

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239179**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428993**

(22) Data zgłoszenia: **21.02.2019**

(51) Int.Cl.

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

(54) **Hydrożelowy materiał hybrydowy oraz sposób jego otrzymywania i zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

24.08.2020 BUP 18/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

08.11.2021 WUP 32/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARIA NOWAKOWSKA, Kraków, PL

**JOANNA LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA,
Wolbrom, PL**

ADRIANA GILARSKA, Lutków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Rafał Witek

PL 239179 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy dziedziny inżynierii materiałowej, a dokładniej stabilnych strukturalnie bioaktywnych wstrzykiwalnych hydrożelowych materiałów hybrydowych nadających się do zastosowań w inżynierii tkankowej.

Otrzymywanie nowych biomateriałów projektowanych celowo dla potrzeb inżynierii tkankowej ukierunkowanej na odbudowę tkanki kostnej stanowi wciąż istotne wyzwanie dla medycyny regeneracyjnej [1, 2]. Badania, których celem jest opracowanie i wytworzenie bioaktywnych rusztowań komórkowych są szczególnie ważne z uwagi na możliwości wykorzystania potencjału terapeutycznego tych materiałów w rekonstrukcji ubytków kostnych spowodowanych wypadkami, chorobami kości, jak również zmianami w tkance kostnej powodowanymi procesem starzenia [3]. Wstrzykiwalne hydrożele biopolimerowe są niezwykle obiecującymi kandydatami do zastosowań jako rusztowania ze względu na szereg wyróżniających je właściwości [4, 5].

Z publikacji A. Gilarska, J. Lewandowska-Łańcucka, W. Horak, M. Nowakowska: Collagen/chitosan/hyaluronic acid – based injectable hydrogels for tissue engineering applications – design, physicochemical and biological characterization; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 170 (2018), str. 152–162 znany jest hydrożelowy materiał hybrydowy do wstrzykiwań do odbudowy tkanki kostnej stanowiący mieszaninę kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego sieciowaną genipiną. Materiał nie zawiera zawieszonych cząsteczek krzemionkowych.

Z chińskiej publikacji patentowej CN 102188746 B (2013-08-14) znany jest hydrożel do regeneracji tkanki zawierający sieciowaną mieszaninę kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego. Substancją sieciującą może być genipiną. Publikacja nie ujawnia zawieszonych cząsteczek krzemionkowych.

Z publikacji Joanna Filipowska, Joanna Lewandowska-Łańcucka, Adriana Gilarska, Łukasz Niedźwiedzki, Maria Nowakowska, „In vitro osteogenic potential of collagen/chitosan-based hydrogels-silica particles hybrids in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell cultures”; *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 113, 2018, str. 692–700, (abstrakt) znany jest hydrożelowy materiał hybrydowy do odbudowy tkanek kostnych stanowiący mieszaninę kolagenu i chitozanu sieciowaną genipiną. Materiał zawiera zawieszone cząsteczki krzemionkowe, ale nie są one sfunkcjonalizowane grupami aminowymi. Materiał nie zawiera kwasu hialuronowego.

Z publikacji Sionkowska A, Kaczmarek B. Preparation and characterization of composites based on the blends of collagen, chitosan and hyaluronic acid with nano-hydroxyapatite. *Int J Biol Macromol.* 2017 Sep; 102: str. 658–666 znany jest hydrożelowy materiał hybrydowy do odbudowy tkanki kostnej stanowiący mieszaninę kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego. Materiał zawiera zawieszone cząsteczki hydroksyapatytu. Materiał nie jest sieciowany.

Z publikacji Kyoung-Ku Kang, Hyun-Seok Oh, Dong-Young Kim, Gyurak Shim, Chang-Soo Lee, Synthesis of silica nanoparticles using biomimetic mineralization with polyallylamine hydrochloride, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 507, 2017, str. 145–153 specjalista wie, że sfunkcjonalizowanie cząsteczek krzemionkowych grupami aminowymi sprzyja osteoindukcji.

Celem wynalazku jest dostarczenie biodegradowalnego materiału biopolimerowego, który nadawałyby się szczególnie dobrze do stosowania w medycynie regeneracyjnej, zwłaszcza w odbudowie tkanki kostnej. Szczególnie pożądanym jest, aby nowy materiał zapewniał przyspieszenie procesu mineralizacji oraz stanowił dogodną biomatrycę dla zasiedlania jej przez komórki osteoblastyczne.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania hydrożelowego materiału hybrydowego charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) metodą zol-żel otrzymuje się cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowymi,
- b) cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowymi otrzymane w etapie a) zawieszają się w zolu zawierającym mieszaninę roztworów kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego, korzystnie w stosunku wagowym kolagen : chitozan : kwas hialuronowy wynoszącym 50 : 40 : 10, przy czym korzystnie zawartość sfunkcjonalizowanych cząsteczek krzemionkowych w zolu wynosi nie mniej niż 1,9 mg/ml zolu, korzystnie od 1,9 do 3,8 mg/ml zolu.
- c) uzyskaną w etapie b) zawiesinę poddaje się reakcji sieciowania genipiną.

Korzystnie, w etapie a) prowadzi się reakcję tetraetoksy silanu z aminopropylotrietoksy silanem w obecności wody i etanolu, przy czym reakcję prowadzi się w nadmiarze tetraetoksy silanu, korzystnie w stosunku objętościowym tetraetoksy silanu : aminopropylotrietoksy silanem wynoszą-

cym 10 : 1, a następnie otrzymany materiał oddziela się, i ewentualnie płucze oraz poddaje suszeniu otrzymując biały proszek.

Korzystnie, w etapie b) zol otrzymuje się poprzez zmieszanie:

- od 12 do 13 objętości roztworu kolagenu w kwasie solnym o stężeniu z zakresu od 3,5 do 4,1 mg/ml,
- około 4 objętości roztworu chitozanu o stężeniu 1% wag. w 1% kwasie octowym,
- około 1 objętości roztworu kwasu hialuronowego o stężeniu 1% wag. w 10x buforze fosforanowym PBS.

Korzystnie, w etapie b) otrzymany zol miesza się z wodną zawiesiną cząstek krzemionkowych sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi, korzystnie w ilości prowadzącej do uzyskania ich stężenia w zolu wynoszącego nie mniej niż 1,9 mg/ml, korzystnie od 1,9 do 3,8 mg/ml zolu.

Korzystnie, w etapie c) uzyskaną w etapie b) zawiesinę miesza się z roztworem genipiny w 10 x PBS, korzystnie w ilości prowadzącej do uzyskania jej stężenia w zawieszynie wynoszącego nie mniej niż 0,6 mg/ml zawiesiny.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest hydrożelowy materiał hybrydowy, charakteryzujący się tym, że zawiera hydrożel stanowiący mieszaninę kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego sieciowaną genipiną wraz z zawieszonymi w niej cząstkami krzemionkowymi sfunkcjonalizowanymi grupami aminowymi, przy czym zawartość sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych wynosi nie mniej niż 1,9 mg/ml, korzystnie od 1,9 do 3,8 mg/ml końcowego zolu, przy czym cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowymi są związane kowalencyjnie z polimerami tworzącymi hydrożel.

Korzystnie, hydrożel stanowi mieszaninę roztworów kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego w stosunku wagowym kolagen : chitozan : kwas hialuronowy wynoszącym 50 : 40 : 10.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest hydrożelowy materiał hybrydowy według wynalazku lub otrzymany sposobem według wynalazku, zdefiniowane powyżej, do stosowania w medycynie regeneracyjnej, zwłaszcza w odbudowie tkanki kostnej.

Realizację wynalazku prezentowanego w ramach niniejszego zgłoszenia stanowi produkt w postaci hydrożel owego materiału hybrydowego charakteryzujący się tym, że otrzymano go w wyniku jednoczesnego sieciowania biogodnym czynnikiem sieciującym jakim jest genipiną biopolimerowej matrycy hydrożel owej złożonej z kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego oraz rozproszonych w niej celowo powierzchniowo modyfikowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych. Funkcjonalizacja powierzchni cząstek krzemionkowych grupami aminowymi umożliwiła ich kowalencyjne związanie z hydrożel ową siecią polimerową w trakcie sieciowania genipiną – czynnikiem zdolnym do sieciowania w wyniku tworzenia wiązań kowalencyjnych z pierwszorzędowymi grupami aminowymi.

Otrzymany nowy materiał bioaktywny jest homogenicznym materiałem hybrydowym, w którym bioaktywne cząstki krzemionkowe są trwale związane z matrycą biopolimerową. Związanie kowalencyjne nanocząstek krzemionkowych z matrycą eliminuje poważny problem jakim jest separacja fazowa cząstek i ich niekontrolowana dyfuzja do tkanek w warunkach zastosowania *in vivo* w sytuacji braku ich immobilizacji w matrycy.

Materiał hybrydowy według wynalazku może być wykorzystany do odbudowy ubytków kostnych ortopedycznych, stomatologicznych. Może być wprowadzany do ubytku w sposób mało inwazyjny (iniekcja) i żelowany w sposób kontrolowany, a po spełnieniu swej funkcji terapeutycznej ulegnie degradacji enzymatycznej (co wykazano) z utworzeniem produktów biogodnych.

Nieoczekiwanie materiał według wynalazku zapewnia przyspieszenie procesu mineralizacji oraz stanowi dogodną biomatrycę dla zasiedlania jej przez komórki osteoblastyczne. W przeprowadzonych testach biologicznych hydrożelowego materiału hybrydowego według wynalazku stwierdzono zachowanie jego biokompatybilności, a także zdolności do wspierania adhezji, proliferacji oraz utrzymania fenotypu komórek osteoblastycznych (MG-63).

Poniżej przedstawiono przykłady wykonania wynalazku.

P r z y k ł a d 1 Otrzymywanie hydrożelowego materiału hybrydowego.

Wytwarzanie hydrożelowego materiału hybrydowego według wynalazku składa się z dwóch zasadniczych etapów opisanych szczegółowo poniżej w pkt 1 i pkt 2.

1. Otrzymywanie sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych. Sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionkowe otrzymano metodą zol-żel. Do mieszaniny składającej się z etanolu (5,1 ml) i wody (5 ml) wprowadzono kolejno 1,0 ml tetraetoksylanu (TEOS) i 0,1 ml aminopropylotrietoksylanu (APTES). Uzyskaną w ten sposób mieszaninę mieszało się przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 30 min w tempe-

raturze pokojowej. Otrzymany materiał poddano procesowi wirowania a następnie oczyszczono przepłukując etanolem i wirując. Cykl płukania w etanolu/wirowania powtórzono czterokrotnie. Materiał suszono w piecu próżniowym w temperaturze 60°C. Po oczyszczeniu uzyskano biały proszek.

2. Otrzymywanie materiału hybrydowego

Materiał hybrydowy otrzymano w wyniku jednoczesnego sieciowania genipiną mieszaniny biopolimerów (kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego) i powierzchniowo modyfikowanych cząstek krzemionkowych. Zmieszano odpowiednie objętości roztworów biopolimerów: 590 μ l roztworu kolagenu (Kol) (roztwór w kwasie solnym o stężeniu z zakresu 3,5–4,1 mg/ml – postać dostarczona przez producenta BD Biosciences) z 193 μ l roztworu chitozanu (Ch) (roztwór 1%/wag w 1% kwasie octowym) z 48 μ l roztworu kwasu hialuronowego (HA) (roztwór 1%/wag w 10x buforze fosforanowym (PBS) (o składzie: NaCl (c = 1,37 M), KCl (c = 27 mM), Na₂HPO₄ (c = 43 mM), KH₂PO₄ (c = 14 mM), pH ustalone do wartości 7,4 stężonym (c = 35%) roztworem kwasu solnego HCl). Otrzymany żół poddano energicznemu wytrząsaniu a następnie dodano 0,3 ml wodnej zawiesiny sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych o odpowiednim stężeniu (S1 = 16,6 mg/ml, S2 = 8,3 mg/ml, S3 = 1,7 mg/ml). Mieszaninę ponownie wytrząsano a następnie dodawano 169 μ l roztworu genipiny (roztwór o stężeniu 20 mM, sporządzony w 10 x PBS) i inkubowano w temperaturze 37°C aż do całkowitego usieciowania. Otrzymany materiał ma postać hydrożelu. Stosunek wagowy biopolimerów w otrzymanym materiale wyniósł: Kol:Ch:HA – 50:40:10. Stosując trzy różne stężenia zawiesin/dyspersji cząstek krzemionkowych otrzymano trzy rodzaje materiałów hybrydowych: KolChHA S1, KolChHA S2 i KolChHA S3. Jako materiał kontrolny otrzymano hydrożel o analogicznym składzie biopolimerów ale bez dodatku cząstek krzemionkowych (KolChHA).

P r z y k ł a d 2 Właściwości fizykochemiczne otrzymanego hydrożelowego materiału hybrydowego oraz substratów wykorzystywanych do jego otrzymywania.

1) Właściwości fizykochemiczne sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych

Na Figurze 1 przedstawiony został schemat otrzymywania sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych.

Otrzymanie sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych potwierdzono metodami spektroskopowymi, określono również ich morfologię i parametry porozymetryczne. Na Figurze 2 przedstawiono zestawienie widm FTIR i XPS uzyskanych dla zsyntetyzowanego materiału. Widoczne na widmie FTIR (Fig. 2A) pasma potwierdzają obecność zarówno grup silanolowych jak i grup aminowych. Intensywne wąskie pasmo przy 1027 cm⁻¹ pochodzi od drgań zginających Si-O, a pik przy 779 cm⁻¹ od drgań rozciągających Si-O-Si, obydwa charakterystyczne dla krzemionki. Pasma przy 942 cm⁻¹ można przypisać grupie Si-OH, podczas gdy pik przy 1523 cm⁻¹ pochodzi od grup NH₂-. Pasma przy 1626 cm⁻¹ można przypisać do zaadsorbowanej H₂O, natomiast szerokie rozległe pasmo pojawiające się w zakresie 2600–3650 cm⁻¹ jest złożeniem pasm pochodzących od zaadsorbowanych cząsteczek wody, grup OH⁻ obecnych na powierzchni próbki i grup aminowych.

W celu pełniejszej analizy składu powierzchniowego otrzymanego materiału wykonano analizę z użyciem spektroskopii fotoelektronów (XPS). Na Figurze 2B przedstawiono otrzymane widmo, obecne na nim piki można przypisać do O 1s (531,1 eV), N 1s (402,6 eV), C 1s (286,5 eV), Si 2s (155,1 eV) i Si 2p (103,5). Sygnały pochodzące od N 1s i C 1s można uznać za diagnostyczne dla powierzchniowej funkcjonalizacji przy pomocy APTES, ponieważ cząstki krzemionki otrzymane z TEOS nie zawierają tych pierwiastków. Analiza składu powierzchni materiału przedstawiona w Tabeli 1 wykazała otrzymanie struktur SiCON o składzie atomowym odpowiednio 78%, 3%, 7% i 12% dla O, N, C i Si. Teoretyczny skład atomowy obliczono zakładając strukturę chemiczną sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych wynikającą z zastosowanego w syntezie stosunku molowego TEOS: APTES (10:1). Porównując dane eksperymentalne i teoretyczne można zauważyć wyższą zawartość tlenu, co może wynikać z obecności eksponowanych na powierzchni grup silanolowych utworzonych w wyniku częściowej polikondensacji użytych prekursorów.

Na Figurze 2 zaprezentowano zestawienie widm FTIR (A) i XPS (B) otrzymanych dla sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych.

Tabela 1
Wyniki XPS pierwiastkowego składu powierzchni (%) dla sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych.

Pierwiastkowy skład powierzchni (%)	skład			
	O1s	N1s	C1s	Si2p
Dane eksperymentalne	78	3	7	12
Dane teoretyczne	49	2	5	44

Wyznaczono również średnice hydrodynamiczne a także potencjał powierzchniowy (zeta) otrzymanych cząstek. Otrzymane dane zebrano w Tabeli 2. Średnia średnica hydrodynamiczna cząstek uzyskanych z pomiarów DLS wynosi około 607 nm przy współczynniku dyspersji, DI = 0,3. Potencjał zeta otrzymanych cząstek przyjął wartość dodatnią (35 mV) wynikającą z protonowania grup aminowych obecnych w szkielecie APTES, co jest kolejnym wynikiem potwierdzającym efektywną funkcjonalizację.

Tabela 2

Zestawienie danych otrzymanych dla sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych: średnica hydrodynamiczna (d_z), współczynnik dyspersji (DI), potencjał zeta (ζ) a także parametry porozymetryczna w tym: powierzchnia całkowita (S_{BET}), objętość (V_{mes}) i średnica (D_{mes}) mezoporów.

d_z [nm]	DI	ζ [mV]	S_{BET} [m ² /g]	V_{mes} (BJH) [cm ³ /g]	D_{mes} (BJH) [nm]
607±23	0.3	35±1	24	0.14	23

Morfologię otrzymanego materiału określono wykorzystując technikę skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Na Figurze 3 przedstawione zostały otrzymane mikrofotografie sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych, na których można zauważyć dwie populacje cząstek. Większe z nich mają średnicę około 400 nm, podczas gdy mniejsze cząstki mają około 100 nm. Mniejsze cząstki (oznaczone strzałkami na Fig. 3B) wykazują tendencję do agregowania wokół większych obiektów.

W oparciu o pomiary izotermy adsorpcji azotu określono parametry charakteryzujące porowatość otrzymanych cząstek (Tabela 2). Oznaczono powierzchnię właściwą (S_{BET}) w oparciu o model Brunauer-Emmett-Teller (BET) a także rozmiary i objętość porów. Stwierdzono, iż sfunkcjonalizowane cząstki krzemionkowe charakteryzują się powierzchnią właściwą 24 m²/g a także wykazują znaczną mezoporowatość (0,14 cm³/g).

2) Właściwości fizykochemiczne materiału hybrydowego

Na Figurze 4 zaprezentowano schemat otrzymywania materiału hybrydowego. Stosując trzy różne stężenia dyspersji cząstek krzemionkowych otrzymano trzy rodzaje materiałów hybrydowych: KolChHA S1, KolChHA S2 i KolChHA S3, ich składy zaprezentowano w Tabeli 3.

Tabela 3

Zestawienie składu otrzymanych materiałów hybrydowych (Kol – kolagen, Ch – chitozan, HA – kwas hialuronowy).

Typ materiału	Stosunek wagowy	Stężenie sfunkcjonalizowanych
	Kol:Ch:HA	cząstek krzemionkowych [mg/ml]
KolChHA S1	50:40:10	16,6
KolChHA S2	50:40:10	8,3
KolChHA S3	50:40:10	1,7

Wykorzystując technikę SEM scharakteryzowano mikrostrukturę otrzymanych układów hybrydowych. Analizując otrzymane mikrofotografie (Fig. 5) można zauważyć obecność cząstek krzemionkowych w każdym z otrzymanych układów.

Na Figurze 5 przedstawione zostały mikrofotografie SEM uzyskane dla otrzymanych materiałów hybrydowych, materiał KolChHA S1(A), materiał KolChHA S2 (B) i materiał KolChHA S3 (C).

Zbadano liofilowość powierzchni otrzymanych materiałów w oparciu o wyniki pomiarów kątów zwilżania. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 4. Analizując otrzymane dane można stwierdzić, iż wprowadzenie do matrycy polimerowej sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych powoduje, że powierzchnia materiałów staje się bardziej hydrofilowa, o czym świadczą niższe wartości kąta zwilżania w porównaniu z materiałem nie zawierającym cząstek krzemionki (KolChHA). Materiał o najwyższym stężeniu cząstek krzemionki (KolChHA S1) charakteryzuje się najbardziej hydrofilową powierzchnią. Powierzchnie materiałów o mniejszej zawartości cząstek krzemionki (KolChHA S2 i KolChHA S3) wykazują zwilżalność na podobnym poziomie. Poprawę hydrofilowości można wyjaśnić obecnością na powierzchni materiałów hybrydowych sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych zawierających eksponowane powierzchniowo hydrofilowe grupy aminowe (co potwierdziła analiza XPS).

Tabela 4
Wartości kątów zwilżania dla otrzymanych materiałów.

Typ materiału	Wartości kąta zwilżania [°]
KolChHA	87,2 ± 2,5
KolChHA S1	68,6 ± 1,6
KolChHA S2	76,9 ± 2,4
KolChHA S3	76,5 ± 1,7

Określono również stopień pęcznienia (SP) dla otrzymanych materiałów hybrydowych. Eksperyment prowadzono w warunkach fizjologicznych (pH = 7,4; temp = 37°C), wyniki przedstawiono na Figurze 6. Można zauważyć, iż stężenie sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych ma istotny wpływ na właściwości pęcznienia badanych materiałów – SP maleje wraz ze wzrostem ich stężenia. W przypadku materiału o najwyższym stężeniu cząstek (KolChHA S1) stopień pęcznienia jest znacznie niższy w porównaniu z materiałem kontrolnym (KolChHA). Wynik ten wskazuje, że cząstki krzemionki wpływają na sztywność struktury hydrożelu. Ponadto funkcjonalizacja cząstek krzemionkowych umożliwiającą ich kowalencyjne przyłączenie do sieci polimerowej przyczynia się do zwiększania gęstości sieci w materiałach hybrydowych i tym samym powoduje obniżenie SP. W przypadku materiałów KolChHA S2 i KolChHA S3 nie zaobserwowano znaczącej zmiany właściwości pęcznienia w porównaniu z hydrożelem KolChHA. Na Figurze 6 przedstawiony został stopień pęcznienia w warunkach fizjologicznych dla otrzymanych materiałów.

P r z y k ł a d 3 Kontrolowane żelowanie zolu otrzymanego z mieszaniny biopolimerów i sfunkcjonalizowanych powierzchniowo cząstek krzemionki.

W celu potwierdzenia możliwości wykorzystania opracowanych układów hybrydowych jako materiałów wstrzykiwalnych przeprowadzono pomiary reologiczne, które poprzez śledzenie w czasie zmian modułu sprężystości (G') pozwoliły zweryfikować przejście od stanu zolu do żelu. Wartości G' zmierzone po 10, 30 i 60 minutach eksperymentu przedstawione na Figurze 8 (eksperyment prowadzono w temperaturze 37°C, po dodaniu do zolu roztworu genipiny, jak opisano powyżej). Na początku procesu żelowania (po 10 minutach) wartości G' dla wszystkich materiałów są na niskim poziomie (w zakresie 2–5 Pa) potwierdzając ich lepko-sprężysty stan i postać wstrzykiwaną. Wartości G' znacznie wzrastają po 30 minutach i osiągają wartość maksymalną w ciągu 60 minut od rozpoczęcia procesu sieciowania (tworzenie żelu). Tym samym porównanie wartości G' na początku (zol) i na końcu (żel) doświadczenia reologicznego dowodzi, że opracowane materiały mogą pełnić funkcję materiałów wstrzykiwalnych. Jednocześnie można stwierdzić, iż obecność sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych z powierzchniowymi grupami, które umożliwiają ich wbudowywanie poprzez

sieciowanie w strukturę hydrożelu nie utrudnia procesu tworzenia żelu. Otrzymane dane wykazały potencjał iniekcyjny opracowanych materiałów hybrydowych, co jest szczególnie istotne biorąc pod uwagę łatwości ich implantacji w potencjalnych zastosowaniach w inżynierii tkankowej.

P r z y k ł a d 4. Właściwości bioaktywne otrzymanych materiałów hybrydowych.

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie otrzymanych materiałów hybrydowych jako rusztowań w inżynierii tkanki kostnej zbadano ich właściwości bioaktywne. W tym celu przeprowadzono eksperyment biomineralizacji *in vitro* w warunkach symulowanego sztucznego osocza (z ang. Simulated Body Fluid, SBF). Dane literaturowe pokazują, iż materiały zdolne do wytwarzania na ich powierzchni warstwy apatytu w warunkach SBF będą również ulegać biomineralizacji w żywym organizmie zapewniając tym samym efektywną integrację rusztowania z naturalną kością. Zdolność opracowanych materiałów do inicjowania procesu nukleacji apatytu została zbadana w eksperymencie obejmującym ich 7-dniową inkubację w SBF w 37°C. Następnie materiały zostały poddane badaniom przy użyciu dwóch technik: SEM i EDS. Na Figurze 9 przedstawiono uzyskane mikrofotografie SEM, a w Tabeli 5 zestawiono wyznaczony techniką EDS stosunek wapnia do fosforu (Ca/P) dla fazy mineralnej utworzonej na powierzchni materiałów.

T a b e l a 5
Stosunek Ca/P wyznaczony techniką EDS dla fazy mineralnej utworzonej na powierzchni materiałów po 7-dniowej inkubacji w SBF.

Typ materiału	Stosunek Ca/P
KolChHA	-
KolChHA S1	1.29 ± 0.03
KolChHA S2	1.29 ± 0.08
ColChHA S3	-

Otrzymane wyniki jasno wskazują, iż sfunkcjonalizowane cząstki krzemionkowe nadają bioaktywność otrzymanym materiałom hybrydowym KolChHA S1 i KolChHA S2. Tylko w przypadku tych materiałów można zaobserwować biomineralizację objawiającą się tworzeniem nowej fazy mineralnej o strukturze i stosunku Ca/P typowych dla apatytu. Dla materiału kontrolnego (KolChHA), a także materiału hybrydowego o najniższym stężeniu cząstek (KolChHa S3) nie dochodzi do biomineralizacji. Można zatem stwierdzić, iż materiały hybrydowe KolChHA S1 i KolChHA S2 posiadają właściwości bioaktywne.

P r z y k ł a d 5 Właściwości biologiczne otrzymanych materiałów hybrydowych.

Zbadano również właściwości biologiczne otrzymanych materiałów hybrydowych, w tym określono biokompatybilność, zdolność do wspierania adhezji, proliferacji a także aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) dla komórek osteoblastycznych MG-63 hodowanych na powierzchni materiałów.

Na Figurze 10 przedstawiona została proliferacja komórek MG-63 po 1, 3 i 7 dniach hodowli na powierzchni badanych materiałów (A), aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) komórek MG-63 po 3 i 7 dniach hodowli na powierzchni badanych materiałów.

Wyniki testów na żywotność komórek (test Alamar Blue) przeprowadzone po 1, 3 i 7 dnia hodowli (Figura 10A) wykazały, iż obecność trwale związanych z siecią polimerową sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych nie obniża biokompatybilności materiałów hybrydowych a także ich zdolności do wspierania proliferacji komórek MG-63 w porównaniu do materiału kontrolnego KolChHA.

Fosfataza alkaliczna (ALP) jest białkiem kościotwórczym będącym markerem wczesnych etapów różnicowania osteoblastów. Biorąc pod uwagę funkcję fizjologiczną ALP pełni również rolę znacznika potwierdzającego fenotyp i mineralizację osteoblastów. Aktywność ALP komórek MG-63 hodowanych na badanych materiałach określono w 3 i 7 dniu hodowli, wyniki przedstawiono na Figurze 10B. W przypadku wszystkich materiałów hybrydowych jak i materiału kontrolnego zaobserwowano podobną tendencję, wzrost aktywności po 7 dniach eksperymentu. Ponadto poziom ALP zarówno 3 jak i 7 dnia hodowli był istotnie wyższy w porównaniu do aktywności ALP komórek na płycie hodowlanej.

Zbadano również morfologię i adhezję komórek MG-63 po 3 dniach hodowli na powierzchni materiałów. W tym celu komórki zostały utrwalone i obrazowane przy użyciu techniki SEM. Na Figurze 11 zestawiono mikrofotografie SEM (Fig. 11A) przedstawiające morfologie utrwalonych komórek a także wykres przedstawiający ich średnią powierzchnię (oszacowaną w oparciu o uzyskane mikrofotografie

SEM). W oparciu o analizę mikrofotografii można stwierdzić, iż komórki przylegają dobrze zarówno do powierzchni materiałów hybrydowych jak i hydrożelu kontrolnego. Na wszystkich badanych powierzchniach komórki mają wydłużone kształty, co może wskazywać na zwartą i dobrze usieciowaną strukturę badanych materiałów. Oszacowana średnia powierzchnia komórek przyjmuje wartości zbliżone dla wszystkich materiałów, co w sposób ilościowy potwierdza, że morfologia komórek na badanych materiałach jest podobna. Dane te dowodzą zatem, iż obecność sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych nie wpływa niekorzystnie na adhezję komórek.

Przykład 6. Degradacja enzymatyczna materiału hybrydowego

Zbadano proces degradacji w warunkach PBS jak również w obecności enzymu – kolagenazy. Na Figurze 7 przedstawiono zmiany masy materiałów podczas inkubacji w buforze PBS (Fig. 7A) i w obecności kolagenazy (Fig. 7B). Największy ubytek masy następuje po pierwszym dniu degradacji i dotyczy wszystkich badanych materiałów. W kolejnych dniach obserwuje się tylko nieznaczne wahania masy. W przypadku materiałów hybrydowych KolChHA S1 i KolChHA S2 przebieg procesu degradacji przez cały czas trwania eksperymentu jest zbliżony do degradacji dla materiału kontrolnego KolChHA (różnice są statystycznie nieistotne). Oznacza to, że obecność sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych przy najwyższym (S1) i średnim (S2) stężeniu nie wpływa na szybkość utraty masy hydrożelu. Brak znaczących różnic w ubytku masy potwierdza również efektywność wbudowania sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionki do sieci polimerowej ponieważ w przeciwnym razie „wyciekanie” krzemionki z sieci hydrożel owej powinno objawiać się większym spadkiem masy otrzymanych układów hybrydowych. Materiał o najniższym stężeniu cząstek krzemionki (KolChHA S3) przez prawie cały czas trwania eksperymentu wykazuje relatywnie większą utratę masy w porównaniu z innymi badanymi materiałami. Po zakończeniu eksperymentu (po 21 dniach) wartości pozostałej masy wszystkich materiałów są podobne, stopień degradacji próbek wynosi od 37 do 48%.

Degradację enzymatyczną badano przez 144 godziny, na Figurze 7B przedstawiono otrzymane wyniki. Po 4 godzinach degradacji enzymatycznej ubytek masy wyniósł około 35–50%. Następna, istotna zmiana nastąpiła po 24 godzinach, gdy materiały utraciły około 65–80% swojej masy początkowej. Wydłużenie inkubacji materiałów z kolagenazą do 144 godzin nie spowodowało dodatkowych znaczących zmian w ich masie. Analizując utratę masy wszystkich badanych materiałów w danym momencie trwania eksperymentu można zauważyć mniejszy stopień degradacji materiału o najwyższym stężeniu cząstek krzemionki (KolChHA S3). Podobnie jak w przypadku degradacji w warunkach PBS, nieznaczne różnice w przebiegu degradacji enzymatycznej pomiędzy materiałem kontrolnym (KolChHA) a materiałami hybrydowymi może wskazywać na efektywne unieruchomienie sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych w strukturze hydrożelu.

Wnioski:

W oparciu o przeprowadzone badania można wskazać na następujące nieoczekiwane zalety otrzymanego materiału hybrydowego:

- a) **Stabilność strukturalna materiałów hybrydowych przy jednoczesnym zachowaniu wstrzykiwalnej postaci biopolimerowego zolu.** Wykonane badania fizykochemiczne (stopień pęcznienia, zwilżalność, degradacja) wykazały efektywność wbudowywania sfunkcjonalizowanych powierzchniowo cząstek krzemionkowych w sieć biopolimerową. Uzyskano po raz pierwszy materiał hybrydowy, w którym z siecią biopolimerową matrycy zostały trwale związane cząstki krzemionkowe, co w istotny sposób poprawia właściwości układu, w szczególności eliminuje problem potencjalnej separacji fazowej cząstek i ich niekontrolowanej dyfuzji do tkanek w warunkach *in vivo*. Badania reologiczne potwierdziły, że opracowane materiały hybrydowe można wytwarzać w postaci zolu i po dodaniu czynnika sieciującego, genipiny i inkubacji w temperaturze 37°C przekształcać w żel, co jest równoznaczne z możliwością ich zastosowania w postaci wstrzykiwanej w warunkach fizjologicznych. Fakt ten ma bardzo duże znaczenie biorąc pod uwagę potencjał aplikacyjny otrzymanych materiałów hybrydowych. Opracowane materiały hybrydowe mogą służyć jako wstrzykiwalne rusztowania, które po wprowadzeniu do ubytku w tkance w postaci lepkiego zolu będą żelować tam *in situ* w warunkach fizjologicznych z szybkością kontrolowaną składem, w szczególności ilością dodanej genipiny.
- b) **Bioaktywność materiałów hybrydowych.** Badania przeprowadzone w warunkach symulujących ludzkie osocze (SBF z ang. Simulated Body Fluid) potwierdziły bioaktywność materiałów hybrydowych: układy KolChHA S1 i KolChHA S2. W oparciu o dane literaturowe można oczekiwać właściwości bioaktywnych materiałów zawierających cząstki krzemionkowe posiadające

na swej powierzchni grupy silanolowe S-OH [(1) J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, A. Mignon, S. Van Vlierberghe, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, *Alginate-and gelatin-based bioactive photocross-linkable hybrid materials for bone tissue engineering*, Carbohydrate polymers, (2017), 157, 1714–1722; (2) K. Li, H. Sun, H. Sui, Y. Zhang, H. Liang, X. Wu, Q. Zhao, *Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering*, RSC Adv. 5 (23) (2015) 17541–17549; (3) L. Keller, A. Regiel-Futyr, M. Gimeno, S. Eap, G. Mendoza, V. Andreu, Q. Wagner, A. Kyzioł, V. Sebastian, G. Stochel, M. Arruebo and N. Benkirane-Jessel, *Chitosan-based nanocomposites for the repair of bone defects*, Nanomedicine 13 (7) (2017) 2231–2240], Nie jest zatem oczywistym, że takie właściwości będą posiadały materiały hybrydowe, do których wprowadzono cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowymi. Co więcej, należało się obawiać czy zastąpienie grup silanolowych grupami aminowymi nie ograniczy bioaktywności cząstek krzemionkowych.

- c) **Zaobserwowano znaczne przyspieszenie procesu biomineralizacji** (do 7 dni) w porównaniu do prezentowanych uprzednio badań, w których zastosowano niemodyfikowane cząstki krzemionkowe o analogicznym stężeniu. W publikacjach ((1) J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, Ł. Rodzik, M. Kozieł, M. Nowakowska, *Bioactive hydrogel-nanosilica hybrid materials: a potential injectable scaffold for bone tissue engineering*, Biomedical Materials, (2015), 10(1), 015020; (2) J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, Ł. Rodzik, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, *Novel hybrid materials for preparation of bone tissue engineering scaffolds*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, (2015), 26(9), 231) zaobserwowano tworzenie fazy mineralnej dopiero po 21 dniach inkubacji w SBF.
- d) **Zachowanie biokompatybilności, a także zdolności do wspierania adhezji, proliferacji oraz utrzymania fenotypu** komórek osteoblastycznych (MG-63). Przeprowadzone testy biologiczne *in vitro* wykazały, iż obecność trwale związanych z siecią polimerową sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych nie obniża biokompatybilności materiałów hybrydowych (w porównaniu do materiału kontrolnego KolChHA) a także ich zdolności do wspierania adhezji, proliferacji a także utrzymania fenotypu komórek osteoblastycznych (MG-63).

Odnosiniki:

1. R. Mishra, T. Bishop, I. L. Valerio, J. P. Fisher, D. Dean, The potential impact of bone tissue engineering in the clinic, *Regen. Med.* 11 (6) (2016) 571–587.
2. M. Liu, X. Zeng, Ch. Ma, H. Yi, Z. Ali, X. Mou, S. Li, Y. Deng, N. He, Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Bone Res.* 5 (2017) 17014.
3. J. Nourmohammadi, F. Roshanfar, M. Farokhi, M. H. Nazarpak, Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 76 (2017) 951–958.
4. H. Tan, K. G. Marra, Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Materials* 3 (3) (2010) 1746–1767.
5. K. Y. Lee, D. J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering, *Chem. Rev.* 101 (7) (2001) 1869–1879.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania hydrożelowego materiału hybrydowego, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) metodą zol-żel otrzymuje się cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowymi,
 - b) cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowymi otrzymane w etapie a) zawieszają się w zolu zawierającym mieszaninę roztworów kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego, korzystnie w stosunku wagowym kolagen : chitozan : kwas hialuronowy wynoszącym 50 : 40 : 10, przy czym korzystnie zawartość sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych w zolu wynosi nie mniej niż 1,9 mg/ml zolu, korzystnie od 1,9 do 3,8 mg/ml zolu.
 - c) uzyskaną w etapie b) zawiesinę poddaje się reakcji sieciowania genipiną.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie a) prowadzi się reakcję tetraetoksyilanu z aminopropylotrietoksyilanem w obecności wody i etanolu, przy czym reakcję prowadzi się w nadmiarze tetraetoksyilanu, korzystnie w stosunku objętościowym tetraetoksyilanu : aminopropylotrietoksyilanem wynoszącym 10 : 1, a następnie otrzymany materiał oddziela się, i ewentualnie płucze oraz poddaje suszeniu otrzymując biały proszek.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie b) zol otrzymuje się poprzez zmieszanie:
 - od 12 do 13 objętości roztworu kolagenu w kwasie solnym o stężeniu z zakresu od 3,5 do 4,1 mg/ml,
 - około 4 objętości roztworu chitozanu o stężeniu 1% wag. w 1% kwasie octowym,
 - około 1 objętości roztworu kwasu hialuronowego o stężeniu 1% wag. w 10x buforze fosforanowym PBS.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie b) otrzymany zol miesza się z wodną zawiesiną cząstek krzemionkowych sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi, korzystnie w ilości prowadzącej do uzyskania ich stężenia w zolu wynoszącego nie mniej niż 1,9 mg/ml, korzystnie od 1,9 do 3,8 mg/ml zolu.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie c) uzyskaną w etapie b) zawiesinę miesza się z roztworem genipiny w 10 x PBS, korzystnie w ilości prowadzącej do uzyskania jej stężenia w zawiesinie wynoszącego nie mniej niż 0,6 mg/ml zawiesiny.
6. Hydrożelowy materiał hybrydowy, **znamienny tym**, że zawiera hydrożel stanowiący mieszaninę kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego sieciowaną genipiną wraz z zawieszonymi w niej cząstkami krzemionkowymi sfunkcjonalizowanymi grupami aminowymi, przy czym zawartość sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych wynosi nie mniej niż 1,9 mg/ml, korzystnie od 1,9 do 3,8 mg/ml końcowego zolu, przy czym cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowymi są związane kowalencyjnie z polimerami tworzącymi hydrożel.
7. Hydrożelowy materiał hybrydowy według zastrz. 6, **znamienny tym**, że hydrożel stanowi mieszaninę roztworów kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego w stosunku wagowym kolagen : chitozan : kwas hialuronowy wynoszącym 50 : 40 : 10.
8. Hydrożelowy materiał hybrydowy według zastrz. 6 lub 7 lub otrzymany sposobem według zastrz. 1–5 do stosowania w medycynie regeneracyjnej, zwłaszcza w odbudowie tkanki kostnej.

Rysunki

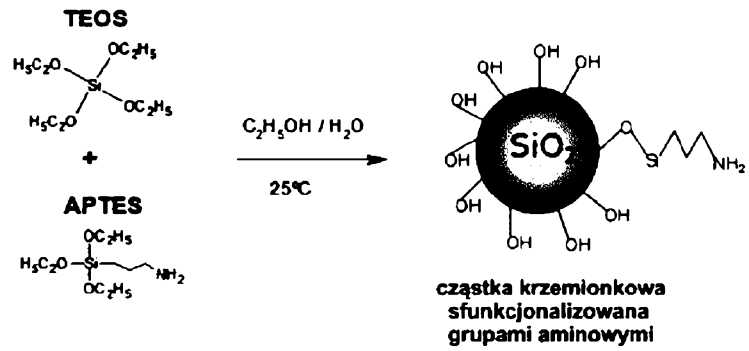


Fig. 1

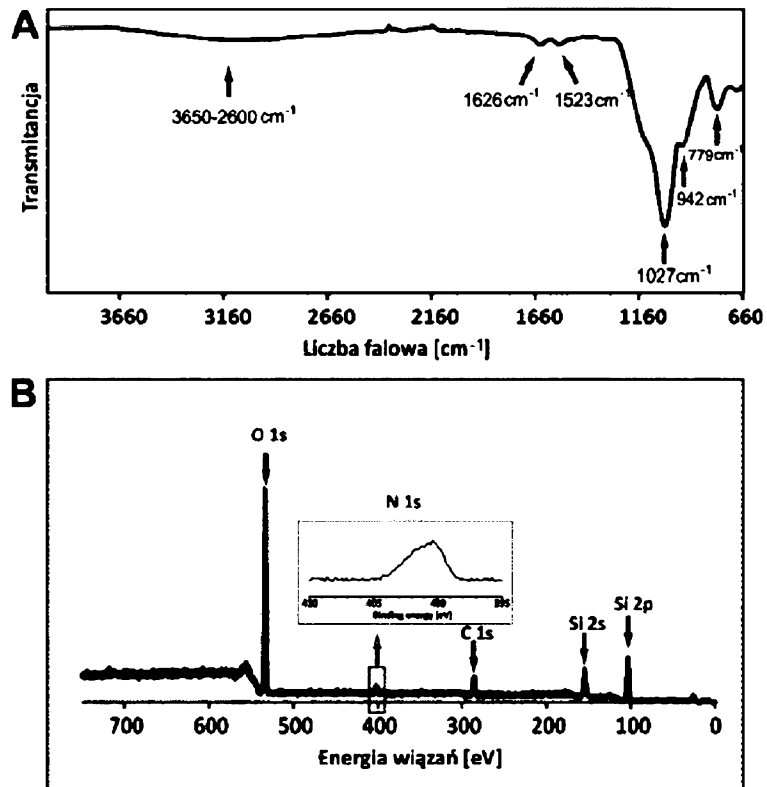


Fig. 2

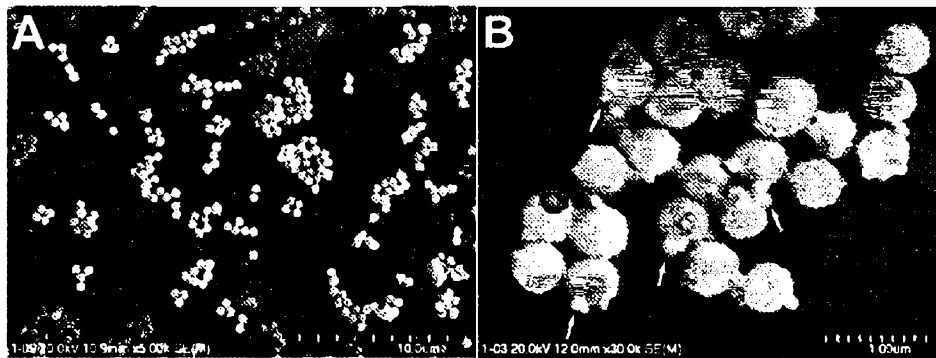


Fig. 3



Fig. 5

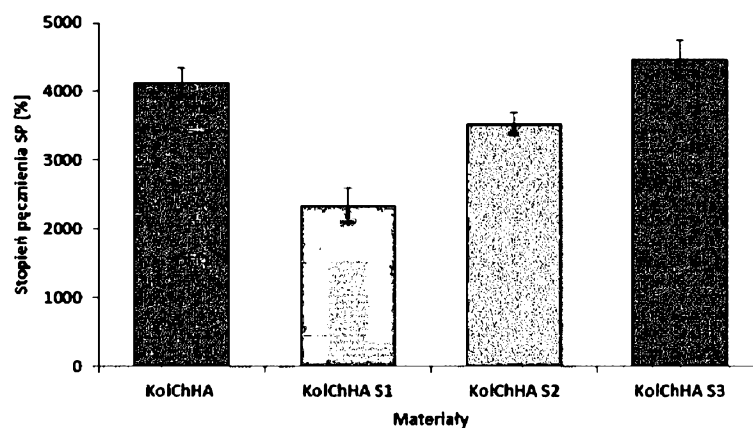


Fig. 6

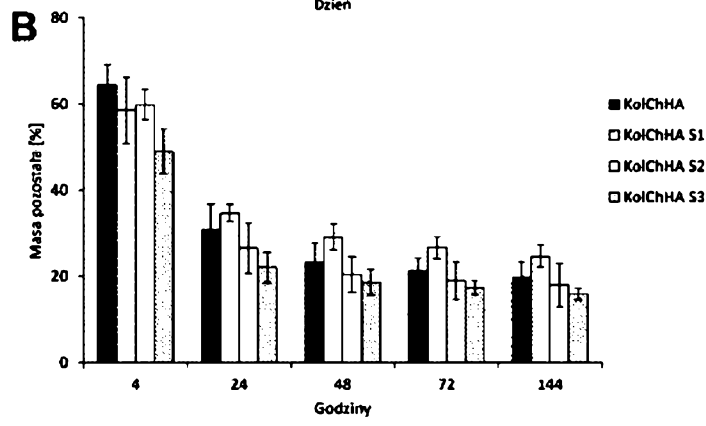
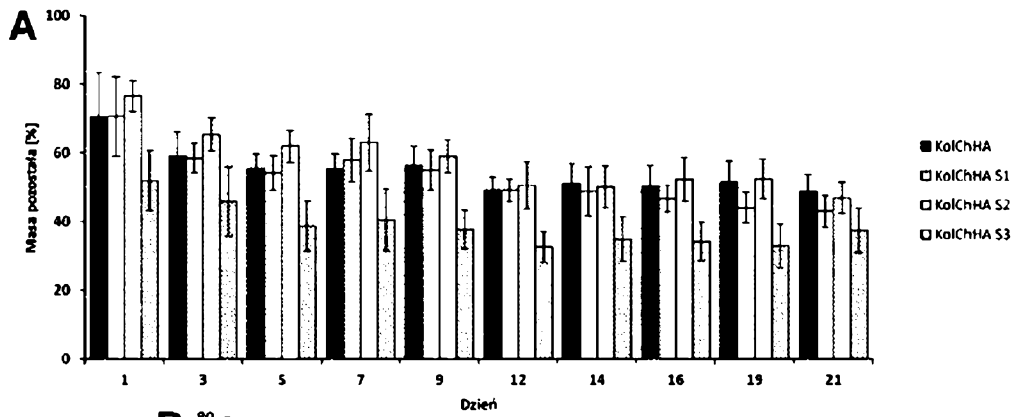


Fig. 7

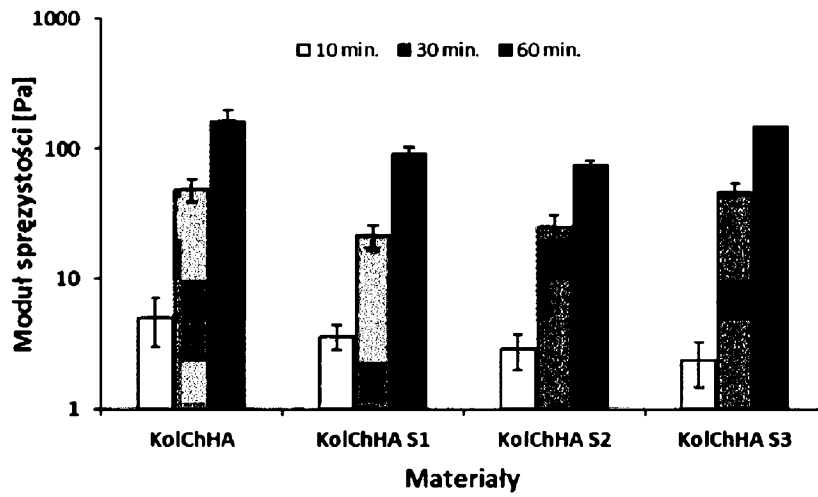


Fig. 8

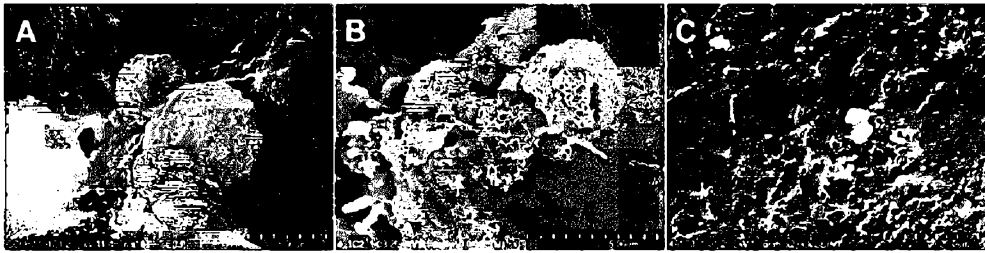


Fig. 9

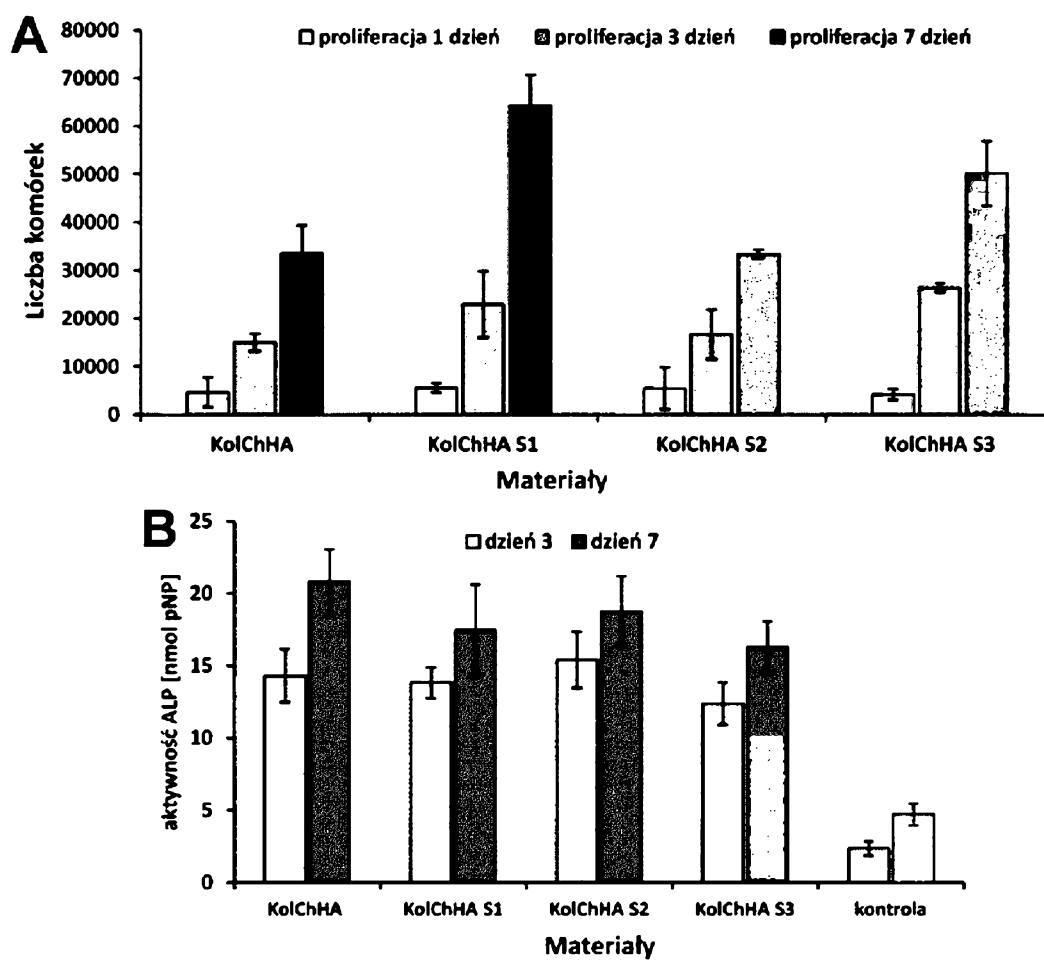


Fig. 10

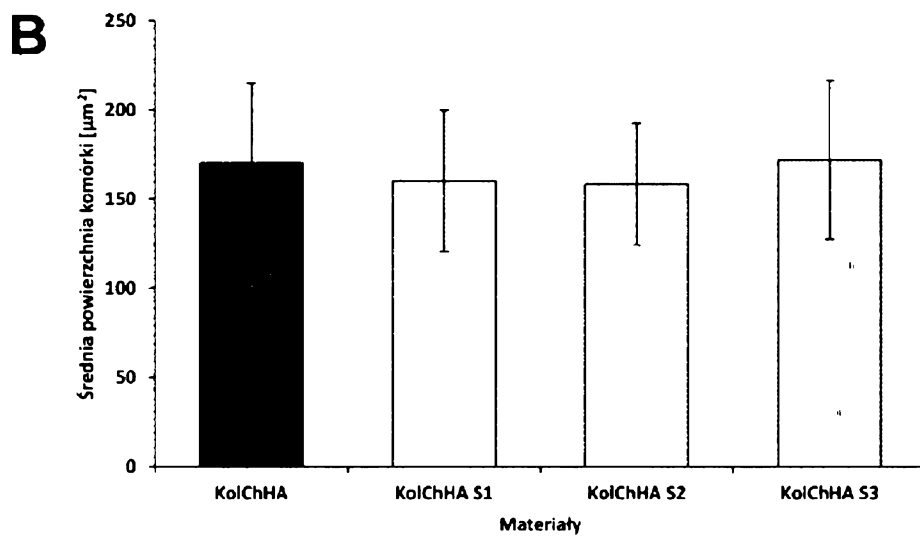
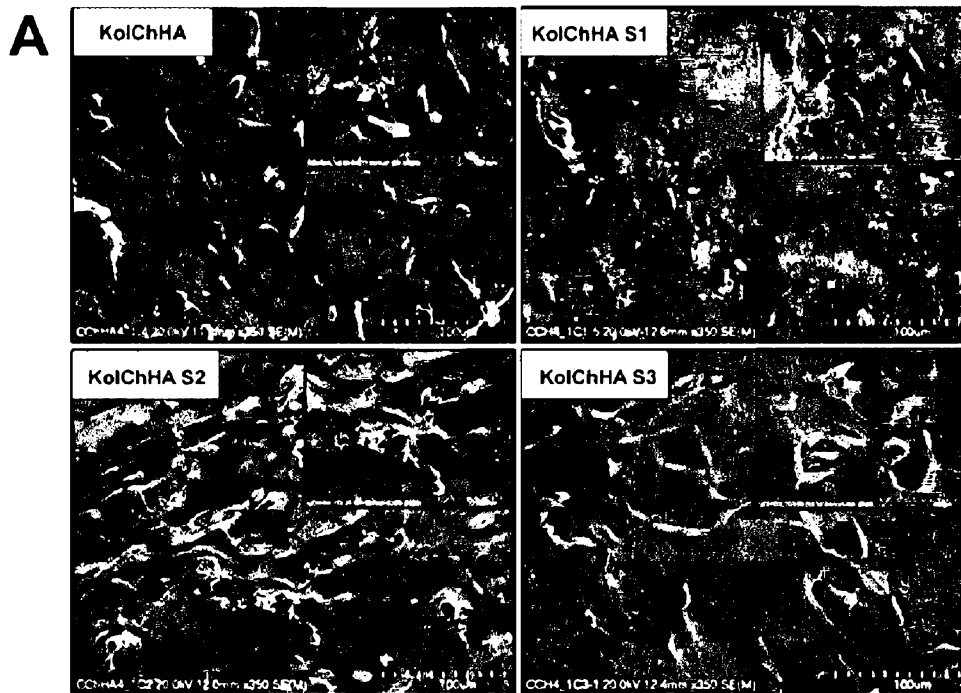


Fig. 11

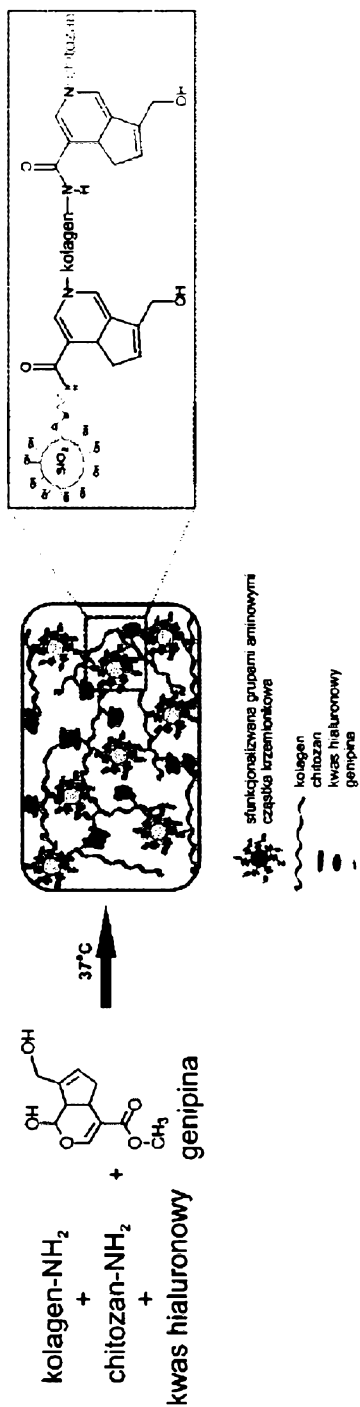


Fig. 4