

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica
w Krakowie

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

Autoreferat rozprawy doktorskiej

mgr Małgorzata Świętek

Wielofunkcyjne nanokompozyty do zastosowań biologicznych

Promotor: prof. dr hab. inż. Marta Błazewicz

Promotor pomocniczy: dr Waldemar Tokarz

Recenzenci:

Prof. dr hab. Elżbieta Frąckowiak

Prof. dr hab. inż. Wojciech Kwiatek

Kraków 2016

Spis treści

1. Wprowadzenie	3
2. Cele i zakres pracy	4
3. Struktura rozprawy doktorskiej.....	6
4. Wyniki badań	7
5. Podsumowanie	10
Bibliografia.....	10

1. Wprowadzenie

Nanomateriały, dzięki swym unikatowym właściwościom, są perspektywicznymi materiałami dla wielu zastosowań w dziedzinie elektroniki, optyki, techniki kosmicznej, medycyny i wielu innych. W dziedzinie medycyny nanotechnologia wyznaczyła nowe kierunki badań w takich obszarach jak m.in. diagnostyka, terapia chorób nowotworowych i cywilizacyjnych.

Pomimo że nanotechnologia otworzyła zupełnie nowe możliwości w zakresie poszukiwania materiałów przeznaczonych do zastępowania tkanek oraz medycyny regeneracyjnej, aktualnym problemem wciąż pozostaje dobór materiału, który spełniałby wszystkie wymagania stawiane przez określone zastosowanie. Świadczyć o tym może chociażby duża liczba publikacji naukowych, których przedmiotem są biomateriały, przy relatywnie małej liczbie materiałów obecnie wdrożonych do praktyki klinicznej.

Rolą biomateriału, wytwarzanego w oparciu o metody i narzędzia nanotechnologii, jest stymulacja procesów regeneracji, jak i czasowe przejmowanie funkcji uszkodzonych komórek/narządów/tkanek oraz stworzenie optymalnych warunków do ich regeneracji. Z tego względu materiały te powinny charakteryzować się zarówno ściśle określonym czasem degradacji, jak i określonymi parametrami mechanicznymi oraz mikrostrukturalnymi. Wielokrotnie wykazano także, że jedną z ważnych cech materiałów przeznaczonych do regeneracji tkanek jest ich podobieństwo do macierzy zewnątrzkomórkowej zastępowanej tkanki.

Tkanka kostna jest jednym z najlepiej opisanych naturalnych nanokompozytów, którego głównymi komponentami są włókna kolagenowe (zbudowane z mniejszych fibryli kolagenowych o średnicy 1,5 nm) oraz nanometryczne kryształy hydroksyapatytu. Połączenie obu tych faz – organicznej i nieorganicznej - zapewnia kości jednocześnie jej elastyczność, twardość, jak i wyjątkową wytrzymałość i zdolność do przenoszenia obciążeń.

Polimery z grupy poliestrów alifatycznych, ze względu m.in. na ich biodegradowalność, biokompatybilność, dostępność oraz łatwość przetwarzania, cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem w kontekście ich zastosowania w inżynierii tkankowej oraz w medycynie regeneracyjnej. Czynnikiem, które jednak w dużej mierze limitują ich możliwości aplikacyjne są przede wszystkim stosunkowo słabe parametry mechaniczne tych materiałów, a także brak właściwości bioaktywnych. Wprowadzenie do matrycy polimerowej fazy nieorganicznej, znajdującej się w dyspersji nanometrycznej, umożliwia otrzymanie materiału nanokompozytowego charakteryzującego się lepszymi parametrami mechanicznymi (m.in.

wyższą wytrzymałością na rozciąganie, wyższym modułem Younga, wytrzymałością na ściskanie), kontrolowanym czasem biodegradacji oraz pożądanymi parametrami powierzchni (tj. chropowatość i nanotopografia, czy odpowiednia wartość składowych swobodnej energii powierzchniowej).

Jak wiadomo jedną z dróg pobudzenia organizmu do pobudzenia procesów regeneracji może być także ich stymulacja poprzez oddziaływanie np. z polem magnetycznym. Liczne badania wykazały, że zarówno statyczne jak i zmienne pole magnetyczne mogą pozytywnie wpływać na szybkość regeneracji tkanki kostnej.

W ramach pracy doktorskiej prowadzono badania nad nanocząstkami hybrydowymi zbudowanymi z nanorurki węglowej i tlenków żelaza o właściwościach magnetycznych, analizowano ich właściwości biologiczne oraz określono potencjał w zakresie terapii medycznej i modyfikacji matryc polimerowych przeznaczonych do konstrukcji podłoży dla inżynierii tkanek.

2. Cele i zakres pracy

Celem pracy były opracowanie wielofunkcyjnego materiału hybrydowego na bazie dwóch nanoczątek różnego typu, który mógłby zostać wykorzystany zarówno, jako efektywny modyfikator matrycy polimerowej w celu wytworzenia nanokompozytów dla potrzeb inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej tkanki kostnej, jak i mógłby znaleźć zastosowanie w nowoczesnych metodach terapii chorób nowotworowych i diagnostyce.

Tezę pracy sformułowano, zatem następująco: ***nanomateriały hybrydowe, otrzymane w wyniku połączenia ze sobą przynajmniej dwóch nanocząstek różnego typu, to materiały o dużym potencjale w wielu zastosowaniach biologicznych i medycznych.***

W tym celu połączono ze sobą dwa nanomateriały: nanocząstki tlenków żelaza (IONs) oraz wielościenne nanorurki węglowe (CNTs). IONs, w kontekście zastosowań w biologii i medycynie, najczęściej wymieniane są, jako znaczniki komórek, czynniki separujące, nośniki leków, środki kontrastujące zarówno w rezonansie magnetycznym, jak i tomografii komputerowej, a także, jako źródło ciepła w leczeniu nowotworów metodą hipertermii magnetycznej. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się także nanokompozyty polimerowe o właściwościach magnetycznych, które (w obecności zewnętrznego pola magnetycznego) mogą m.in. ułatwiać wychwytywanie substancji biologicznie aktywnych i odżywczych skonjugowanych z nanocząstkami magnetycznymi, a także dodatkowo wspierać procesy regeneracyjne tkanki kostnej.

Z kolei CNTs, ze względu na ich dobre parametry mechaniczne, wykorzystywane są zazwyczaj, jako nanododatki wzmacniające matryce polimerowe. Oprócz tego mogą także nadawać materiałom przewodnictwo elektryczne, czy też poprawiać ich parametry cieplne. Z dotychczasowych badań wynika, że nanorurki węglowe oraz materiały z ich dodatkiem, są także dobrymi kandydatami do konstrukcji podłoży wspierających regenerację tkanki kostnej. CNTs potencjalnie mogą także być wykorzystywane m.in. jako nośniki leków, sensory oraz cząstki dla terapii antynowotworowych metodą hipertermii.

Aby uzyskać materiał hybrydowy na bazie obu cząstek, IONs współstrącono w wodnej zawieszynie CNTs. Poprzez zmianę koncentracji CNTs uzyskano dwa materiały różniące się między sobą stosunkiem wagowym nanorurek węglowych do nanocząstek magnetycznych wynoszącym odpowiednio: 1:1 oraz 1:4. Cząstki te następnie charakteryzowano przy użyciu takich metod jak: rentgenowska dyfraktometria proszkowa, spektroskopia Mössbauera, transmisyjna mikroskopia elektronowa, a także wyznaczono ich parametry magnetyczne za pomocą magnetometru z wibrującą próbką. Badania biogodności hybrydowych nanocząstek przeprowadzono w warunkach *in vitro* na makrofagach mysich (RAW 264.7) oraz komórkach linii osteoblastopodobnej (SAOS-2).

Otrzymane materiały analizowano pod kątem ich zastosowania, jako źródło ciepła w metodzie hipertermii magnetycznej, a także z ich dodatkiem wytwarzano materiały nanokompozytowe przeznaczone do regeneracji tkanki kostnej. W tym celu hybrydowe nanocząstki wprowadzano do matrycy polimerowej, jaką był poli(ϵ -kaprolakton) (PCL). Materiały nanokompozytowe przygotowano zarówno w postaci filmów polimerowych (1D) metodą odlewania z roztworu, jak i porowatych podłoży, tzw. skafoldów (*ang.scaffold*) (3D) metodą odlewania z roztworu połączoną z wypłukiwaniem porogenu. Filmy polimerowe charakteryzowano za pomocą takich metod jak: mikroskopia optyczna, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), mikroskopia sił atomowych (AFM), różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) oraz spektroskopia w podczerwieni (FT-IR). Oprócz tego materiały badano także pod kątem ich zwilżalności (i energii powierzchniowej), parametrów mechanicznych (wytrzymałości na rozciąganie), magnetycznych, a także analizowano wpływ rodzaju nanododatku i jego zawartości na proces degradacji materiału w środowisku wodnym, w temperaturze 37°C. Z kolei materiały 3D charakteryzowano przede wszystkim za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz mikrotomografii komputerowej (μ -CT), co pozwoliło nie tylko na analizę mikrostrukturalną otrzymanych materiałów, ale także badania stopnia zaaglomerowania nanododatku w obrębie matrycy polimerowej. Nanokompozytowe

skafoldy poddano również testom mechanicznym (wytrzymałości na ściskanie) oraz wyznaczono ich parametry magnetyczne.

Badania biologiczne materiałów nanokompozytowych obejmowały testy *in vitro* z wykorzystaniem komórek osteoblastopodobnych MG-63 (w przypadku nanokompozytów 1D) oraz badania *in vivo* na królikach nowozelandzkich (wybrane nanokompozyty 3D).

Za wyjątkiem pomiarów właściwości magnetycznych, wszystkie badania materiałowe prowadzone były zarówno na nanokompozytach zawierających hybrydowe nanocząstki, jak i niemodyfikowane nanorurki węglowe, dla których materiałem odniesienia były folia oraz skafold (układ 3D) z czystego PCL-u.

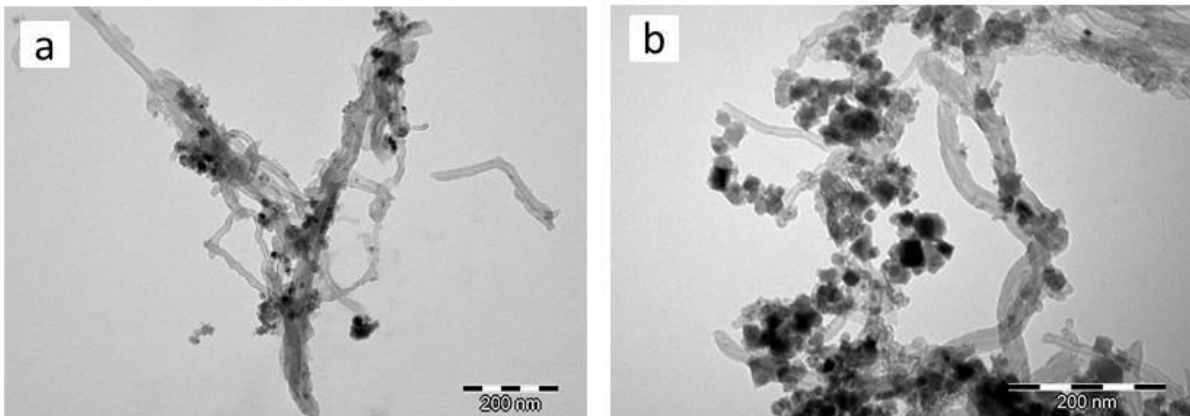
3. Struktura rozprawy doktorskiej

Część teoretyczna niniejszej rozprawy doktorskiej została podzielona na pięć głównych rozdziałów. Rozdział pierwszy stanowi wprowadzenie do zagadnienia nanomateriałów i nanotechnologii, zaś rozdział drugi i trzeci zostały poświęcone takim ich biomedycznym zastosowaniom jak diagnostyka, systemy kontrolowanego dostarczania leków, terapie leczenia nowotworów, medycyna regeneracyjna oraz inżynieria tkankowa. W rozdziale piątym i szóstym opisano szerzej dwa rodzaje nanomateriałów wykorzystywanych w pracy tj. nanocząstki magnetyczne oraz nanorurki węglowe. Uwzględniono przy nie tylko wpływ ich struktury na właściwości, lecz opisano także sposoby ich modyfikacji oraz potencjalne zastosowania w medycynie.

Struktura części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej została zaprojektowana tak, aby wyróżnić trzy jej główne obszary tj. syntezę i charakterystykę hybrydowych nanocząstek otrzymywanych przez łączenie ze sobą IONs i CNTs, wytwarzanie i charakterystykę nanokompozytów w postaci filmów polimerowych (1D) oraz wytwarzania i charakterystykę nanokompozytów w postaci skafoldów (3D). Każda z tych części zakończona jest krótkim podsumowaniem, którego głównym zadaniem było wyróżnienie najważniejszych spośród otrzymanych wyników, mogących rzutować na właściwości lub parametry materiałów nanokompozytowych (w przypadku nanocząstek hybrydowych) lub ich efektywność w zastosowaniach biomedycznych (w przypadku materiałów nanokompozytowych). Zakończeniem części eksperymentalnej niniejszej pracy jest rozdział zawierający wnioski końcowe dotyczące całości przeprowadzonych prac oraz bibliografia.

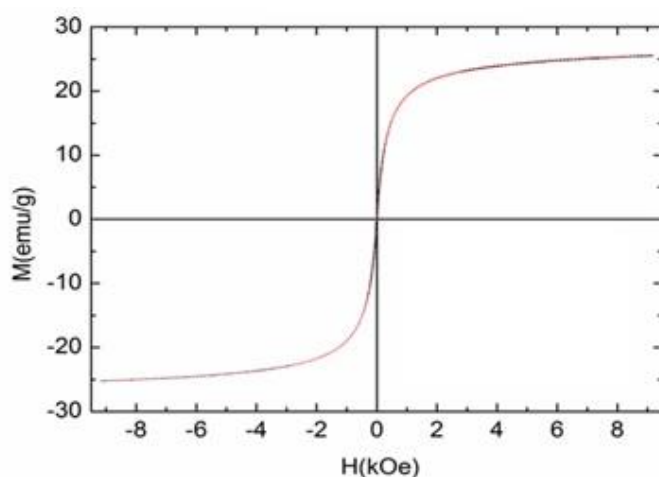
4. Wyniki badań

Wykorzystując metodę współstrącania, która jest jedną z powszechnie stosowanych dróg otrzymywania IONs, wytworzono hybrydowy nanomateriał składający się z dwóch rodzajów nanocząstek tj. IONs oraz CNTs. Wyniki badań wykazały, że morfologia wytworzonych hybrydowych materiałów zależy od stosunku wagowego nanocząstek magnetycznych do nanorurek węglowych, który wpływa zarówno na rozmiar nanocząstek tlenków żelaza, jak i ich rozmieszczenie na nanorurce węglowej (Rys. 1).



Rys. 1 Wielościenne nanorurki węglowe (CNTs) modyfikowane nanocząstkami tlenków żelaza (IONs) o stosunku wagowym CNTs:IONs 1:1 (a) oraz 1:4 (b)

Pomiary dyfraktometrii proszkowej oraz spektroskopii Mössbauera wskazują na mieszany charakter uzyskanych tlenków żelaza w skład, których wchodzi zarówno magnetyt, jak i maghemit. Wynik ten jednocześnie wyjaśnia uzyskaną wartość namagnesowania nasycenia

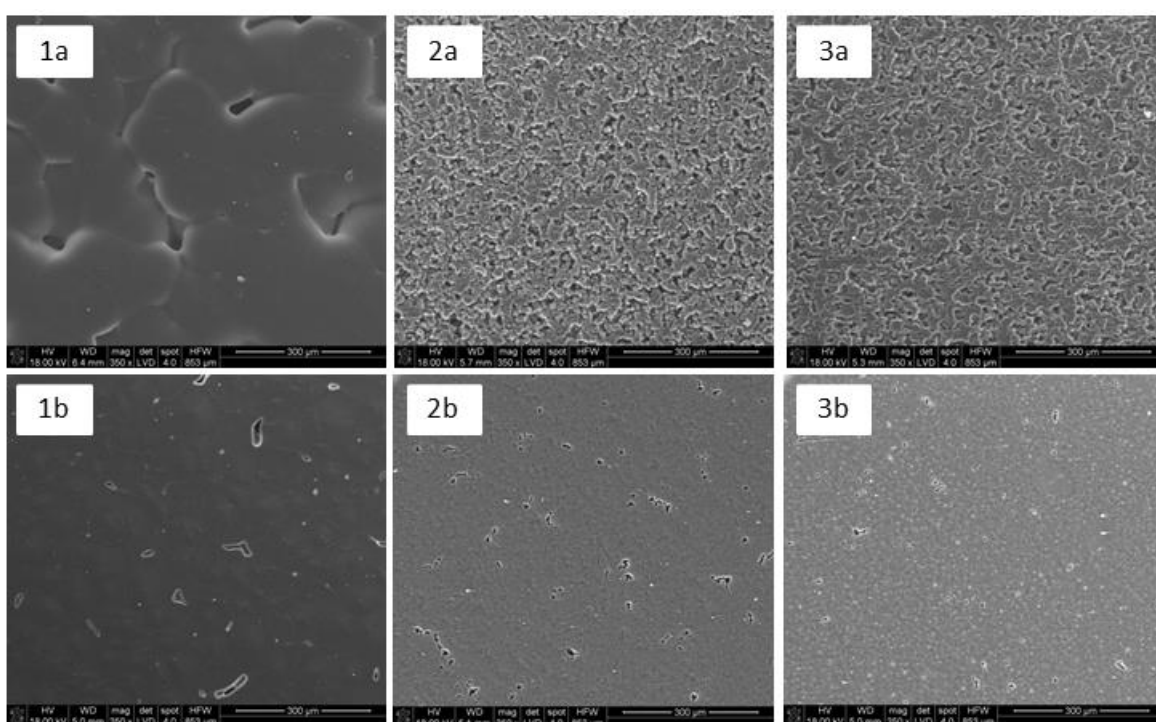


Rys. 2 Krzywa namagnesowania hybrydowej nanocząstki o stosunku CNTs:IONs wynoszącym 1:1

nanomateriałów, która choć wciąż wysoka, była jednak niższa od oczekiwanej. Niemniej jednak, istotną zaletą otrzymanych hybrydowych nanocząstek, jest ich superparamagnetyczny charakter (Rys. 2). Badania in vitro wykazały, że nanocząstki hybrydowe charakteryzują się większą biogodnością w porównaniu do nanocząstek będących ich składnikami. Ponadto wstępne badania w kierunku

możliwości wykorzystania otrzymanych nanocząstek w terapii antynowotworowej metodą hipertermii magnetycznej wykazały, że połączenie nanorurek węglowych z cząstkami magnetycznymi, w ściśle określonym stosunku, może zwiększyć wydajność tej metody leczenia raka.

Badania przeprowadzone na filmach nanokompozytowych wykazały, że wprowadzenie hybrydowej nanocząstki do matrycy polimerowej pozwala na otrzymanie materiału łączącego w sobie cechy obu wykorzystanych nanocząstek. Na proces krystalizacji polimeru, a co za tym idzie na topografię i zwilżalność powierzchni, które są kluczowe dla odpowiedzi biomateriał-komórka, wpływ ma przede wszystkim nanorurka węglowa (Rys. 3).



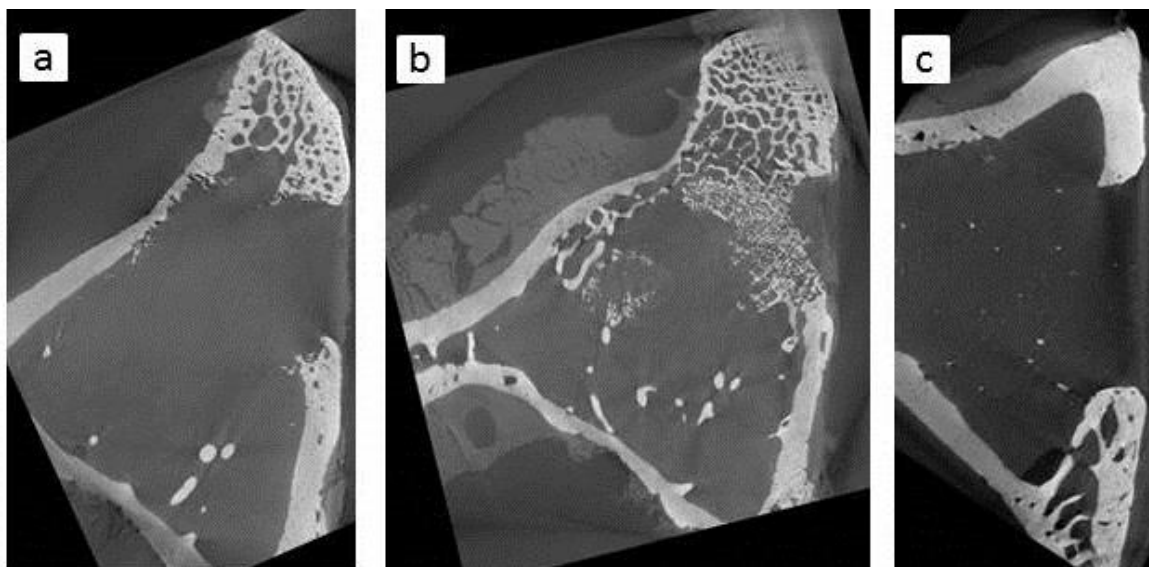
Rys. 3 Mikrofotografie SEM górnej (a) i dolnej strony filmów polimerowych: PCL (1), nanokompozyt PCL/CNTs (1% wag. nanorurek) oraz PCL/CNTs/IONs (1% wag. nanododatku).

Ponadto przyłączenie nanocząstek IONs do powierzchni CNTs w znaczącym stopniu polepsza dyspersję nanocząstek magnetycznych poprzez zapobieganie tworzenia się ich dużych aglomeratów. Jednocześnie otrzymany nanokompozyt zachowuje właściwości superparamagnetyczne hybrydowej nanocząstki. Żaden z wykorzystywanych nanododatków nie spowodował jednak istotnych zmian w parametrach samej matrycy polimerowej, znajdujących odzwierciedlenie m.in. w temperaturach przemian fazowych (DSC), uporządkowaniu bliskiego zasięgu (FT-IR), właściwościach mechanicznych, czy też tempie degradacji materiału.

Badania biologiczne (testy *in vitro*) na komórkach osteoblastopodobnych MG-63 nie wykazały dużych różnic w odpowiedzi komórek na biomateriałów pomiędzy materiałami różnego typu. Badania te prowadzono zarówno w obecności, jak i bez obecności pola magnetycznego.

Badania nanokompozytów (układy 3 D), modyfikowanych samymi nanorurkami, jak i cząstkami hybrydowymi, przeprowadzone przy zastosowaniu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz mikrotomografii komputerowej (μ -CT) pozwoliły potwierdzić ich mikrostrukturalne podobieństwo, mające swe źródło w metodzie wytwarzania. Materiały te charakteryzują się zbliżonym rozkładem wielkości porów, a także połączeń pomiędzy nimi. W wyniku wprowadzenia nanorurki węglowej do matrycy polimerowej (zarówno niemodyfikowanej, jak i w postaci hybrydowej nanocząstki) zaobserwowano zwiększoną sztywność materiału w porównaniu do skafoldu z czystego PCL, co znacząco ułatwiało jego dalszą obróbkę. Mimo to, istotnie statystycznie zwiększenie wytrzymałości na ściskanie zaobserwowano jedynie w przypadku dwóch nanokompozytów zawierających 1% wag. niemodyfikowanych nanorurek węglowych lub cząstek hybrydowych o stosunku IONs:CNTs wynoszącym 1:1.

Istotną różnicą, pomiędzy nanokompozytami zawierającymi niemodyfikowane nanorurki węglowe a nanocząstki hybrydowe, była obecność niewielkich, quasi-sferycznych aglomeratów hybrydowych nanocząstek na powierzchni porów, których ilość i wielkość zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia magnetycznych nanocząstek w materiale.



Rys. 4 Obrazy μ -CT kości z zaimplantowanymi materiałami: skafold z czystego PCL (a), nanokompozyt PCL/CNTs (b) oraz PCL/CNTs/IONs (c)

Badania μ -CT kości po implantacji materiałów (PCL, PCL/CNTs oraz PCL/CNTs/IONs) wykazały, że po trzech miesiącach od implantacji wszczepów, regeneracja tkanki kostnej nastąpiła jedynie w przypadku nanokompozytu zawierającego niemodyfikowane CNTs (Rys. 4).

5. Podsumowanie

Połączenie nanocząstek tlenków żelaza z nanorurkami węglowymi jest niezwykle obiecującą drogą nie tylko na uzyskanie materiałów charakteryzujących się większą biogodnością, lecz także efektywnie łączącego cechy obu materiałów prowadzącego do uzyskania swego rodzaju efektu synergii. Wykorzystanie hybrydowej nanocząstki pozwala na otrzymanie wielofunkcyjnych nanokompozytów polimerowych, które z jednej strony posiadają cechy właściwe nanokompozytom zawierającym niemodyfikowane nanorurki węglowe, a z drugiej charakteryzują się właściwościami magnetycznymi (nanokompozyty o właściwościach superparamagnetycznych) oraz lepszą dyspersją cząstek magnetycznych w obrębie matrycy polimerowej. Materiały te z powodzeniem mogłyby znaleźć zastosowanie nie tylko w inżynierii tkankowej, jako podłoża do hodowli komórek, lecz także w medycynie regeneracyjnej tkanki kostnej, gdzie pole magnetyczne może być dodatkowo wykorzystywane do zwiększenia szybkości odbudowy tkanki kostnej, a także innych dziedzinach niezwiązanych bezpośrednio z biologią i medycyną.

Bibliografia

1. Salata OV., *Applications of nanoparticles in biology and medicine*, Journal of Nanobiotechnology, 2004, **2**:3
2. Engel E., Michiardi A., Navarro M., Lacroix D., *Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side*, Trends in Biotechnology, 2007, **26**, 39-47
3. Amenta V., Aschberger K., *Carbon nanotubes: potential medical applications and safety concerns*, WIREs Nanomed Nanobiotechnology, 2015, **7**, 371-386
4. Wang, Liu Z., *Carbon nanotubes in biology and medicine: An overview*, Chinese Science Bulletin, 2012, **57**, 167-180
5. Gupta A. K., Gupta M., *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials, 2005, **26**, 3995-4021
6. Fuguerola A., Di Corato R., Manna L., Pellegrino T., *From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical application*, Pharmacological Research, 2010, **62**, 126-143