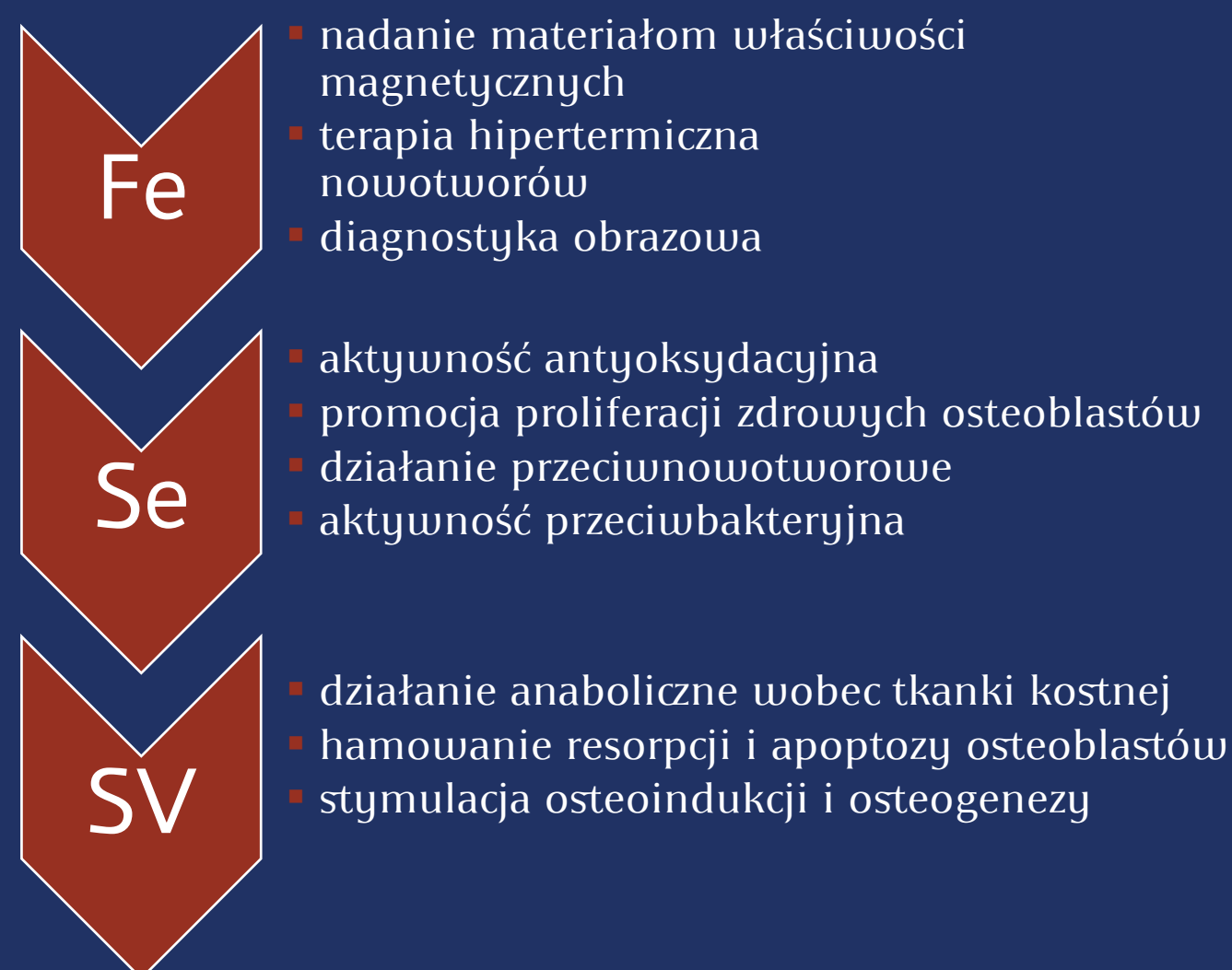


WSTĘP

Badania w obszarze dynamicznie rozwijającej się inżynierii biomateriałowej skupiają się na pozyskiwaniu materiałów implantacyjnych, które swoim składem chemicznym i fazowym oraz mikrostrukturą, a także wynikającymi z nich właściwościami, w możliwie jak największym stopniu będą przypominać tkanki, które mają zastępować. Hydroksyapatyt (HA) opisany wzorem ogólnym $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ zajmuje szczególne miejsce wśród ceramicznych tworzyw implantacyjnych, przede wszystkim z uwagi na swoją bioaktywność i wyjątkową biogodność. Wynikają one z chemicznego i mineralogicznego podobieństwa HA do tzw. apatytu biologicznego, będącego głównym składnikiem fazy nieorganicznej tkanek zmineralizowanych. Co równie istotne, podatność do ulegania różnego rodzaju substytucjom jonowym umożliwia łatwe modyfikowanie fizykochemicznych oraz biologicznych właściwości tego materiału, a kompozyty z jego udziałem mogą pełnić rolę nośników, pozwalających na aplikację substancji leczniczych bezpośrednio do miejsca ich działania. Możliwe jest zatem opracowanie wielofunkcyjnych materiałów mogących kompleksowo wspierać terapię schorzeń kości i ich regenerację po zabiegu implantacji.

CELE PRACY

- Otrzymanie proszków hydroksyapatytowych domieszkowanych jonami żelaza (III) oraz selenianowymi (IV) w różnych stosunkach molowych, przy zastosowaniu dwóch odmiennych metod syntezy;
- Analiza właściwości fizykochemicznych uzyskanych materiałów;
- Otrzymanie z wykorzystaniem wybranych proszków kompozytów hydroksyapatytowo-alginiowych w formie granul z jednoczesną inkorporacją simwastatyny do ich struktury;
- Zbadanie kinetyki uwalniania simwastatyny i jonów oraz wstępna ocena granul pod kątem możliwości zastosowania ich w roli nośników do dokostnej aplikacji substancji leczniczych.



MATERIAŁY I METODY

Syntezę wyjściowych proszków hydroksyapatytowych prowadzono dwiema różnymi metodami – moką metodą koprecypitacyjną w temp. pokojowej oraz jej wariantem z zastosowaniem ogrzewania i dodatkiem EDTA oraz surfaktantu (CTAB) (schemat na Rys. 1). Następnie otrzymane w ten sposób materiały poddano analizom metodami FT-IR, ICP-OES, PXRD, SEM oraz TEM.

W dalszej kolejności opracowano kompozyty w formie granul przy zastosowaniu reakcji poprzecznego sieciowania alginianu sodu pod wpływem roztworu azotan(V) cynku. Wykorzystane w tym celu zostały dwa wybrane, dwupodstawione proszki, otrzymane różnymi metodami. Uzyskane granulę inkubowano następnie w buforze fosforanowym o pH=7.4 w temp. 37°C. Zawartość simwastatyny w pobranych próbkach medium oznaczono za pomocą HPLC, a ilość uwolnionych z granul jonów – z wykorzystaniem techniki ICP-OES.

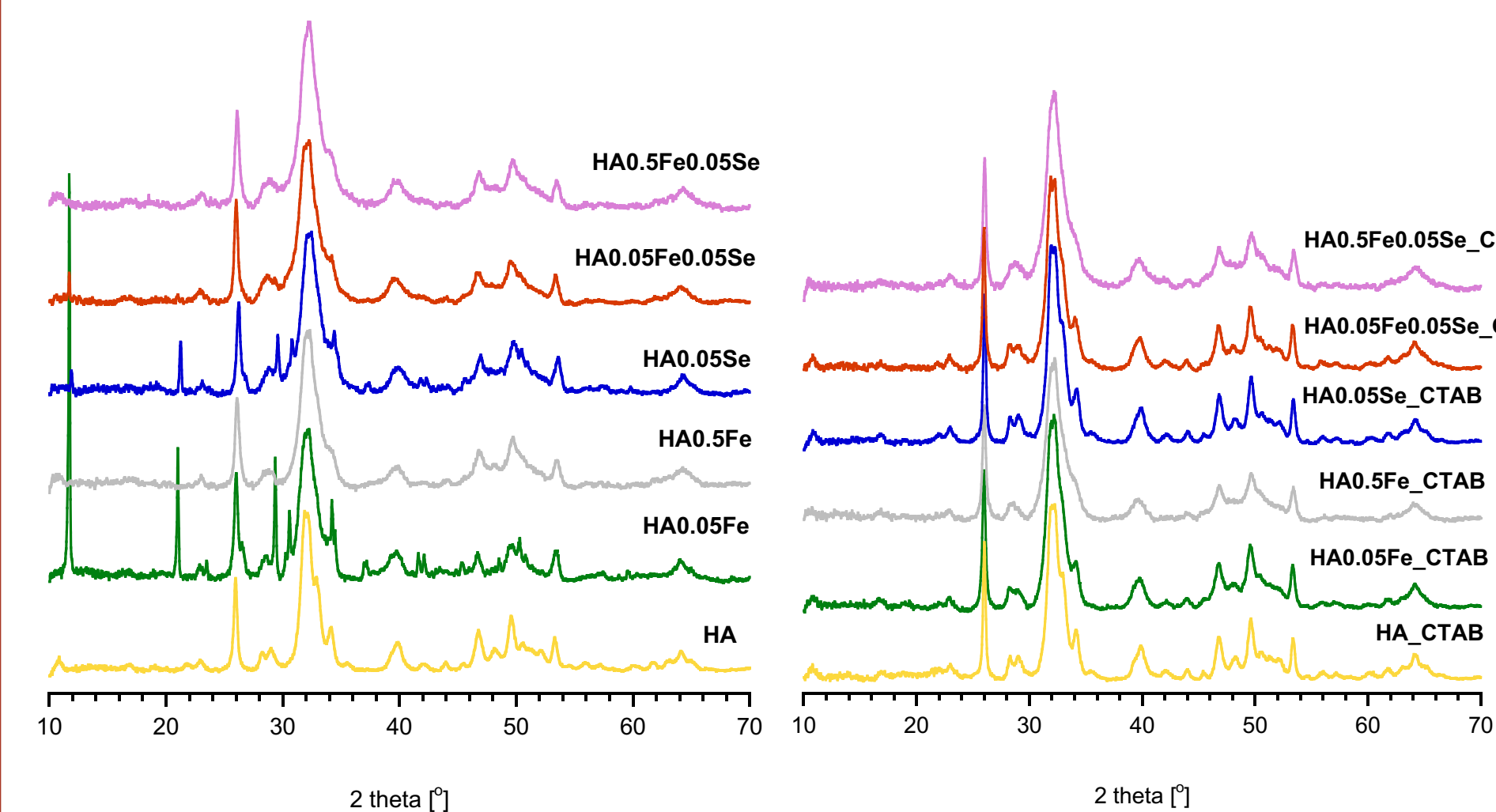
Piśmiennictwo:

- Dorozhkin, S.V. *Materials* 2013, 6, 3840-3942
Hou Ch-H. et al., *Biomaterials* 2009, 30, 3956-3960.
Oryan A. et al., *Journal of Controlled Release* 2015, 215, 12-24.
Uskoković V. et al., *Journal of Materials Chemistry B* 2017, 5(7), 1430-1445.
Wang J. et al., *Materials Letters* 2017, 196, 400-402.



Rys. 1. Schemat procesu syntezy proszków (kolor czerwony – różnice w metodzie z dodatkiem surfaktantu).

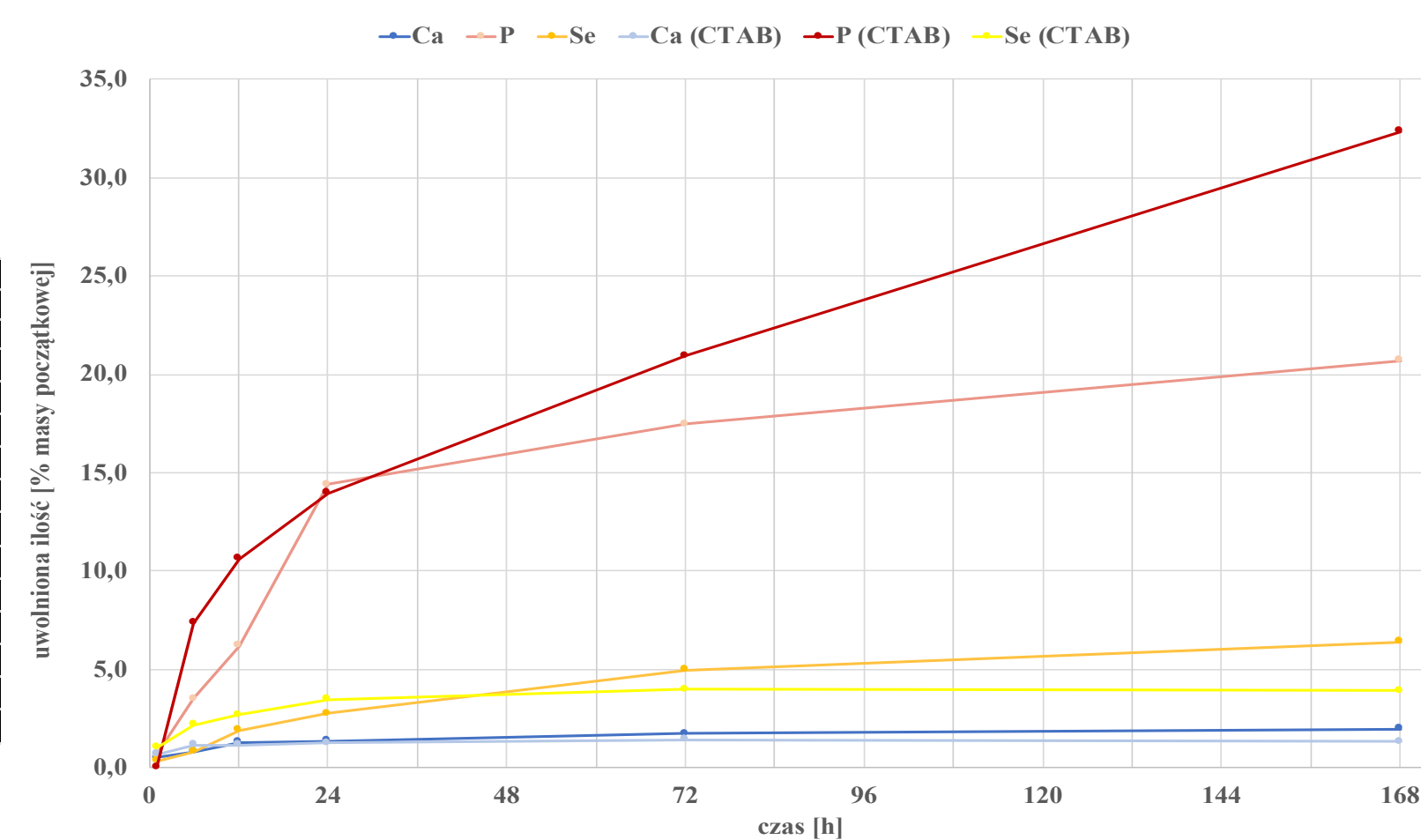
WYNIKI



Rys. 2. Dyfraktogramy otrzymanych materiałów.

Próbka	Zawartość			Stosunek molowy	
	Ca [%]	P [%]	Fe [%]	Ca/P	Ca+Fe/P+Se
HA	45,958	21,726		1,635	
HA-0.05Fe	41,189	23,770	0,309	1,329	1,246
HA-0.5Fe	38,165	22,345	3,124	1,320	1,398
HA-0.05Se	42,673	23,967		1,419	1,376
HA-0.05Fe-0.05Se	45,418	24,627	0,315	1,335	1,425
HA-0.5Fe-0.05Se	40,438	22,661	3,282	1,309	1,379
HA CTAB	43,513	22,465		1,497	
HA-0.05Fe CTAB	39,526	19,502	0,307	1,566	1,475
HA-0.5Fe CTAB	39,279	20,493	1,935	1,481	1,534
HA-0.05Se CTAB	40,968	19,899		1,591	1,587
HA-0.05Fe-0.05Se CTAB	40,462	19,833	0,317	1,577	1,581
HA-0.5Fe-0.05Se CTAB	35,693	18,428	2,186	1,497	1,558

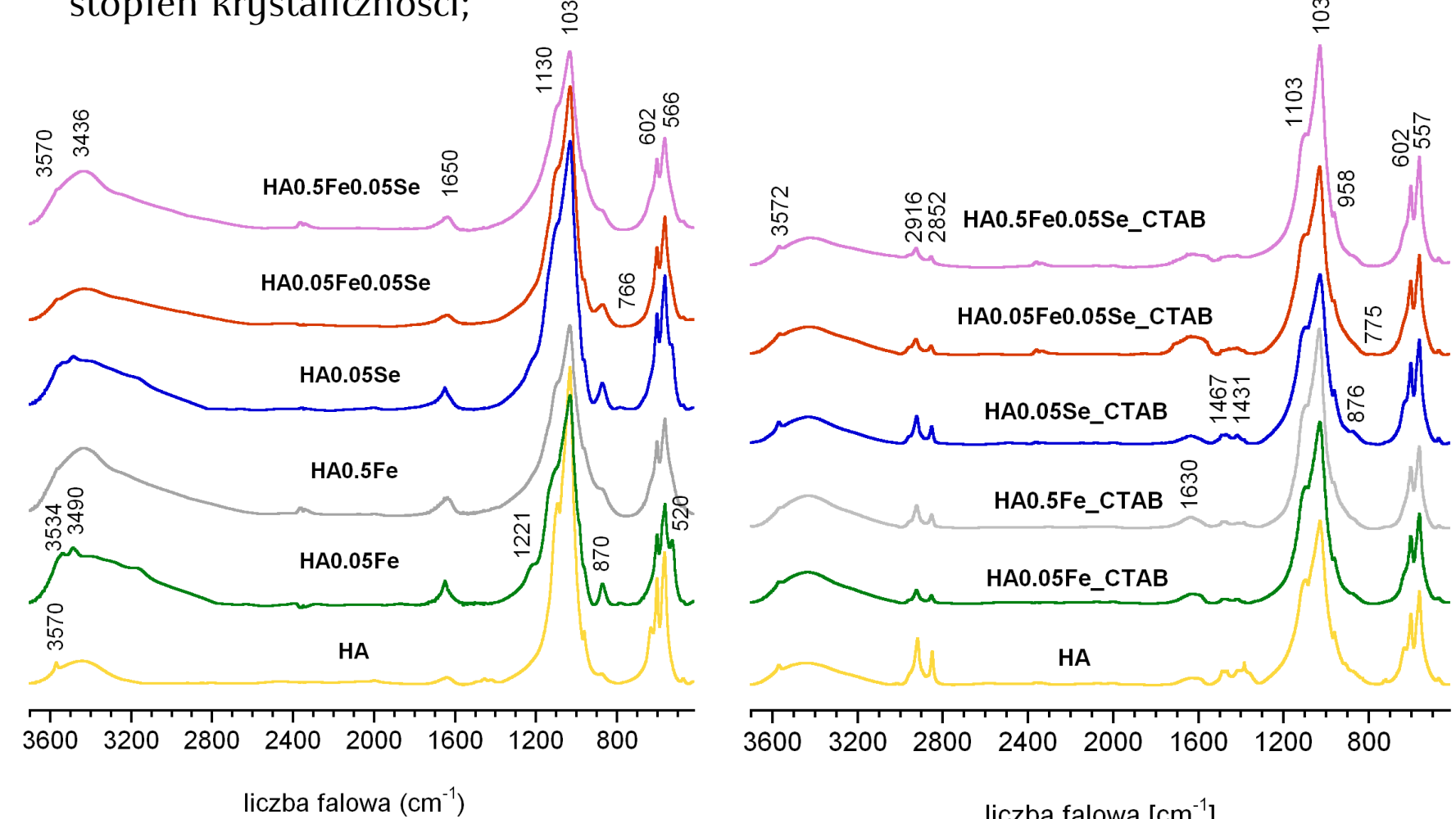
Rys. 4. Tabela z podsumowaniem wyników ICP-OES.



Rys. 7. Wykresy przedstawiające ilości poszczególnych jonów uwalnianych z granul wraz z upływem czasu.

PXRD:

- Obecność refleksów o położeniu i intensywności charakterystycznych dla HA;
- Badane próbki są materiałami krystalicznymi, jednak ich stopień krystaliczności jest relatywnie niski;
- Obecność refleksów char. dla bruszytu;
- Wpływ podstawień jonowych na zmniejszenie stopnia krystaliczności;
- Materiały uzyskane w obecności surfaktantu charakteryzuje wyższy stopień krystaliczności;



Rys. 3. Widma FT-IR otrzymanych materiałów.

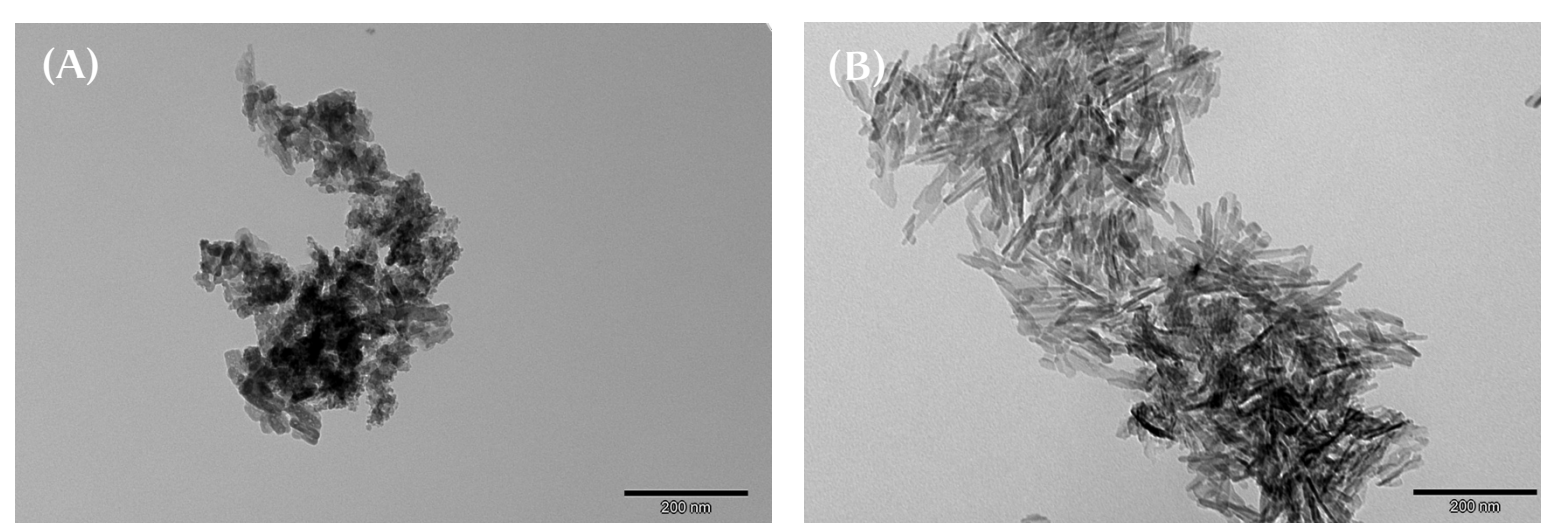
FT-IR:

- Obecność pasm charakterystycznych dla HA;
- Domieszkowane materiały otrzymane w zwykłej syntezie okazały się niejednorodnie fazowo;
- Występowanie pasm potwierdzających inkorporację anionów SeO_3^{2-} ;
- Materiały uzyskane w obecności surfaktantu charakteryzuje wyższy stopień krystaliczności;

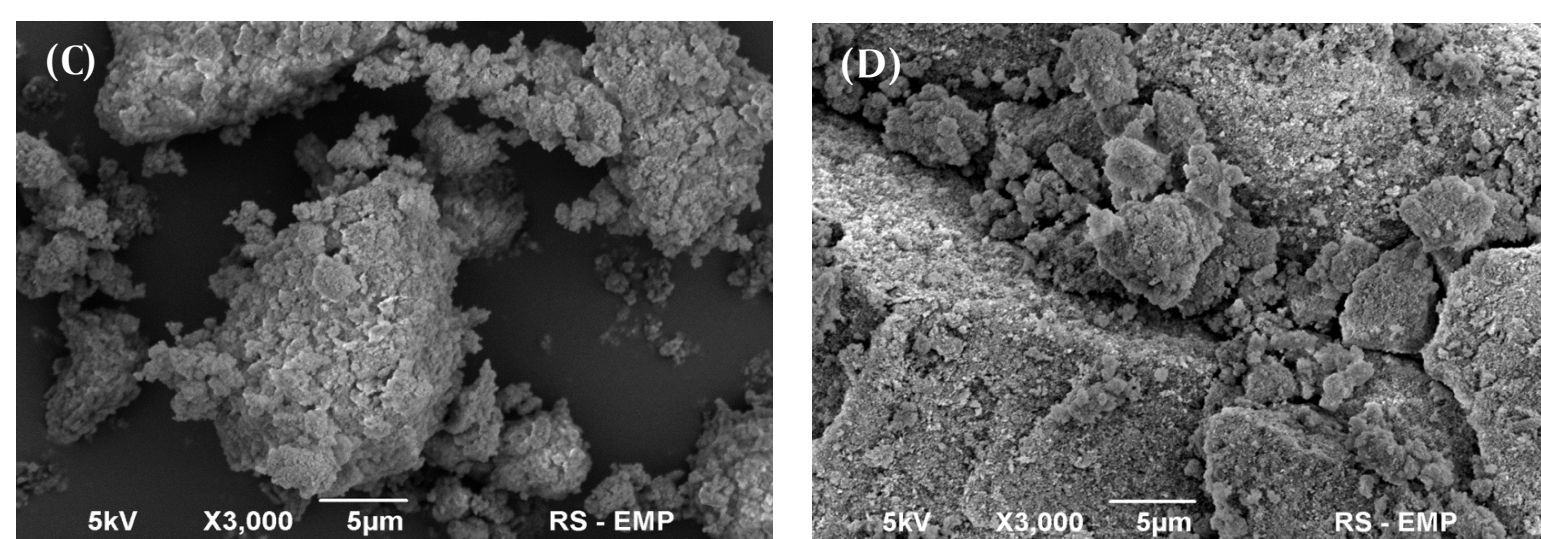
Pasma [cm ⁻¹]	Organie
3572 – 3570	strukturalne OH (v), (HA)
3534 – 3490	rozciągające OH (H ₂ O) (Bru)
3436	rozciągające OH (H ₂ O)
2916 – 2852	-CH ₂ , -CH ₃ (EDTA/CTAB)
1650 – 1630	zginające OH (H ₂ O)
1467 – 1431	CO ₂ ²⁻
1221	POH (Bru)
1130 – 1103	PO ₄ ³⁻ (v) (HA)
1030	PO ₄ ³⁻ (v) (HA)
958	PO ₄ ³⁻ (v) (HA)
876	CO ₂ ²⁻
870	HPO ₄ ²⁻ (Bru)
775 – 766	SeO ₃ ²⁻
602	PO ₄ ³⁻ (v) (HA)
566 – 557	PO ₄ ³⁻ (v) (HA)
520	HPO ₄ ²⁻ (Bru)

ICP-OES:

- Potwierdzenie inkorporacji jonów żelaza (III) i selenianowych (IV);
- Tylko w przypadku jednopodstawionych materiałów otrzymanych klasyczną metodą realne zawartości poszczególnych pierwiastków w proszkach są zbliżone do zakładanych;
- Kationy Fe³⁺ ulegają podstawieniu w większym stopniu niż aniony SeO₃²⁻;
- Inkorporacja żelaza i zastosowanie surfaktantu ograniczają ilości możliwych do wprowadzenia anionów SeO₃²⁻;
- Wyższe stosunki Ca+Fe/P+Se dla materiałów otrzymanych metodą z dodatkiem surfaktantu – mniejszy udział fazy amorficznej;



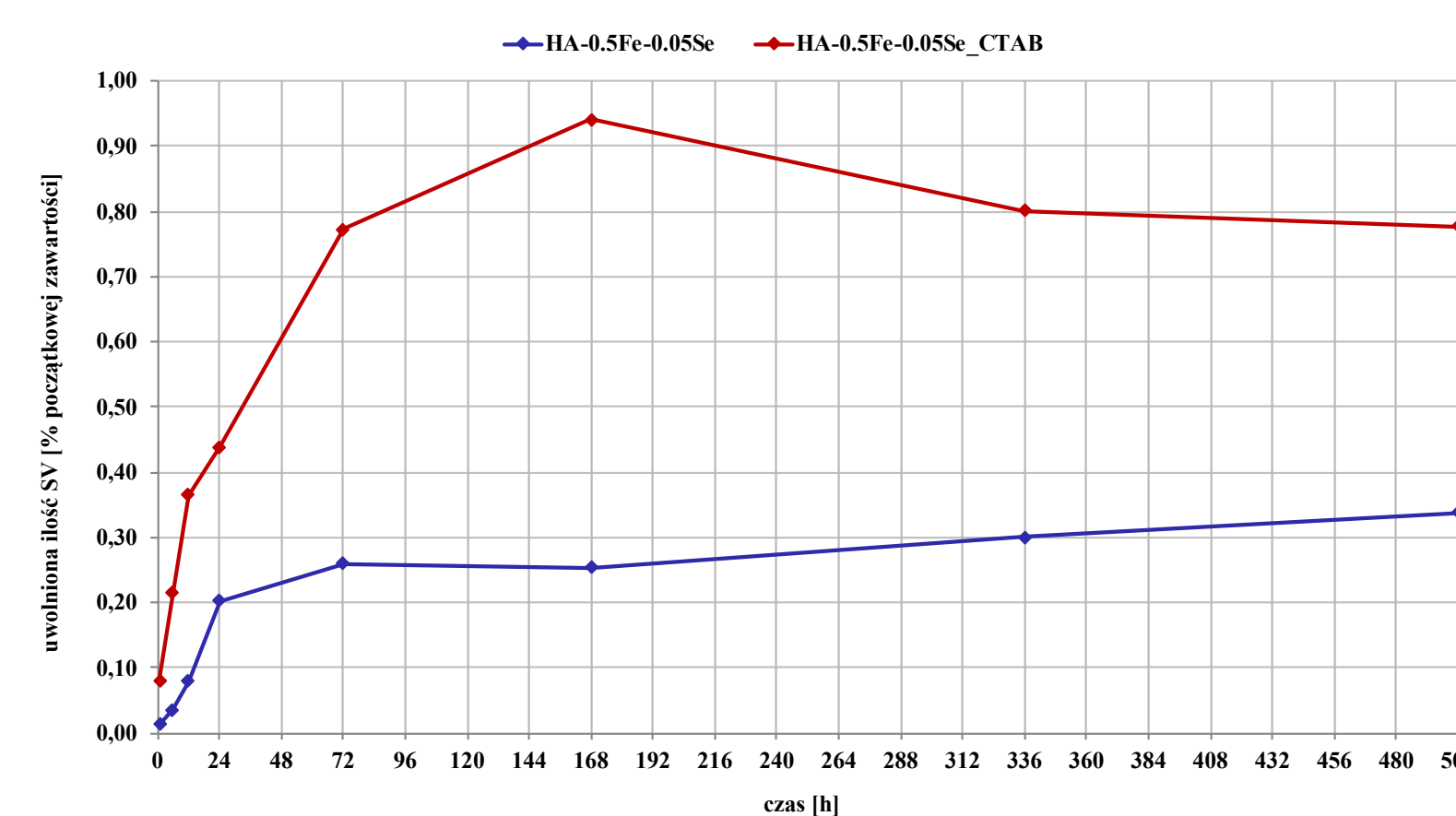
Rys. 5. Zdjęcia wybranych materiałów wykonane transmisyjnym mikroskopem elektronowym w 150x powiększeniu: (A) – czysty HA otrzymany klasyczną metodą; (B) – czysty HA otrzymany metodą z dodatkiem CTAB.



Rys. 6. Zdjęcia materiałów uzyskanych metodą precypitacyjną z dodatkiem CTAB wykonana za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego w 3000x powiększeniu: (C) – HA-0.5Fe; (D) – HA-0.05Se.

UWALNIANIE JONÓW Z GRANUL (ICP-OES):

- Niewielkie stężenia jonów w medium wynikają z niskiej rozpuszczalności HA w obojętnym środowisku buforu fosforanowego;
- Powolne uwalnianie żelaza i relatywnie szybsze uwalnianie selenu wskazują, że jony Fe³⁺ prawdopodobnie trwale wbudowują się w strukturę HA, podczas gdy jony SeO₃²⁻ lokują się głównie w hydratowanej warstwie powierzchniowej;
- Uwalnianie żelaza w praktycznie niewykrywalnym stopniu oraz powolne, ale zauważalne uwalnianie anionów selenianowych są zjawiskami korzystnymi z punktu widzenia ewentualnego praktycznego zastosowania kompozytów;



Rys. 8. Wykresy przedstawiające ilości simwastatyny uwolnionej z granul wraz z upływem czasu.

UWALNIANIE SIMWASTATYNY Z GRANUL (HPLC):

- Zaburzenia w przebiegu krzywych uwalniania prawdopodobnie są wynikiem utrudnionego pobierania próbek na skutek degradacji granul;
- Pozostałości surfaktantu w proszku hydroksyapatytowym mogły przyspieszyć rozpad kompozytów;
- Obydwa kompozyty wykazują efekt początkowego wyrzutu substancji leczniczej (*burst release*);
- Niewielki odsetek uwolnionego do medium leku wskazuje, że alkaliczna postać simwastatyny może silnie adsorbować się do powierzchni kompozytu;

WNIOSKI

- Otrzymano nanokrystaliczne proszki hydroksyapatytowe domieszkowane jonami żelaza (III) i/lub selenu (IV);
- Inkorporacja obcych jonów skutkuje zmniejszeniem krystaliczności hydroksyapatytu, może również utrudniać otrzymywanie jednorodnych fazowo materiałów;
- Dodatek surfaktantu umożliwia uzyskiwanie materiałów jednorodnych fazowo o wyższym stopniu krystaliczności. Prawdopodobnie wynika to z ograniczenia formowania amorficznej hydratowanej warstwy powierzchniowej;
- Zarówno ilość i rodzaj wprowadzanych jonów, jak i stosowana metoda syntezy mają wpływ na morfologię i rozmiary uzyskiwanych kryształów;
- Wprowadzanie jonów Fe³⁺ do struktury hydroksyapatytu i zastosowanie surfaktantu ogranicza inkorporację jonów SeO₃²⁻;
- Mechanizmy inkorporacji jonów żelaza (III) i selenianowych (IV) są odmiennie;
- Pozostałości surfaktantu w proszku hydroksyapatytowym prawdopodobnie przyspieszają degradację granul, co może ograniczać praktyczne zastosowanie takiego kompozytu;
- Badane kompozyty wykazują efekt tzw. pierwszego wyrzutu leku (z ang. *burst release*), biorąc jednak pod uwagę, że uwolnieniu uległ jedynie niewielki odsetek zawartości simwastatyny w nośniku, zjawisko to nie powinno skutkować wystąpieniem toksyczności;
- Niewielka ilość uwolnionych jonów prawdopodobnie jest wynikiem niskiej rozpuszczalności hydroksyapatytu w obojętnym środowisku buforu fosforanowego;
- W celu poprawy trwałości granul oraz optymalizacji profilu uwalniania substancji leczniczej konieczne są dalsze badania nad tego typu nośnikami.