



Politechnika Łódzka

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska

mgr inż. Katarzyna Piekларz

**Hydrożele chitozanowe, wzbogacone
nanostrukturalnymi materiałami węglowymi,
przeznaczone na scaffoldy
do hodowli komórkowych**

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Promotor pracy – dr hab. inż. Piotr Owczarз, prof. uczelni

Opiekun pracy – dr hab. Zofia Modrzejewska

Łódź, 2023

W ostatnim czasie istotnego znaczenia nabierają prace podejmowane w zakresie inżynierii tkankowej zmierzające do wprowadzenia do praktyki klinicznej innowacyjnych, w pełni biogodnych z ludzkim organizmem, rozwiązań pozwalających na regenerację uszkodzonych struktur tkankowych. Jest to podyktowane wciąż wzrastającą liczbą osób, którym uszkodzenia tkanek, pochodzenia pourazowego lub spowodowane procesem chorobowym, utrudniają, a niejednokrotnie uniemożliwiają normalne funkcjonowanie.

Jedną z dynamicznie rozwijających się strategii terapeutycznych inżynierii tkankowej jest zastosowanie termowrażliwych hydrożeli, formujących się *in situ*. Zaletą takich układów jest możliwość wprowadzenia ich prekursorów (zoli) w miejsce docelowej implantacji metodą małoinwazyjną, poprzez iniekcję. Dodatkowym atutem rozwiązań jest ich zdolność do idealnego, szczelnego wypełnienia miejsca uszkodzenia.

Szczególnie interesującą grupę hydrożeli wrażliwych na wzrost temperatury stanowią termowrażliwe układy chitozanowe, co wynika z unikalnych właściwości, zwłaszcza biologicznych, polimeru. Do tej pory hydrożele te wytwarzane były głównie z roztworów chlorku chitozanu z zastosowaniem soli disodowej β -glicerofosforanu, jako substancji sieciującej i/lub regulującej pH.

Naukowcy od kilku lat wykazują także duże zainteresowanie modyfikowanymi układami chitozanowymi, wzbogaconymi nanostrukturalnymi materiałami węglowymi m.in. tlenkiem grafenu. Zarówno doskonałe właściwości poszczególnych składników nanokompozytów, jak i ich efekt synergiczny pozwalają na otrzymanie materiałów o znakomitych właściwościach.

Celem badań własnych prezentowanych w ramach rozprawy doktorskiej było wytworzenie nowych struktur chitozanowych, w postaci termowrażliwych hydrożeli, formujących się w temperaturze zbliżonej do fizjologicznej temperatury ciała ludzkiego, przeznaczonych do potencjalnego zastosowania w inżynierii tkankowej jako scaffoldy do hodowli komórkowych. Układy te sporządzono z roztworów mleczanu oraz chlorku chitozanu z zastosowaniem, jako środka wspierającego sieciowanie, soli nukleotydu pirymidynowego – sól disodowa 5'-monofosforanu urydyny (UMP), która wykazuje działanie neuroprotekcyjne i neuroregeneracyjne. Rozwiązanie to zostało objęte ochroną patentową. Dodatkowo dokonano modyfikacji opracowanych hydrożeli o wprowadzenie do matrycy polimerowej nanonapełniacza w postaci tlenku grafenu.

Wykonano badania porównawcze znanych z literatury przedmiotu hydrożeli zawierających pięciowodną sól disodową β -glicerofosforanu (β -GP) z opracowanymi nowymi układami chitozanowymi z UMP.

W ramach przeprowadzonych prac dokonano charakterystyki fizykochemicznej wytworzonych układów chitozanowych, zaproponowano mechanizmy formowania hydrożeli oraz wykonano biologiczne badania biogodności biomateriałów w warunkach *in vitro*.

W celu dokonania charakterystyki fizykochemicznej hydrożeli, w pierwszej kolejności, określono temperaturę przemiany żol-żel układów koloidalnych w oparciu o pomiary reologiczne i eksperymenty z zastosowaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Hydrożele analizowano stosując także: spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), dyfrakcję promieniowania rentgenowskiego (XRD), skaningową mikroskopię elektronową (SEM) oraz różnicową kalorymetrię skaningową (DSC).

W ramach badań biologicznych oceniono cytotoksyczność (test redukcji resazury) oraz genotoksyczność (alkaliczna wersja testu kometowego) hydrożeli wobec ludzkiej linii komórkowej gruczolakoraka okrężnicy HT-29 oraz prawidłowej ludzkiej linii fibroblastów BJ.

Wykazano, że istnieje możliwość wytworzenia, z niskostężonych koloidalnych roztworów soli chitozanu, termowrażliwych hydrożeli z zastosowaniem soli disodowej 5'-monofosforanu urydyny.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, iż dla układów chitozanowych z β -GP zachodzi przemiana żol-żel, natomiast dla koloidów z UMP – przemiana żel-żol-żel. Mikroobrazy SEM wykazały, iż rodzaj zastosowanego środka wspierającego sieciowanie wywiera znacznie większy wpływ na strukturę układów chitozanowych niż rodzaj użytego rozpuszczalnika. Scaffoldy z UMP cechowały się wysoce porowatą, wzajemnie połączoną strukturą w porównaniu z układami z β -GP. Rodzaj użytego środka wspierającego sieciowanie wpłynął także na kształt termogramów DSC pierwszego grzania oraz liczbę pików o charakterze endotermicznym.

Analiza widm FTIR oraz dyfraktogramów XRD hydrożeli poddanych kondycjonowaniu w wodzie dejonizowanej wykazała, że wraz z wydłużeniem czasu kondycjonowania pojawiają się zmiany w strukturze układów. Kształt widm oraz dyfraktogramów upodobił się do widma oraz dyfraktogramu proszku chitozanowego, co świadczy o uwolnieniu β -GP, jak i UMP ze struktury biomateriałów. Porównując jednak dynamikę obserwowanych zmian, stwierdzono, iż układy z UMP szybciej uwalniały środek wspierający sieciowanie niż hydrożele z β -GP.

Na podstawie dokonanej interpretacji wyników przeprowadzonych badań zaproponowano autorskie mechanizmy formowania termowrażliwych hydrożeli.

Badania biologiczne wykazały, iż opracowane hydrożele z solą disodową 5'-monofosforanu urydyny mogą stanowić, pod względem biogodności, rozwiązanie

konkurencyjne dla klasycznych układów z pięciowodną solą disodową β -glicerofosforanu. Żaden z rozpatrywanych wariantów hydrożeli nie indukował bowiem działania cytotoksycznego wobec komórek obu linii, a układ sporządzony z roztworu mleczanu chitozanu z UMP wykazywał nawet efekt profibroblastyczny.

Z kolei wprowadzenie do matrycy polimerowej nanonapełniacza w postaci tlenku grafenu spowodowało obniżenie temperatury przemiany żol-żel koloidów chitozanowych, wpływając przy tym na poprawę właściwości mechanicznych układów. Struktura scaffoldów z β -GP z dodatkiem tlenku grafenu cechowała się większą porowatością niż hydrożeli bez nanonapełniacza, a dla układów modyfikowanych z UMP nie odnotowano znaczących zmian.

Zastosowanie niskich stężeń tlenku grafenu, w przypadku układów sporządzonych z roztworów mleczanu chitozanu z β -GP oraz UMP, promowało przeżywalność komórek linii BJ na poziomie powyżej 100%, nie indukując przy tym działania genotoksycznego.

Podsumowując można stwierdzić, iż obrany kierunek badań jest obiecujący, a opracowane hydrożele chitozanowe stanowią atrakcyjny materiał rokujący szanse zastosowania jako scaffoldy w inżynierii tkankowej.