i w pełni zoptymalizowano nowy układ ALP-HAL, dokonując szczegółowej charakterystyki fizykochemicznej otrzymanego materiału. Efektywna immobilizacja enzymu w nanorurkach HAL została potwierdzona z wykorzystaniem testu aktywności enzymu, metody Bradforda, a także z wykorzystaniem technik spektroskopowych (ATR-FTIR, XPS) i mikroskopowych (SEM, TEM i mikroskopia konfokalna). Metoda Bradforda oraz analiza termogravimetryczna pozwoliły określić zawartość ALP w nanoglince. Wykonano również badania potwierdzające stabilizujący wpływ nanoglinki na enzym, zarówno w szerokim zakresie pH, jak i temperatur. Zaproponowano również możliwe zastosowanie tak utworzonego układu do naprawy ubytków kostnych. Wykazano, że aktywność ALP jest wystarczająco wysoka do promowania procesu biomineralizacji *in vitro*, z wykorzystaniem glicerofosforanu wapnia jako substratu. Na podstawie wyników analiz SEM/EDS i XRD stwierdzono, że uformowany w układzie minerał to hydroksyapatyt z niewielką domieszką wodorotlenku wapnia. Enzym ALP immobilizowany w HAL może zatem stanowić cenny, bioaktywny składnik rusztowań do naprawy kości.

W drugiej części badań, w pierwszej kolejności opracowano i scharakteryzowano nowe hybrydowe rusztowania na bazie chitozanu, wzbogacone o bioaktywny składnik ALP-HAL, tj. rusztowania CH/ALP-HAL. W kolejnym etapie wprowadzono drugi bioaktywny składnik, kolagen, tworząc rusztowania C-CH/ALP-HAL. Oba zastosowane polimery, zarówno chitozan jak i kolagen, wykazują właściwości sprzyjające odbudowie kości. Chitozan należy do grupy glikozaminoglikanów (GAG), które pełnią ważne funkcje w procesie osteogenezy; ma również właściwości antybakteryjne. Kolagen typu I jest głównym organicznym składnikiem kości i pełni kluczową rolę w jej odbudowie. Wykazano, że opracowany w pierwszej części badań aktywny składnik ALP-HAL, obecny w obu typach rusztowań (CH i C-CH), zwiększa ich porowatość, poprawia właściwości mechaniczne i promuje proces biomineralizacji. Ponadto oba typy rusztowań zawierających nanoglinkę mają porowatość i rozmiary porów sprzyjające regeneracji kości, z zaznaczeniem, że rusztowania C-CH wykazują pod tym względem lepsze właściwości. Rusztowania C-CH/ALP-HAL o zawartości ALP-HAL równej 30 % wagowych wykazują porowatość i kąt zwilżania powierzchni odpowiedni dla adhezji i proliferacji komórek, degradują powoli i stopniowo

oraz stymulują proces biomineralizacji. A zatem można stwierdzić, że opracowane w ramach pracy rusztowania C-CH/ALP-HAL stanowią obiecujący materiał dla inżynierii tkankowej kości.

W trzeciej części badań przeprowadzona została wstępna ocena możliwości zastosowania opracowanego materiału do druku 3D. Obecność HAL w matrycach hydrożelowych CH i C-CH w widoczny sposób poprawiła ogólne właściwości mechaniczne materiału i zdecydowanie polepszyła jakość druku 3D.