



WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Uniwersytet Łódźki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Studia Doktoranckie Genetyki Molekularnej,
Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Małgorzata FERENC

Właściwości biologiczne funkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych typu SBA

The biological properties of functionalized SBA-type
mesoporous silica nanoparticles

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Bryszewskiej
w Katedrze Biofizyki Ogólnej UŁ

Łódź, 2016 r.

*Składam serdeczne podziękowania promotorowi,
Pani Profesor dr hab. Marii Bryszewskiej,
za opiekę, życzliwość, cenne uwagi merytoryczne,
stworzenie naukowej atmosfery
oraz warunków do prowadzenia badań.*

Najbliższym dziękuję za wiarę i wsparcie.

Badania wykonano we współpracy z:

**Euromed Research Institute, Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF)**

Fez, Maroko

Prof. Abdelkrim El Kadib



Přírodovědecká fakulta

Univerzity J. E. Purkyně

Uście nad Łabą, Czechy

Dr Jan Maly

UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM



Spis treści

Spis treści	4
Wykaz skrótów i symboli	6
1. Wstęp	8
1.1. Mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe	8
1.2. Zastosowanie nanocząsteczek krzemionkowych w naukach biomedycznych	10
2. Cel pracy.....	21
3. Materiały i metody.....	23
3.1. Materiały	23
3.1.1. Mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe typu SBA.....	23
3.1.2. Krzemionka amorficzna	25
3.1.3. Erytrocyty	27
3.1.4. Komórki linii prawidłowych	27
3.1.5. Komórki linii nowotworowych	27
3.1.6. Inne stosowane odczynniki	28
3.2. Metody	29
3.2.1. Hemoliza	29
3.2.1.1. Izolacja erytrocytów.....	29
3.2.1.2. Pomiar stopnia hemolizy wywołanej obecnością krzemionek	29
3.2.1.3. Wpływ albuminy surowicy człowieka HSA na stopień hemolizy	30
3.2.1.4. Adsorpcja hemoglobiny przez nanocząsteczki krzemionkowe.....	30
3.2.2. Cytotoksyczność	31
3.2.2.1. Hodowla komórek linii prawidłowych i nowotworowych	31
3.2.2.2. Ocena przeżywalności komórek metodą MTT	32
3.2.2.3. Ocena przeżywalności komórek metodą AlamarBlue	32
3.2.3. Oddziaływanie krzemionek z albuminą surowicy człowieka (HSA)	33
3.2.3.1. Gaszenie fluorescencji HSA.....	33
3.2.3.2. Gaszenie fluorescencji L-tryptofanu	33
3.2.3.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD).....	34
3.2.3.4. Adsorpcja albuminy surowicy człowieka przez nanocząsteczki krzemionkowe.....	34

3.2.4. Charakterystyka morfologii i powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych	35
3.2.4.1. Pomiary potencjału zeta techniką elektroforezy laserowej Dopplera (LDE).....	35
3.2.4.2. Badanie morfologii za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM)	36
3.2.4.3. Badanie morfologii za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM).....	36
3.2.4.4. Badanie powierzchni krzemionek.....	37
3.3. Analiza statystyczna wyników	37
4. Wyniki	38
4.1. Badanie hemotoksyczności nanocząsteczek krzemionkowych	38
4.1.1. Wpływ krzemionek na erytrocyty	38
4.1.2. Wychwyt hemoglobiny przez nanocząsteczki krzemionkowe	41
4.2. Badanie cytotoksyczności krzemionek <i>in vitro</i>	44
4.3. Interakcja nanocząsteczek krzemionkowych z albuminą surowicy człowieka	47
5. Dyskusja	62
6. Podsumowanie	73
7. Literatura.....	75
Streszczenie	85
Streszczenie w języku angielskim	88

Wykaz skrótów i symboli

AFM	<i>ang. atomic force microscopy</i> – mikroskopia sił atomowych
a-SiO ₂	krzemionka amroficzna
BET	<i>ang. Brunauer–Emmett–Teller theory</i> – izoterma Brunauera, Emmetta i Tellera
BJH	<i>ang. Barrett-Joyner-Halenda analysis</i> – metoda Barretta-Joynera-Halendy
CD	<i>ang. circular dichroism</i> – dichroizm kołowy;
CIS	<i>łac. cisplatinum</i> – cisplatyna;
CPT	<i>ang. camptothecin</i> – kamptotecyna
CTAB	<i>ang. cetyltrimethylammonium bromide</i> – bromek cetylotrimetyloamoniowy;
DDS	<i>ang. Drug Delivery Systems</i> – systemy dostarczania leków;
DMEM	<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> – medium Eagle'a modyfikowane przez Dulbecco
DNA	<i>ang. deoxyribonucleic acid</i> – kwas deoksyrybonukleinowy;
DOX	<i>łac. doxorubicinum</i> – doksorubicyna;
Dtxl	<i>łac. docetaxolum</i> – docetaksel;
FBS	<i>ang. fetal bovine serum</i> – płodowa surowica wołowa;
GFP	<i>ang. green fluorescent protein</i> – białko zielonej fluorescencji;
GSI	inhibitor γ-sekretazy;
Hb	hemoglobina;
HSA	<i>ang. human serum albumin</i> – albumina surowicy krwi człowieka;
HTC	<i>ang. haematocrit</i> – hematokryt;
K	kontrola;
LDE	<i>ang. laser Doppler electrophoresis</i> – Laserowa elektroforeza dopplerowska
MDR	<i>ang. multiple drug resistance</i> – oporność wielolekowa;

MSN	<i>ang. mesoporous silica nanoparticles</i> – mezoporowate nanocząsteczki krzemionki;
MTT	<i>ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> – sól błękitu tiazolowego;
n	liczba powtórzeń;
PBS	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej;
PDT	<i>ang. photodynamic therapy</i> – terapia fotodynamiczna;
PEG	glikol polietylenowy;
PEI	polietylenoimina;
SBA	<i>ang. Santa Barbara Amorphous</i> – materiał amorficzny typu Santa Barbara;
SBA-COOH	krzemionka mezoporowata z grupami karboksylowymi
SBA-NH ₂	krzemionka mezoporowata z grupami aminowymi
SBA-OH	krzemionka mezoporowata z grupami hydroksylowymi
SBA-SH	krzemionka mezoporowata z grupami tiolowymi
SD	<i>ang. standard deviation</i> – odchylenie standardowe
siRNA	<i>ang. small interfering RNA</i> – małe interferujące RNA;
TEM	<i>ang. transmission electron microscopy</i> – transmisyjna mikroskopia elektronowa
TGA	<i>ang. thermogravimetric analysis</i> – analiza termogravimetryczna
TPE	<i>ang. two-photon photodynamic therapy</i> – dwufotonowa terapia fotodynamiczna;

1. Wstęp

W naukach biomedycznych od dawna poszukuje się nanocząsteczek, które będą mogły stać się pomocne w terapii i leczeniu wielu chorób, takich jak nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne. Liczne materiały zostały już przebadane pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako systemów dostarczania leków (Drug Delivery Systems – DDS). Wymienić tu warto chociażby liposomy oraz dendrymery różnych typów. Kolejnymi nanocząsteczkami, na które w ostatnich latach zwrócono uwagę są mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe.

1.1. Mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe

Według Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) materiały porowate to ciała stałe, które posiadają pory, jamy, kanały lub szczeliny, których głębokość jest większa niż ich szerokość [1]. Należące do tej grupy uporządkowane materiały mezoporowate, w tym mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe, zwracają na siebie uwagę ze względu na ich potencjalne wykorzystanie w nanotechnologii, medycynie, a także chemii. Charakterystyczne mezopory to według klasyfikacji IUPAC pory o rozmiarach 2-50 nm [2]. Powierzchnia wewnętrzna porów sięga kilkuset m^2/g , co przekracza znacznie powierzchnię zewnętrzną nieporowatych cząsteczek. Co więcej, w ograniczonej powierzchni mezoporów występują silne oddziaływania. Wprowadzenie dodatkowych grup atomów na powierzchnie materiałów mezoporowatych pozwala modyfikować ich właściwości. Oznacza to, że porowate nanocząsteczki mają zdolność oddziaływania z jonami, atomami i innymi cząsteczkami w całej swojej objętości.

W ostatnich latach naukowcy koncentrowali się na otrzymywaniu mezoporowatych materiałów o ściśle określonej strukturze, a co za tym idzie i właściwościach. Przełom w badaniach nastąpił w roku 1990, kiedy Yanagisawa i współpracownicy dwoma niezależnymi metodami otrzymali, w oparciu o warstwowy

kanemit (uwodniony krzemian sodu $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), mezoporowate materiały krzemionkowe o regularnej, ściśle uporządkowanej strukturze wewnętrznej [3, 4]. W tym samym roku grupa naukowców z firmy Mobil Oil przygotowała krzemionkowy materiał MCM-41 bardzo podobny do tego otrzymanego przez japońskich naukowców [5]. Jednakże publikacja na temat tego materiału ukazała się dopiero w 1992 roku po uzyskaniu przez firmę patentu [6, 7]. Krzemionka MCM-41 posiada uporządkowaną strukturę o heksagonalnie ułożonych porach. Pomimo iż krzemionka ta charakteryzuje się amorficzną budową ścian, to posiada uporządkowaną i periodycznie powtarzającą się strukturę [8]. Sześć lat później, nanocząsteczki krzemionkowe o znacznie większych, od 4,6 do 30 nanometrów, heksagonalnie ułożonych porach zostały otrzymane na Uniwersytecie California w Santa Barbara [9]. Materiał ten został nazwany SBA-15 (Santa Barbara Amorphous No. 15) i różnił się od wcześniejszych nie tylko średnicą porów, ale także grubością ścian, a co za tym idzie także stabilnością [10].

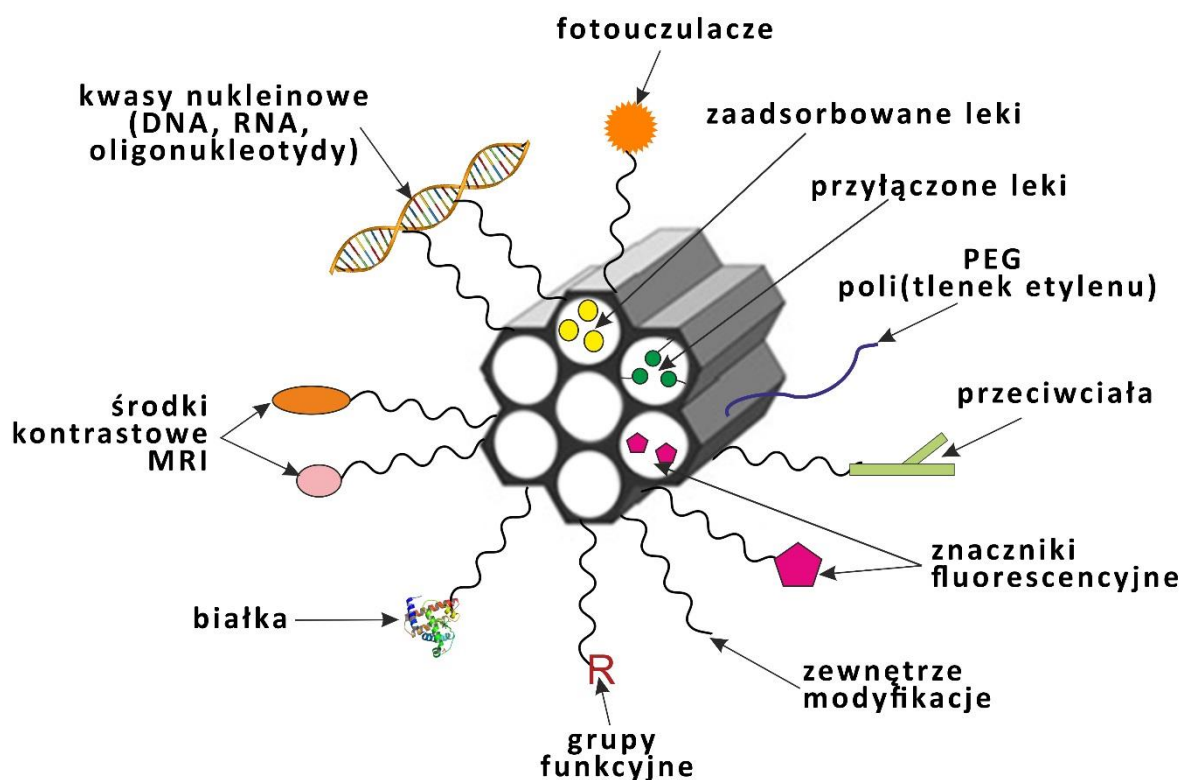
Unikatowe właściwości nanocząsteczek mezoporowatych, takie jak duża powierzchnia, duża objętość porów i ich uporządkowana struktura, zainspirowały naukowców do wytwarzania kolejnych materiałów. Od czasu pierwszych syntez, zostało otrzymanych i opisanych w literaturze [11-13], wiele rodzajów nanocząsteczek krzemionkowych o różnych właściwościach i zastosowaniach. Poza materiałami typu MCM oraz SBA wyróżnić można inne typy mezoporowatych krzemionek: SMS, MSU czy FDU różniące się przede wszystkim układem mezoporów, który determinuje właściwości [14, 15].

Olbrzymie zainteresowanie nanocząsteczkami krzemionkowymi takich dziedzin nauki i przemysłu, jak farmacja, nanotechnologia, medycyna, chemia czy elektrotechnika wynika przede wszystkim z dwóch nadzwyczajnych właściwości tych materiałów. Są to duża powierzchnia z licznymi grupami funkcyjnymi i uporządkowana struktura mezoporów. Materiały te są utworzone przez sieć krzemionkową z grupami silanolowymi na powierzchni zewnętrznej. Duża powierzchnia oznacza liczne grupy funkcyjne, a co za tym idzie, wysoką reaktywność w całej objętości cząsteczki. Co więcej, grupy te można poddawać modyfikacjom (podczas bądź po syntezie), aby nadać nanocząstkom krzemionkowym pożądane właściwości [16, 17]. Pory te charakteryzują się dużą objętością oraz ładownością, dzięki czemu mogą być wypełniane różnymi

cząsteczkami, na przykład lekami lub związkami aktywnymi biologicznie, w następstwie czego nanocząsteczki krzemionkowe mogą zostać użyte jako miejscowe systemy dostarczania [18]. Warto podkreślić, że jedna cząsteczka może posiadać bardzo liczne mezopory.

1.2. Zastosowanie nanocząsteczek krzemionkowych w naukach biomedycznych

Od czasu pierwszej syntezy nanocząsteczek mezoporowatych, pojawiła się ogromna liczba publikacji poświęconych możliwościom modyfikacji oraz różnorodnym zastosowaniom tych materiałów. Niepowtarzalna budowa i wynikające z niej unikatowe właściwości nanocząsteczek krzemionkowych sprawiły, że stały się one obiektem zainteresowania biologii, medycyny oraz dziedzin pokrewnych.



Rysunek 1. Modyfikacje oraz zastosowanie nanocząsteczek krzemionkowych w biologii i medycynie.

Najczęściej stosowaną metodą zamykania małych cząsteczek leków w porach krzemionek jest fizyczna adsorpcja z roztworu. Grupy silanolowe ($\equiv\text{Si-OH}$) obecne na powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych zazwyczaj służą jako miejsca adsorpcji. Ich liczba na powierzchni wynosi co najmniej 2-4 grupy/nm² [19]. Dzięki obecności grup funkcyjnych możliwa jest elektrostatyczna adsorpcja. Stopień adsorpcji może zostać zwiększony przez modyfikacje krzemionek i wprowadzenie innych grup funkcyjnych. Bardzo często stosowane są słabe kwasy i zasady, takie jak kwasy karboksylowe i aminy, w celu uzyskania dodatniego ładunku na powierzchni nanocząsteczek. Hydrofobowe leki są zazwyczaj adsorbowane z rozpuszczalników organicznych, a następnie próbki poddawane są suszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia rozpuszczalnika. Oczywiście średnica porów musi być dobrana odpowiednio do wielkości danego leku.

Słaba rozpuszczalność i niestabilność leków onkologicznych, a ponadto słaby ich wychwyt komórkowy, utrudniają efektywną terapię. Ze względu na częste występowanie silnych efektów ubocznych, ich zastosowanie terapeutyczne jest bardzo ograniczone. W związku z tym, rozwój systemów przenoszenia, które posiadają wysoką ładowność leków, mogą je ochraniać przed degradacją, ułatwić wychwyt komórkowy i przetransportować do ściśle określonych populacji komórek, jest niezbędny do klinicznego zastosowania wielu leków. Potencjał mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych (MSN) został zauważony i wielu naukowców podkreśliło, że szczególnie nadają się one do dostarczania małych leków, z dodatkową korzyścią przenoszenia dużej liczby słabo rozpuszczalnych cząsteczek [20]. Ponieważ ponad 40% substancji objętych badaniami przesiewowymi ma słabą rozpuszczalność w wodzie [21], mezoporowate krzemionki przyciągają uwagę jako potencjalne nośniki leków przeciwnowotworowych.

Do tej pory większość badań koncentrowała się na dostarczaniu leków przeciwnowotworowych, takich jak dokсорubicyna (DOX). Lee i wsp. dostarczali DOX do guzów i obserwowali apoptozę *ex vivo* w komórkach nowotworowych 48 godziny po iniekcji [22]. Hillegass i wsp. zastosowali krzemionki jako nośniki dokсорubicyny w leczeniu międzybłoniaka złośliwego (MM) [23]. Nanocząsteczki wypełnione DOX, bądź puste, wstrzykiwano podskórną, bezpośrednio do guza lub dootrzewnowo myszom i porównywano z podawaną podskórną i dożylną wolną DOX. Badania wykazały, że dostarczanie leku za pośrednictwem nanocząsteczek zwiększa wewnątrzkomórkowy

wychwyt dokсорubicyny, co zapewnia lepszą skuteczność terapeutyczną [23]. Wyższa skuteczność dokсорubicyny wprowadzonej do nanocząsteczek krzemionkowych została zaobserwowana także w przypadku terapii raka wątroby Hep-A-22 [24]. Meng i wsp. wykazali zwiększoną skuteczność po podaniu dożylnym dokсорubicyny dostarczanej przez powlekane PEG-PEI krzemionki o rozmiarze 50 nm [25]. Regresja guza była znacząco wyższa w stosunku do podawania wolnego leku. Co ważne, zamknięte cząsteczki DOX wykazywały zmniejszoną toksyczność ogólnoustrojową oraz niższą toksyczność dla wątroby i nerek.

Stosowane w terapii przeciwnowotworowej docetaksel (Dtxl) i jego preparat kliniczny Taxotere wywołują poważne negatywne skutki z powodu obecności surfaktantu oraz wysokiej toksyczności samego Dtxl. Li i wsp. wykazali zwiększoną aktywność przeciwnowotworową i niską toksyczność docetakselu zamkniętego w PEGylowanych krzemionkach o średnicy od 125 nm, używając mysiego modelu raka wątroby [26]. Lek podawano dożylnie co 4 dni, potem zwierzęta uśmiercano i analizowano ciężar guza.

Kolejnym lekiem o znakomitym, potwierdzonym testami klinicznymi, działaniu przeciwnowotworowym jest kamptotecyna (CPT). Jednakże również ten lek wykazuje słabą rozpuszczalność i liczne negatywne skutki podczas terapii. Z powodu tych wad zostały opracowane pochodne CPT: topotekan i irinotekan, obecnie stosowane w chemioterapii nowotworów. W badaniach zespołu Tamanoi mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe wypełnione kamptotecyną były wstrzykiwane do żyły ogonowej myszy z nowotworami piersi MCF-7. Wzrost nowotworu został skutecznie zredukowany w stosunku do podawania wolnego leku [27]. Te same kompleksy CPT-krzemionki były również podawane myszom z rakiem trzustki. Także w tym przypadku osiągnięto efekt supresyjny względem guza [28].

Reasumując, powyższe wyniki stanowią dowód, iż mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe są obiecującymi kandydatami na nośniki leków przeciwnowotworowych, zwiększając ich biodostępność, efektywność i zmniejszając efekty uboczne leków.

Nanocząsteczkowe dostarczanie leków przeciwnowotworowych jest bardzo atrakcyjne w teorii, jednakże bez dokładnej diagnostyki molekularnej poszczególnych pacjentów i koncentracji jedynie na konkretnych preparatach, terapia z wykorzystaniem

nanocząsteczek może nie być w pełni skuteczna. Potencjał takiej terapii może zostać rozszerzony poprzez integrację badań nad nowymi lekami z identyfikacją określonych szlaków molekularnych, którym podlegają komórki nowotworowe i w rezultacie prowadzą do rozwoju nowotworów [29]. Ostatnie badania wskazują, że możliwe jest użycie nanocząsteczek krzemionkowych do dostarczania substancji terapeutycznych skierowanych przeciwko specyficznym mechanizmom chorobowym, jednakże nie zostały one zaakceptowane do badań klinicznych ze względu na bardzo silne skutki uboczne [30]. Modyfikowane polietylenoiminą (PEI) krzemionki mezoporowate o rozmiarze od 250 do 350 nm z dodatkowymi modyfikacjami kwasem foliowym zostały użyte do dostarczenia inhibitora γ -sekreazy (GSI). Tak zmodyfikowane nanocząsteczki aplikowano podskórnym myszom z nowotworem piersi MDA-MB-231. Użyty GSI jest specyficznym inhibitorem onkogennego szlaku Notch. Szlak ten jest interesującym celem terapeutycznym w leczeniu raka ze względu na swój związek z agresywnymi, opornymi na leczenie nowotworami. Zainteresowanie tym szlakiem było przyczyną rozwoju nie tylko małowadzących leków, takich jak GSI, ale również przeciwciał terapeutycznych [31] i peptydów [32], z których kilka jest obecnie już w fazie badań klinicznych.

Bardzo obiecującymi lekami w terapii chorób nowotworowych, a także wirusa HIV, wydają się być preparaty oparte na DNA, mRNA czy siRNA. Terapia z ich udziałem może być realizowana jedynie z zastosowaniem odpowiednich nośników, ponieważ największymi wadami nagich leków (kwasów nukleinowych) są: słaba biodostępność, silny wychwyt komórkowy, zła stabilność biologiczna i krótki okres rozpadu. Kolejna przeszkoda w ich zastosowaniu to ujemny ładunek, który powoduje trudności z wprowadzaniem kwasów nukleinowych do komórek. Ponadto, wewnątrzkomórkowe procesy degradacji zastosowanych kwasów nukleinowych znacznie obniżają ich dostęp do jądra. Obecnie dostarczanie genów odbywa się z udziałem wektorów wirusowych, które muszą być stosowane z dużą ostrożnością [33]. Wprowadzanie niewirusowych systemów dostarczania genów do komórek odbywać się może za pomocą magnetofekcji, elektroporacji czy sonoporacji [34]. Każda z tych metod ma swoje ograniczenia.

Do tej pory najpowszechniej, jako potencjalne nośniki, były badane liposomy i różnego typu polimery. Jednak także mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe wykazują cechy, które mogą być korzystne dla dostarczania genów. Wąski rozkład wielkości porów może skutecznie ochraniać ładunek leku, gdy kwas nukleinowy znajduje się wewnątrz mezoporów, aż do momentu uwolnienia w komórce. Łatwość modyfikacji powierzchni krzemionek pozwala optymalizować adsorpcję i uwalnianie plazmidów [35]. Istnieje kilka doniesień skupiających się na adsorpcji plazmidów do wnętrza krzemionek i ich zastosowania w warunkach *in vitro*. Jednakże umieszczanie DNA lub RNA w mezoporach nie jest proste, a w wiele dotychczasowych badań na temat dostarczania genów w oparciu o kompleksy MSN-DNA opisuje tylko adsorpcję kwasów nukleinowych na zewnętrznej powierzchni kationowo zmodyfikowanych krzemionek.

Nel i wsp. [36, 37] adsorbowali siRNA i fragmenty DNA do powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych uprzednio pokrytych warstwą cząsteczek polietylenoiminy (PEI), która jest dobrze znanym agentem transfekcji genów. Jak oczekiwano, duża gęstość dodatnich ładunków jest korzystna dla procesu adsorpcji. Analogiczne krzemionki pokryte warstwą cząsteczek fosforoorganicznych miały znacznie mniejszą zdolność adsorpcji kwasu nukleinowego. Zaobserwowano skuteczną transfekcję *in vitro*, jednakże DNA nie były w pełni chronione przed nukleazami zawartymi w osoczu powodującymi degradację kwasów nukleinowych. Efektywna transfekcja genów w warunkach *in vitro* i *in vivo* została także zaobserwowana z użyciem jako nośników nieporowatych cząsteczek krzemionkowych [38, 39]. W celu zwiększenia adsorpcji genów do mezoporów mogą być stosowane dwa główne podejścia: optymalizacja warunków tego procesu i użycie krzemionek o większych rozmiarach porów. Gu i współpracownicy [40] badali adsorpcję krótkich fragmentów DNA łosia (20 do 250 par zasad, średnia długość 50 nm) do MSN o małych porach (średnica 2,7 nm) w obecności soli chaotropowych, przy czym średnica cząstek wynosiła około 70 nm, a ich rdzeń składał się z 10 nm superparamagnetycznych krystalitów tlenku żelaza. Adsorpcja DNA była znacznie wyższa niż liczba cząsteczek DNA zaadsorbowanych tylko do zewnętrznej powierzchni krzemionek. Takie dane mają bardzo dużą wartość badawczą biorąc pod uwagę, że zarówno DNA i krzemionka były naładowane ujemnie. Ta sama grupa badała również adsorpcję siRNA do mezoporów w tych samych

warunkach, które były używane do adsorpcji DNA łososia [41]. W tym przypadku praktycznie nie zaobserwowano adsorpcji siRNA. Naukowcy ci również udowodnili, że *in vitro* siRNA uwięziony wewnątrz mezoporów krzemionek pokrytych PEI jest skutecznie chroniony przed degradacją enzymatyczną. Solberg i Landry zademonstrowali, że lepsze korzyści w transporcie genów można uzyskać wykorzystując krzemionki o dużych mezoporach [42]. Wykorzystując sfunkcjonalizowane grupami aminowymi krzemionki o wewnętrznej średnicy porów 20 nm Gao i wsp. [43] byli w stanie zaadsorbować duży fragment plazmidowego DNA lucyferazy (5256 par zasad) z buforu PBS. Obecne na powierzchni nanocząsteczek grupy aminowe pozwoliły na interakcje z ujemnie naładowanym DNA. Równocześnie zaadsorbowany plazmid był chroniony przed degradacją enzymatyczną.

Kim i wsp. [44] wykazali, że wysoki poziom adsorpcji plazmidowego DNA lucyferazy, można osiągnąć używając monodispersyjnych nanocząsteczek krzemionkowych o rozmiarze 250 nm i średnicy mezoporów 23 nm. Te MSN pozwoliły na skuteczne dostarczanie genów w warunkach *in vitro* z udziałem plazmidów kodujących dwa różne białka: lucyferazę i GFP.

Badania dostarczania pojedynczych leków za pośrednictwem nanocząsteczek służą często jako dowód i weryfikacja pewnej koncepcji bądź postawionej hipotezy. Klinicznie istotnym alternatywnym podejściem w terapii przeciwnowotworowej, jest połączenie środków terapeutycznych ukierunkowanych na specyficzne mechanizmy przeżycia komórek nowotworowych z klasycznymi lekami przeciwnowotworowymi. Jednym z problemów, który może zostać rozwiązany przez równoczesne dostarczanie kilku związków, jest oporność wielolekowa nowotworu (Multiple drug resistance, MDR). Właśnie to zjawisko jest najczęstszą przyczyną niepowodzenia leczenia u pacjentów z nowotworami. System dostarczający leki (DDS) można zaprojektować tak, aby przezwyciężyć MDR poprzez skupienie się na zdolności celowanego dostarczania „ładunków” łączących obojętne mechanizmy MDR z chemioterapią. Niestety problem oporności wielolekowej jest wciąż daleki od rozwiązania [45], ale warto podkreślić, że wszelkie podejmowane próby dostarczania leków z wykorzystaniem nanocząsteczek (Nanoparticle mediated drug delivery, NPDD) są warte rozważenia.

Wykonano badania [46, 47], które wykorzystują możliwość równoczesnego dostarczania leków chemioterapeutycznych i siRNA ukierunkowanego na komórkowe mechanizmy przetrwania. Jedno z tych badań podaje przekonujące dowody, że mezoporowate krzemionki (MSN) dostarczające dokсорubicynę (DOX) i siRNA skierowany przeciwko mRNA kodującemu białka Bcl-2 w lekoopornych komórkach nowotworowych zwiększają cytotoksyczność DOX blisko 132-krotnie (w porównaniu do wolnego leku) i znacząco zwiększają apoptozę [46]. Niestety badania te nie zawierają eksperymentów na zwierzętach, potwierdzających otrzymane wyniki *in vivo*. Drugie ze wspomnianych badań opisuje zupełnie nowy, kompleksowy, wielofunkcyjny, oparty o nanocząsteczki krzemionkowe system dostarczania leków składający się z: MSN, leku przeciwnowotworowego (DOX lub cisplatyna CIS), supresora lekooporności lub jego brak (siRNA skierowany przeciwko transporterowi MRP1 lub białku BCL2 mRNA) oraz czynnik celowanej terapii przeciwnowotworowej (peptyd LHRH) [47]. Taki system wykazał znamienne zwiększoną aktywność przeciwnowotworową w warunkach *in vitro*. Ponadto stężenie IC50 mieszaniny wolnych leków było 6 razy wyższe w porównaniu do stężenia mieszaniny CIS i DOX dostarczanej przez MSN. Do badań biodystrybucji wykorzystano system NPDD (Nanoparticle mediated drug delivery) znakowany fluoroforem i śledzono jego wędrówkę po wziewnym i dożylnym podaniu myszom z nowotworem płuc A549 za pomocą obrazowania optycznego *in vivo*. Po 3 godzinach wziewnym podaniu, 73% intensywności fluorescencji zaobserwowano w płucach, po podaniu dożylnym – w wątrobie.

Inne podejście do pokonywania oporności wielolekowej z wykorzystaniem nanocząsteczek krzemionkowych przedstawił Huang i wsp. Dokсорubicynę skoniugowano z pH-wrażliwym łącznikiem (linkerem) w celu zapewnienia ciągłego i proporcjonalnego uwalniania DOX [48]. Jako modelu badawczego użyto ludzkich komórek mięsaka macicy MES-SA opornych na dokсорubicynę, Werapamil – bloker kanałów wapniowych, krzemionki z dokсорubicyną i MSN z DOX i hydrazonem. Okazało się, że w takim układzie DOX była lepiej wychwytywana przez komórki oraz miała lepszą wewnątrzkomórkową retencję.

Inna modyfikacja wrażliwych na pH mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych będących w stanie przewyżżyć oporność wielolekową została

opublikowana przez He i wsp. [49]. Ich kompozytowe nanocząsteczki składały się z nośników MSN zawierających porotwórczy bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) i z DOX. Zastosowany środek powierzchniowo czynny służył do pokonywania oporności wielolekowej i zwiększania skuteczności leków. Cytotoksyczność takich cząstek badano na liniach komórkowych MCF-7 i MCF-7/ADR i stwierdzono, że MSN/DOX/CTAB zwiększały wewnątrzkomórkowy dostęp MCF-7/ADR do DOX. Zaobserwowano także znacznie wyższą wydajność leku w warunkach *in vitro* dla obydwu linii komórkowych w stosunku do wolnego leku.

Interesującą alternatywą dla chemio- i radioterapii może być terapia fotodynamiczna (PTD) [50]. Podstawą PDT jest stosowanie fotouczulacza, który po napromienianiu określoną długością fali prowadzi do generowania cytotoksycznych rodników i śmierci komórek. Gary-Bobo i wsp. stosowali modyfikowane mannozą mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe w dwufotonowej terapii fotodynamicznej (TPE) ukierunkowanej na guza [51]. W pracy tej autorzy zastosowali MSN do ukierunkowania fotouczulacza na nowotwór i aby zwiększyć wydajność TPE, ponieważ w jednej nanocząstce może zostać umieszczona duża liczba fotosensybilizatorów [50]. Cząstki o średnicy hydrodynamicznej 118 nm były skutecznie wprowadzane *in vitro* do dwóch linii komórkowych raka piersi: MCF-7 i MDA-MB-231. Po napromienowaniu osiągnięto pomyślny wynik terapeutyczny (efekt był wyższy dla MDA-MB-231). Najbardziej efektywne wchłanianie i najwyższą śmierć komórek uzyskano dla trzeciej linii komórkowej raka okrężnicy HCT-116. Badania *in vivo* przeprowadzono na myszach z rakiem okrężnicy [50]. Wyniki wykazały znaczne zmniejszenie (o około 70%) wagi guza u myszy leczonych w porównaniu z grupą kontrolną myszy otrzymujących roztwór soli fizjologicznej.

Gary-Bobo i wsp. kontynuowali swoją pracę i w badaniach *in vitro* połączyli terapię fotodynamiczną z podawaniem leków w celu zwiększenia ich skuteczności terapeutycznej w komórkach retinoblastomy (siatkówczaka) [52]. Połączenie, dzięki nanocząstkom krzemionkowym, PDT z dostarczaniem kamptotecyny wykazało zwiększony efekt terapeutyczny w porównaniu z samą terapią fotodynamiczną. Wykazano także, że dwufotonowa PDT była lepsza od wzbudzania jedną długością fali.

Qiao i wsp. Z sukcesem połączyli terapię fotodynamiczną i obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego wykorzystując luminescencyjne nanocząsteczki krzemionkowe [53].

Powyższe badania wykorzystujące krzemionki MSN w terapii fotodynamicznej pokazują, że jest to minimalnie inwazyjna metoda terapeutyczna, która pozwala zwiększyć efekty leczenia oraz zmniejszyć efekty uboczne. Dzięki nanocząstkom krzemionkowym możliwe jest połączenie tej metody z dostarczaniem leków i użyciem różnych technik obrazowania. Takie połączenie to bardzo obiecujące podejście teradiagnostyczne łączące diagnostykę z równoczesną terapią.

Nagromadzenie nanocząsteczek terapeutycznych lub diagnostycznych w okolicy guza można osiągnąć przez aktywną terapię docelową z użyciem charakterystycznych ligandów. Pozwalają one na specyficzne pobieranie nanocząsteczek przez komórki, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia leku oraz utrzymanie leku w obrębie guza [54]. W dotychczasowych badaniach aktywnego transportu z wykorzystaniem mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych wykorzystywano jako ligand kwas foliowy. Kwas foliowy i jego zredukowane odpowiedniki są wymagane w komórkach eukariotycznych w biosyntezie nukleotydów. Co za tym idzie, przeżycie i proliferacja komórek są zależne od zdolności komórki do pozyskiwania tej witaminy. Komórkowy wychwyt folianów jest ułatwiany albo przez niskie powinowactwo zredukowanych nośników kwasu foliowego, które są obecne w prawie wszystkich komórkach organizmu albo przez wysokie powinowactwo sprzężonego z powierzchniowymi receptorami dla folianów, glikozylfosfatydilinozytolu, który wykazuje bardzo ograniczoną dystrybucję [55, 56].

Mamaeva i wsp. wykazali ukierunkowane działanie krzemionek modyfikowanych kwasem foliowym zarówno podczas podawania bezpośrednio do komórek rakowych, jak i aplikowania dożylnego [57]. Wspomniane już badania Lu i wsp. [28], wykazały doskonałe wyniki dla kwasu foliowego sprzężonego z krzemionkami połączonymi z kamptotecyną w hamowaniu wzrostu guza trzustki dla dwóch heteroprzeszczepów komórek.

Gary-Bobo i wsp. wykazali skuteczne ukierunkowanie i zwiększoną skuteczność terapeutyczną *in vivo* po dożylnym podaniu mezoporowatych nanocząsteczek

krzemionkowych sfunkcjonalizowanych mannozą ukierunkowanych na laktynę obecną w komórkach nowotworowych [50]. Tsai i wsp. pokazali skuteczne kierowanie *in vitro* z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych Trastuzumab (Herceptin) skierowanych na glikoproteiny HER2/neu [58]. Herceptin-MSN zostały specyficznym ukierunkowane na linie komórkowe z nadekspresją receptora HER2. Zhu i wsp. stosowali specyficzne względem komórek nowotworowych aptamery DNA jako ligandy kierujące i wykazali dobrą specyficzność ukierunkowania [59], co pokazuje, że również takie podejście może okazać się skuteczne.

Odpowiednio opracowane krzemionki umożliwiające skuteczne kierowanie leków do komórek nowotworowych, z równoczesną kontrolą stężenia ligandu, mają szansę stać się nową metodą leczenia. Pomocna jest identyfikacja specyficznych biomarkerów nowotworowych oraz określenie konkretnych celów w komórkach, które mają zostać osiągnięte przez nanocząsteczki [60]. Ciekawym podejściem, choć skomplikowanym, które zostało już zaprezentowane jest wykorzystanie nanocząsteczek uaktywniających biologiczne szlaki komunikacyjne, aby wzmocnić osiąganie komórek nowotworowych [61].

Możliwość dostarczania leków z wykorzystaniem mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych przyciąga uwagę także naukowców z innych dziedzin medycyny. Zostały już opracowane obiecujące preparaty cementu kostnego na bazie krzemionek jako nośników antybiotyków, w celu zapobiegania zapaleniu kości i szpiku podczas operacji wymiany biodra [62]. Badania wykazały znacznie dłuższą trwałość i zwiększoną efektywność uwalniania leku.

Mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe mogą również przyczynić się do ułatwienia oczyszczenia organizmu z radionuklidów, a konkretnie radioaktywnego cezu. Otrzymywane w tym celu cząsteczki reprezentują nową klasę sorbentów – samoorganizujących się warstw ze wsparciem mezoporów (Self Assembled Monolayers on Mesoporous Supports SAMMS), opatentowanych już w 2001 roku [63]. Badania na szczurach wykazały, że takie układy są tak dobre jak błękit pruski, jedyny zatwierdzony przez FDA (Agencja Żywności i Leków, ang. Food and Drug Administration) lek do usuwania z organizmu zaabsorbowanego talu i radioaktywnego cezu [64]. Dalsza optymalizacja SAMMS ma możliwość przewyższyć skuteczność błękitu pruskiego.

Mezoporowate krzemionki były także w stanie skutecznie dostarczyć *in vivo* gen PDGF-B u szczurów z kontuzją ścięgna Achillesa, która to kontuzja powoduje długotrwałą niepełnosprawność u ludzi, a proces regeneracji przebiega bardzo powoli. MSN niosące gen przyspieszyły gojenie tego ścięgna [65].

Istnieje wiele typów nanocząsteczek krzemionkowych o obiecujących zastosowaniach, takich jak na przykład dostarczanie leków skierowanych przeciwko patogenom wywołującym powszechne choroby (gruźlica, zapalenie wątroby, HIV etc.). Leki na takie schorzenia muszą być dostarczone do określonych przedziałów wewnątrzkomórkowych lub określonych typów komórek i pomimo przeprowadzonych, z pozytywnym wynikiem, badań *in vitro* transportujące te leki MSN wciąż oczekują na badania na zwierzętach [66].

Elastyczność mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych ukazuje je jako interesujące systemy podawania leków. Wydajność biologiczna i możliwości zastosowania krzemionek wykazano w licznych badaniach przedklinicznych, niektóre z nich przedstawiono powyżej. Jednakże systematyczne testowanie biodystrybucji, bezpieczeństwa i skuteczności terapeutycznej w różnych wariantach i z wykorzystaniem różnych metod i nanocząsteczek są nadal bardzo potrzebne, aby doprowadzić technologię opartą na MSN do testów klinicznych i wdrożenia.

2. Cel pracy

Pomimo dynamicznego rozwoju nauk biologicznych i medycznych wciąż na wiele chorób nie znaleziono skutecznych terapii. Niewystarczająca skuteczność dotychczas znanych leków i sposobów leczenia skłania do poszukiwania nowych rodzajów terapii. Wydaje się, że dostarczanie leków za pośrednictwem nanocząsteczek może być jednym z efektywnych sposobów leczenia nowotworów, wirusa HIV, a także innych chorób. Dlatego wciąż poszukuje się nanocząsteczek, które będą w stanie dostarczyć lek i uwolnić go w miejscu docelowym a same nie będą miały negatywnego wpływu na organizm. Wraz z rozwojem nanotechnologii i pokładaniem w niej dużych nadziei, w ostatnich latach syntezowanych jest wiele różnych typów nanocząsteczek. Jednymi z nich są mezoporowate krzemionki.

Nanocząsteczki krzemionkowe są materiałami stosunkowo nowymi (pierwsza synteza 1992 rok). Ich potencjalne zastosowanie w medycynie jako nośników leków wynika z ich unikatowych właściwości takich jak: regularna wielkość cząstek, jednolita i regularna wielkość porów, duża powierzchnia zewnętrzna, duża objętość porów, bioaktywność (liczne grupy funkcyjne na powierzchni wewnętrznej i zewnętrznej). W związku z tym, jak najszybsza charakterystyka i poznanie właściwości tych nanocząsteczek jest niezbędne do określenia ich potencjalnego biomedycznego zastosowania.

Celem pracy była możliwie szeroka charakterystyka funkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych typu SBA. Otwarte pozostawało pytanie, jak przyłączenie różnych grup funkcyjnych na powierzchni krzemionek, a także modyfikacje organiczne przyczyniają się do zmian właściwości mezoporowatych nanocząsteczek w stosunku do krzemionki amorficznej.

W pracy badano cztery rodzaje funkcjonalizowanych mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych: krzemionki z grupami hydroksylowymi (SBA-OH), krzemionki z grupami tiolowymi (SBA-SH), krzemionki z grupami aminowymi (SBA-NH₂) oraz krzemionki z grupami karboksylowymi (SBA-COOH). Dodatkowo, otrzymane wyniki porównywano z wynikami dla krzemionki amorficznej (a-SiO₂).

Postawiony cel zrealizowano poprzez scharakteryzowanie morfologii krzemionek, ich powierzchni i potencjału zeta, zbadanie ich toksyczności względem erytrocytów oraz wybranych linii komórkowych prawidłowych i nowotworowych, a także określenie oddziaływań pomiędzy tymi nanocząsteczkami a białkiem.

Badane przeze mnie krzemionki są materiałami nowymi, niedostępnymi komercyjnie i do tej pory nie poddanymi badaniom.

3. Materiały i metody

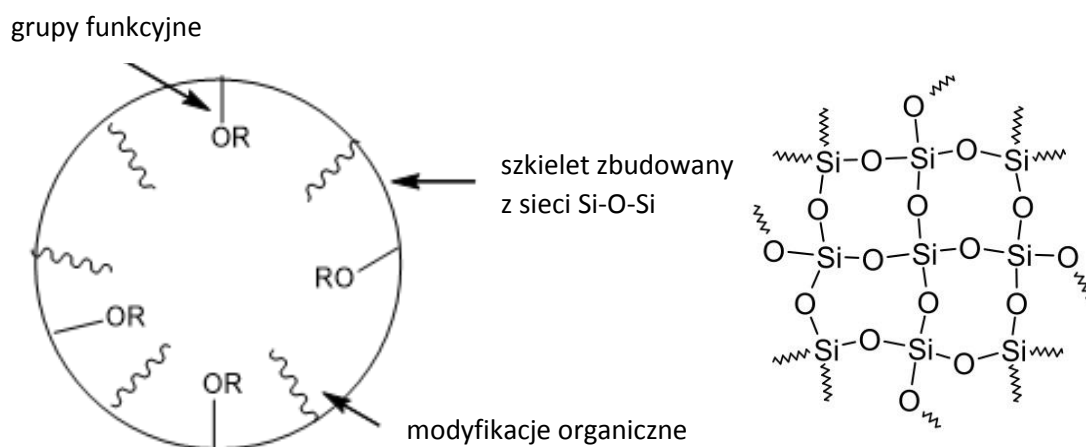
3.1. Materiały

3.1.1. Mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe typu SBA

W pracy badano cztery mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe typu SBA:

- SBA-OH – natywna krzemionka, posiadająca na swojej powierzchni jedynie grupy hydroksylowe
- SBA-SH – krzemionka modyfikowana merkaptopropylotrietoksylanem, posiadająca na powierzchni dodatkowe grupy tiolowe
- SBA-NH₂ – krzemionka modyfikowana aminopropylotrietoksylanem, z dodatkowymi grupami aminowymi na powierzchni
- SBA-COOH – krzemionka modyfikowana karboksyetylenosilanotriołem sodu, na powierzchni, której są obecne grupy karboksylowe

Podstawę budowy krzemionek mezoporowatych stanowi dwutlenek krzemu tworzący przestrzenną sieć. W takiej strukturze atomy krzemu połączone są z czterema atomami tlenu, natomiast atomy tlenu z dwoma atomami krzemu. Sieć taka może być łatwo modyfikowana i formowana podczas syntezy. Do jej powierzchni mogą być przyłączane grupy funkcyjne, a także modyfikacje organiczne – tak jak ma to miejsce w przypadku wymienionych wyżej mezoporowatych nanocząsteczek.



Rysunek 2. Schemat budowy nanocząsteczek krzemionkowych oraz sieci tworzonej przez dwutlenek krzemu.

Mezoporowate krzemionki zostały pozyskane do badań od Abdelkrima El Kadiba z Euro-med Research Center, Engineering Division, Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF) w Fezie (Maroko). Synteza materiałów mezoporowatych została szczegółowo opisana w publikacji: „*Haemolytic activity and cellular toxicity of SBA-15-type silicas: Elucidating the role of the mesostructure, surface functionality and linker length*” opublikowanej w Journal of Materials Chemistry B [67].

Przeprowadzona przez zespół El Kadiba charakterystyka otrzymanych nanocząsteczek krzemionkowych z użyciem standardowych technik, w tym: spektroskopii CP/MAS ^{13}C - i ^{29}Si -NMR (Solid-state Cross-Polarization Magic Angle Spinning Carbon-13 and Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance) wykazała, iż grupy organiczno-funkcjonalne zostały zamocowane w sieci krzemionkowej. Wyniki te zostały również porównane z danymi literaturowymi [68-71].

Analiza rentgenograficzna krzemionek typu SBA wykazała odbicia charakterystyczne dla materiałów nanostrukturalnych o sześciokątnej symetrii. Kształt izotermy adsorpcji azotu wykazywał gwałtowny wzrost zaadsorbowanej objętości przy niskich wartościach ciśnienia względnego P/P_0 . Wskazuje to na jednorodność wytworzonych porów o profilu typowym dla uporządkowanych materiałów mezoporowatych. Powierzchnia właściwa krzemionek wynosi od 444 do 623 m^2/g . Mezoporowata objętość waha się od 0,37 do 0,77 cm^3/g , natomiast średnica porów wynosi od 2,36 nm dla natywnej krzemionki SBA-OH do 6,3 nm dla SBA-COOH.

Dalsza charakterystyka otrzymanych materiałów wykorzystująca fizysorpcję azotu (badanie ich oddziaływania z azotem) pozwoliła określić polarność powierzchni krzemionek. Wartości parametru C_{BET} odzwierciedlają entalpię adsorpcji cząsteczek azotu na powierzchni modyfikowanych materiałów o podobnych charakterystykach porowatości. Dla materiałów modyfikowanych organicznie wykazano znaczące zmniejszenie hydrofilowości [68, 69]. Niefunkcjonalizowana, bogata w grupy hydroksylowe krzemionka SBA-OH wykazała wartość $C_{\text{BET}}=140$, co potwierdza wysoką polarność powierzchni tej krzemionki [72, 73]. Dla kontrastu krzemionki sfunkcjonalizowane wykazują wartość C_{BET} mniejszą niż 140, co jest wynikiem zużycia polarnych i hydroksylowych grup Si-OH w celu przyłączenia grup organicznych.

Zespół El Kadiba oszacował również ilość organicznego obładowania za pomocą termicznej analizy grawimetrycznej (TGA). Otrzymano wartości w zakresie od 3,19 mmol/g dla SBA-NH₂ do 4,03 mmol/g dla SBA-SH.

Charakterystyka badanych nanocząsteczek krzemionkowych znajduje się w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka badanych nanocząsteczek krzemionkowych.

	Metody badania i parametry					
	Izotermy sorpcji azotu				Analiza termogravimetryczna (TGA)	Laserowa elektroforeza dopplerowska (LDE)
	S_{BET} (m ² /g)	V_{mesop} (cm ³ /g)	Średnica porów (nm)	C_{BET} (nm)	Obładowanie organiczne (mmol/g)	ζ mV
SBA-OH	623	0.37	2.36	140	0	-15.0
SBA-SH	444	0.50	2.90	94	4.03	-14.1
SBA-NH₂	604	0.77	3.12	88	3.19	-5.6
SBA-COOH	453	0.70	6.30	71	3.88	-13.2
a-SiO₂	200±25	-	-	-	0	-19.2

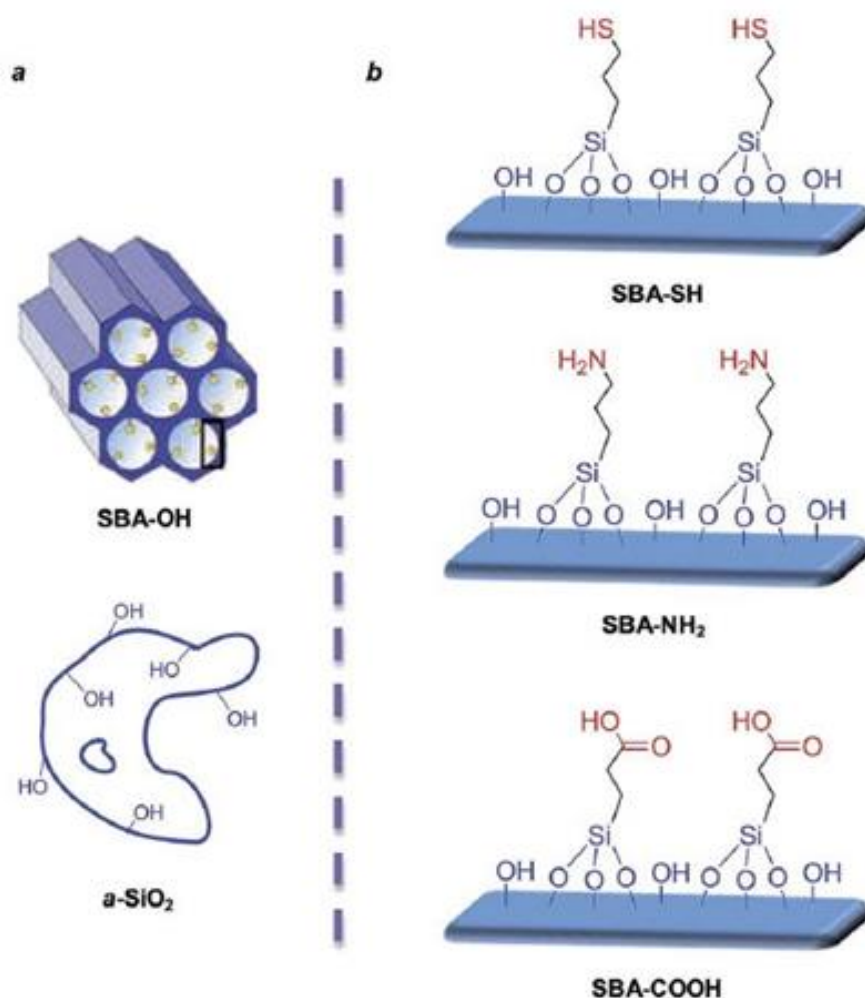
S_{BET} – powierzchnia właściwa; V_{mesop} – objętość mezoporowata; C_{BET} – polarność powierzchni; ζ – potencjał zeta

3.1.2. Krzemionka amorficzna

Wykorzystana w badaniach krzemionka amorficzna została zamówiona w firmie Sigma Chemical Co., USA. Przeciętna wielkość cząsteczek tej krzemionki wynosi ~0,2-0,3 μm , natomiast jej masa molowa 60,08 g/mol.

Krzemionka amorficzna będąca ditlenkiem krzemu posiada porowatą strukturę i doskonale rozwiniętą powierzchnię właściwą. Dla używanej w doświadczeniach krzemionki wynosi ona 200±25 m²/g. Te właściwości mają ogromne znaczenie

w procesie wymiany jonowej, jak i adsorpcji [74, 75]. Struktura oraz powierzchnia krzemionki amorficznej zostały doskonale zbadane i opisane, jednakże określenie kształtu powierzchni krzemionki nie jest jednoznacznie możliwe. Powierzchnia ta zbudowana jest z grup silanowych ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) oraz siloksanowych ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$). Te pierwsze w obrębie cząsteczki krzemionki mogą występować w różnych formach: jako grupy izolowane (wolne), sąsiadujące (mostkowe), gdzie dwie wolne grupy silanowe należące do dwóch różnych atomów krzemu połączone są wiązaniem wodorowym oraz jako bliźniacze, które zawierają dwie grupy hydroksylowe połączone wspólnym atomem krzemu [76].



Rysunek 3. Schematyczna ilustracja materiałów badanych w niniejszej pracy.

(a) Mezoporowata krzemionka SBA-OH oraz krzemionka amorficzna (a-SiO₂).

(b) Mezoporowate krzemionki typu SBA z różnymi grupami funkcjonalnymi na powierzchni i modyfikacjami organicznymi [67 - zmodyfikowano].

Liczne grupy silanolowe krzemionki amorficznej są centrami reaktywnymi umożliwiającymi modyfikację powierzchni cząsteczki. Warunkują one również hydrofilowy charakter krzemionki [77]. Co więcej obecność tych grup nadaje powierzchni krzemionki kwasowy charakter, ponieważ istnieje możliwość odszczepienia protonu ($\equiv\text{Si}-\text{O}- + \text{H}^+$) [78]. Przewaga grup siloksanowych oznacza zaś hydrofobowość materiału. Zatem krzemionka amorficzna posiada charakter hydrofilowo-hydrofobowy, w zależności od budowy jej powierzchni.

3.1.3. Erytrocyty

Materiałem wyjściowym do badań była krew pełna zakupiona w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi, pobierana od zdrowych dawców na 3% cytrynian sodu.

3.1.4. Komórki linii prawidłowych

B14 – (Chinese hamster fibroblasts) – fibroblasty chomika chińskiego. Są to komórki adherentne. Oznacza to, że komórki te przyklejają się do powierzchni naczynia hodowlanego, dzielą się i rosną w postaci pojedynczej warstwy. Komórki B14 były hodowane w medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium).

3.1.5. Komórki linii nowotworowych

HL60 – (Human promyelocytic leukemia cells) – linia ludzkich komórek ostrej białaczki szpikowej zakupiona w firmie ATCC (USA).

1301 – (T cell lymphoblastic leukemia cells) – linia ludzkiej ostrej białaczki komórek T otrzymana z Banca Biologica e Cell Factory (Włochy).

HL60 oraz 1301 to komórki zawiesinowe hodowane w medium RPMI.

BRL – (Buffalo rat liver) – szczurze komórki raka wątroby, komórki adherentne, hodowane w medium DMEM.

3.1.6. Inne stosowane odczynniki

W pracy doświadczalnej wykorzystano następujące odczynniki:

- DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), medium hodowlane, BIOCHROM, Berlin, Niemcy;
- DMSO, dimetylosulfotlenek, Sigma Aldrich, St. Louis, USA;
- FBS, płodowa surowica wołowa, Sigma Aldrich, St. Louis, USA;
- HSA, albumina surowicy krwi człowieka, Sigma, St. Louis, USA;
- MTT, sól błękitu tiazolowego (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Sigma Aldrich, St. Louis, USA;
- PBS, zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (w tabletkach), Sigma Aldrich, St. Louis, USA;
- Penicylina, Sigma Aldrich, St. Louis, USA;
- Resazuryna, (7-hydroksy-3H-fenoksyazyno-3-on-10-tlenku sól sodowa), Sigma, St. Louis, USA;
- RPMI-1640, (Roswell Park Memorial Institute medium), medium hodowlane, Sigma, St. Louis, USA;
- Streptomycyna, Sigma Aldrich, St. Louis, USA;
- Trypsyna, BIOCHROM, Berlin, Niemcy.
- L- Tryptofan, Sigma Aldrich, St. Louis, USA;

3.2. Metody

3.2.1. Hemoliza

3.2.1.1. Izolacja erytrocytów

Świeża, pozyskana z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi krew została odwirowywana na wirówce Sigma 3K15 z szybkością 4000 obr./min przez 5 minut w temperaturze 4°C. Erytrocyty trzykrotnie przemywano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej pH=7,4 (PBS, Sigma). Po każdym wirowaniu oddzielano warstwę leukocytów i supernatant. Procedura wykonywana była w temperaturze pokojowej 21-24°C z wykorzystaniem roztworów schłodzonych do 4°C.

3.2.1.2. Pomiar stopnia hemolizy wywołanej obecnością krzemionek

Po otrzymaniu czystych erytrocytów określano ich hematokryt (HTC) i do dalszych badań przygotowano zawiesinę czerwonych krwinek w PBS o hematokrycie 2%. Tak przygotowaną zawiesinę komórek poddawano działaniu mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych dodawanych do układu w stężeniach końcowych od 50 µg/ml do 1000 µg/ml. Wszystkie próbki inkubowano przez 2, 8, 16 i 24 godziny w temperaturze 37°C. Roztwór wyjściowy stanowiły krzemionki rozpuszczone w PBS i poddane działaniu ultradźwięków. Jako kontrolę negatywną (brak hemolizy) wykorzystano erytrocyty zawieszone w PBS, natomiast jako odnośnik – kontrolę pozytywną (100% hemolizy) – erytrocyty poddane działaniu wody podwójnie destylowanej.

Po okresie inkubacji zawiesinę odwirowywano (4000 obr./min, 5 min., 4°C). Do pomiarów delikatnie pobierano 1 ml supernatantu. Ilość uwolnionej hemoglobiny oznaczano spektrofotometrycznie (Spektrofotometr V-650; Jasco, Japonia) mierząc absorbancję próbki przy długości fali równej 540 nm.

Stopień hemolizy obliczano według następującego wzoru:

$$\text{stopień hemolizy [\%]} = \frac{A}{A_{100\%}} \times 100\%$$

gdzie:

A – absorbancja próbki poddanej działaniu krzemionek

A_{100%} – absorbancja kontroli pozytywnej

3.2.1.3. Wpływ albuminy surowicy człowieka HSA na stopień hemolizy

Do przygotowanej zawiesiny erytrocytów o HTC równym 2% dodawano roztwór albuminy surowicy człowieka (HSA) w stężeniu 2 mg/ml. Zawiesiny erytrocytów z dodatkiem HSA traktowano roztworami krzemionek mezoporowatych w stężeniu 750 µg/ml oraz 1000 µg/ml. Stężenie albuminy zostało dobrane tak, aby zachować ten sam stosunek HTC do stężenia HSA jak we krwi w warunkach fizjologicznych. Kontrolę pozytywną stanowiły erytrocyty zawieszone w PBS z dodatkiem HSA. Próbki były inkubowane przez 2 i 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie wyznaczano stopień hemolizy w taki sam sposób, jak to zostało opisane w rozdziale 3.2.1.2.

3.2.1.4. Adsorpcja hemoglobiny przez nanocząsteczki krzemionkowe

Przeprowadzono również badanie wychwytu (adsorpcji) cząsteczek hemoglobiny przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe. Do badań używano hemoglobinę (Hb) w stężeniu 0,2 mg/ml. Do roztworów Hb w PBS dodawano różne stężenia nanocząsteczek krzemionkowych (od 100 do 1000 µg/ml). Kontrolę stanowił roztwór Hb nietraktowany krzemionkami (hemoglobina w stężeniu 0,2 mg/ml). Tak przygotowane próbki były inkubowane przez 2, 8 i 24 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji próbki zostały odwirowane. Do pomiarów delikatnie pobierano 1 ml supernatantu i wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali równej 540 nm. Stężenie hemoglobiny w supernatancie oznaczano na podstawie uprzednio wykreślonej krzywej kalibracyjnej.

Zawartość hemoglobiny w roztworze traktowanym nanocząsteczkami krzemionkowymi w PBS została obliczona według następującego wzoru:

$$\% Hb = \frac{A}{A_{100\%}} \times 100\%$$

gdzie:

A – absorbancja próbki poddanej działaniu krzemionek

A_{100%} – absorbancja kontroli pozytywnej (Hb w PBS)

Aby obliczyć procentową wartość adsorpcji hemoglobiny użyto wzoru:

$$\% Adsorpcji = 100\% - \% Hb$$

3.2.2. Cytotoksyczność

3.2.2.1. Hodowla komórek linii prawidłowych i nowotworowych

B14, BRL. Hodowla komórek B14 oraz BRL prowadzona była klasyczną techniką jednowarstwowych kultur komórkowych. Komórki hodowano w kompletnym medium DMEM (BIOCHROM) zawierającym 2mmol/l L-glutaminy, 100 µg/ml streptomycyny (Sigma Aldrich) z dodatkiem 10% inaktywowanej płodowej surowicy wołowej (FBS) (Sigma Aldrich) oraz 100 jednostek na ml penicyliny (Sigma Aldrich). Hodowle komórek prowadzono

w inkubatorze (Brunswick) z dopływem 5% CO₂, w temperaturze 37°C, w warunkach 98% wilgotności. Komórki pobierano bezpośrednio z naczynia hodowlanego, liczono z wykorzystaniem 0,2% błękitu trypanu za pomocą automatycznego licznika komórek – Countess Automated Cell Counter (Life Technologies), a następnie przygotowywano zawiesiny wykorzystywane w dalszych pracach.

1301, HL60. Hodowla 1301 oraz HL60 prowadzona była klasyczną techniką hodowli zawieszinowych kultur komórkowych. Komórki hodowano w kompletnym medium RPMI (Sigma Aldrich) wzbogaconym L-glutaminą w stężeniu 2 mmol/l, 100 µg/ml streptomycyną (Sigma Aldrich) oraz z dodatkiem 100 jednostek na ml penicyliny (Sigma) i 10% inaktywowanej płodowej surowicy wołowej FBS (Sigma). Hodowle

komórek prowadzono w inkubatorze (Brunswick) z dopływem 5% CO₂, w temperaturze 37°C, w warunkach 98% wilgotności. Komórki pobierano bezpośrednio z naczynia hodowlanego, liczono z użyciem 0,2% błękitu trypanu za pomocą automatycznego licznika komórek – Countess Automated Cell Counter (Life Technologies). Po zliczeniu komórek sporządzano zawiesiny używane do dalszych etapów badań.

3.2.2.2. Ocena przeżywalności komórek metodą MTT

Komórki linii B14 uwalniano metodą trypsynizacji z naczynia hodowlanego i przygotowywano zawiesinę o stężeniu 1x10⁶ komórek/ml. Komórki pasażowano na płytki 96-dołkowe płaskodenne (Nunc, Dania) w liczbie 1x10⁵ komórek na dołek i inkubowano przez 24 godziny w warunkach opisanych w rozdziale 3.2.2.1.

W celu oceny żywotności, komórki traktowano krzemionkami mezoporowatymi oraz krzemionką amorficzną w stężeniach od 50 do 100 µg/ml. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT), których żywotność przyjmowano jako 100%.

Komórki inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze z dopływem 5% CO₂, w temperaturze 37°C, w warunkach 98% wilgotności. Po wyznaczonym czasie inkubacji do wszystkich dołków płytek dodawano roztwór MTT w PBS (5 mg/ml). Tak przygotowane próbki inkubowano przez kolejne 4 godziny. Po tym czasie do dołków dodawano po 200 µl DMSO. Pomiaru absorbancji dokonywano przy użyciu czytnika płytek Multi-mode Microplate Reader, Synergy 4 (BioTek, USA), przy długości fali równej 570 nm.

3.2.2.3. Ocena przeżywalności komórek metodą AlamarBlue

Komórki pobierano z naczynia hodowlanego, liczono i przygotowywano ich zawiesinę o stężeniu 1x10⁶ komórek/ml. Komórki pasażowano na czarne płytki 96-dołkowe w liczbie 1x10⁵ komórek na dołek.

W celu oceny żywotności, komórki poddawano działaniu mezoporowatych krzemionek oraz krzemionki amorficznej w różnych stężeniach (od 50 do 1000 µg/ml).

Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane krzemionkami (NT), których żywotność przyjmowano jako 100%.

Komórki potraktowane krzemionkami inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze z dopływem 5% CO₂, w temperaturze 37°C, w warunkach 98% wilgotności. Po wyznaczonym czasie inkubacji na płytki dodawano roztwór resazuryny, tak aby jej końcowe stężenie w dołku wynosiło 12,5 µg/ml i inkubowano przez 2 godziny. Następnie mierzono fluorescencję za pomocą spektrofлуorymetru Fluoroscanner Ascent FL przy długości fali wzbudzenia 530 nm i długości fali emisji 590 nm.

3.2.3. Oddziaływanie krzemionek z albuminą surowicy człowieka (HSA)

3.2.3.1. *Gaszenie fluorescencji HSA*

Widma fluorescencji zostały wykreślone za pomocą spektrofлуorymetru PerkinElmer LS55 (UK). Albumina surowicy człowieka została rozpuszczona w PBS w stężeniu 100 µg/ml. Długość fali wzbudzenia wynosiła 290 nm, a widma emisji HSA zostały wykreślone w zakresie 300-440 nm. Szczeliny wzbudzenia i emisji wynosiły odpowiednio 10 i 5 nm. Następnie do próbek dodawano wzrastające stężenia (od 50 do 1250 µg/ml) nanocząsteczek krzemionkowych i ponownie wykreślano widma emisji. Fluorescencja nieustannie mieszanych próbek była mierzona w 37°C w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm.

3.2.3.2. *Gaszenie fluorescencji L-tryptofanu*

Fluorescencja wolnego L-tryptofanu została zmierzona na spektrofлуorymetrze PerkinElmer LS55. L-tryptofan został rozpuszczony w PBS w końcowym stężeniu 100 µg/ml. Widma emisji zostały wykreślone w zakresie 300-440 nm, przy długości fali wzbudzenia równej 280 nm. Do tak przygotowanych próbek dodawano wzrastające stężenie nanocząsteczek krzemionkowych i ponownie wykreślano widma fluorescencji. Badania prowadzono w temperaturze 37°C, w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm ciągle mieszając.

3.2.3.3. *Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)*

Widma dichroizmu kołowego albuminy surowicy człowieka (HSA) zostały wykreślone za pomocą spektrometru CD Jasco J-815 (Japonia) z wykorzystaniem kuwety o długości drogi optycznej 0,5 cm. Albumina została rozpuszczona w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) o pH 7.4. Pomiary prowadzone były w temperaturze 37°C. Stężenie białka w kuwecie wynosiło 100 µg/ml. Następnie do kuwety dodawano nanocząsteczki krzemionkowe we wzrastającym stężeniu (od 50 do 1250 µg/ml). Eksperyment został przeprowadzony przy stałym dopływie azotu N₂. Widma wykreślono w przedziale od 200 nm do 260 nm i przedstawiono na wykresach jako zależność eliptyczności molarnej (θ) od długości fali. Zmiany w kształcie widm świadczą o zachodzeniu zmian w drugorzędowej strukturze albuminy pod wpływem oddziaływania z nanocząsteczkami krzemionkowymi.

Ponadto, za pomocą oprogramowania dostarczonego przez firmę Jasco (CDNN) i metody dekonwolucji CD obliczono skład poszczególnych struktur drugorzędowych albuminy surowicy człowieka oraz ich zmiany ilościowe pod wpływem nanocząsteczek krzemionkowych.

3.2.3.4. *Adsorpcja albuminy surowicy człowieka przez nanocząsteczki krzemionkowe*

Do badań adsorpcji albuminy surowicy człowieka wybrano stężenie HSA równe 0,3 mg/ml. Albuminę rozpuszczano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej i do tak przygotowanych próbek dodawano różne stężenia krzemionek (od 100 do 1000 µg/ml). Kontrolę (100% białka) stanowił roztwór albuminy w PBS o stężeniu 0,3 mg/ml. Wszystkie próbki były inkubowane w 37°C przez 2, 8 lub 24 godziny. Po tym czasie próbki odwirowano i do pomiarów delikatnie pobierano 1 ml supernatantu. Absorbancja była mierzona przy długości fali 280 nm w kwarcowych kuwetach o długości drogi optycznej 1 cm. Stężenie albuminy surowicy człowieka zostało określone na podstawie uprzednio wykreślonej krzywej kalibracyjnej białka.

Zwartość albuminy w próbkach po traktowaniu nanocząsteczkami krzemionkowymi została obliczona z następującego równania:

$$\% HSA = \frac{A}{A_{100\%}} \times 100\%$$

gdzie:

A – absorbanca próbek zawierających krzemionki

A_{100%} – absorbanca próbki kontrolnej – albuminy w PBS (c = 0,3 mg/ml)

Do obliczenia procentu zaadsorbowanej albuminy użyto wzoru:

$$\% Adsorpcji = 100\% - \% HSA$$

3.2.4. Charakterystyka morfologii i powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych

3.2.4.1. *Pomiary potencjału zeta techniką elektroforezy laserowej Dopplera (LDE)*

Potencjał Zeta jest potencjałem elektrycznym, który występuje na granicy faz (adsorpcyjnej i dyfuzyjnej) cząsteczki. Potencjał zeta nanocząsteczek został zmierzony za pomocą urządzenia Zetasizer Nano-ZS, Malvern (Wielka Brytania). Do pomiarów ruchliwości elektroforetycznej pod wpływem przyłożonego napięcia, wykorzystującej elektroforezę laserową Dopplera zastosowano kapilarne kuwety firmy Malvern (DTS1061). Nanocząsteczki krzemionkowe były przygotowywane i mierzone w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS, pH 7.4, temperatura 37°C). Przed przygotowaniem próbek bufor został dwukrotnie przefiltrowany za pomocą filtra o rozmiarach porów 100 nm.

Wartości potencjału zeta zostały obliczone bezpośrednio z równania Helmholtza-Smoluchowskiego z użyciem oprogramowania firmy Malvern [79] i wyrażone w mV. Wielkość potencjału zeta pozwala wnioskować o stabilności dyspersji, tj. o zdolności do utrzymywania cząstek w formie dyspersji koloidalnej. Niestabilne dyspersje ulegają procesom sedymentacji lub koagulacji w czasie. Przyjmuje się, że dyspersja jest stabilna wtedy, gdy wartość bezwzględna potencjału Zeta jest większa od 30 mV [80].

3.2.4.2. Badanie morfologii za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM)

Morfologia mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych została zbadana za pomocą elektronowego mikroskopu transmisyjnego. Krzemionki przygotowywano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS, pH 7.4). Następnie 10 µl roztworu nanocząsteczek umieszczano na miedzianej płytce i pozostawiano na 10 minut, po czym osuszano za pomocą papieru. Próbkę były barwione 2% octanem uranylu przez 2 minuty a następnie pozostawione do wyschnięcia. Zdjęcia zostały wykonane za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEOL- 10 (Japonia).

Obserwacje z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego zostały przeprowadzone w Pracowni Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

3.2.4.3. Badanie morfologii za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM)

Badania z wykorzystaniem mikroskopu AFM Integra Probe Nanolaboratory (NT-MDT, Rosja) przeprowadzałam podczas moich staży na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Uściu nad Łabą (Czechy). Doświadczenia z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych dostarczyły informacji na temat morfologii nanocząsteczek krzemionkowych. Krzemionki były rozpuszczane w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS, pH 7.4), następnie około 5 µl roztworu nanoszono na czystą powierzchnię miki (muskowit o składzie $KAl_2[AlSi_3O_{10}(OH)_2]$). Materiał ten będący zasadowym glinokrzemianem jest szeroko stosowany w badaniach AFM jako podłoże o atomowo gładkiej powierzchni. Naniesiona próbka była pozostawiana do wyschnięcia, co zapewniało jej unieruchomienie i następnie umieszczana w mikroskopie. Pomiaru były prowadzone w powietrzu.

Sonda, którą stanowiło ostrze była umieszczona na końcu sprężynującej dźwigni (tzw. beleczki) o długości 100–200 µm. Dźwignia ta podczas pracy mikroskopu ugięła się i skanowała powierzchnię próbki. Badania były prowadzone w trybie częściowego kontaktu (semicontact mode) – belka z igłą była wprowadzana w drgania i cyklicznie uderzała w skanowaną powierzchnię. Zastosowano ostrza HA_NC ETALON (NT-MDT, Rosja) o częstotliwości rezonansowej 280 kHz, stałej sile nacisku 11,5 N/m oraz

wysokości 10 μm). Wyniki były analizowane z wykorzystaniem oprogramowania Scanning Probe Image Processor software (Image Metrology A/S, Dania).

3.2.4.4. Badanie powierzchni krzemionek

Rozmiar porów, całkowita ich objętość oraz powierzchnia właściwa nanocząsteczek krzemionkowych została określona na podstawie izoterm adsorpcji-desorpcji azotu (Quantachrome Instruments, NOVA 3200, Floryda, USA) przy użyciu oprogramowania NovaWin.

Próbki zostały odgazowane w temperaturze 150°C przez kilka godzin, po tym czasie wykreślono izotermy adsorpcji i desorpcji azotu (N_2 o czystości 99,999%, Linde). Do oznaczania całkowitej powierzchni użyto pięć punktów Brunauera-Emmetta-Tellera (BET), natomiast do oszacowania objętości porów zastosowano 40 punktów modelu Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Każda z próbek została zmierzona pięć razy.

3.3. Analiza statystyczna wyników

Badania normalności rozkładu dokonywano z użyciem testu Shapiro-Wilka. W celu porównania wyników uzyskanych dla dwóch grup:

- w przypadku występowania rozkładu normalnego stosowano test-t
- w przypadku braku normalności rozkładu wykorzystano test U Mann-Whitneya (Mann-Whitney Rank Sum Test).

4. Wyniki

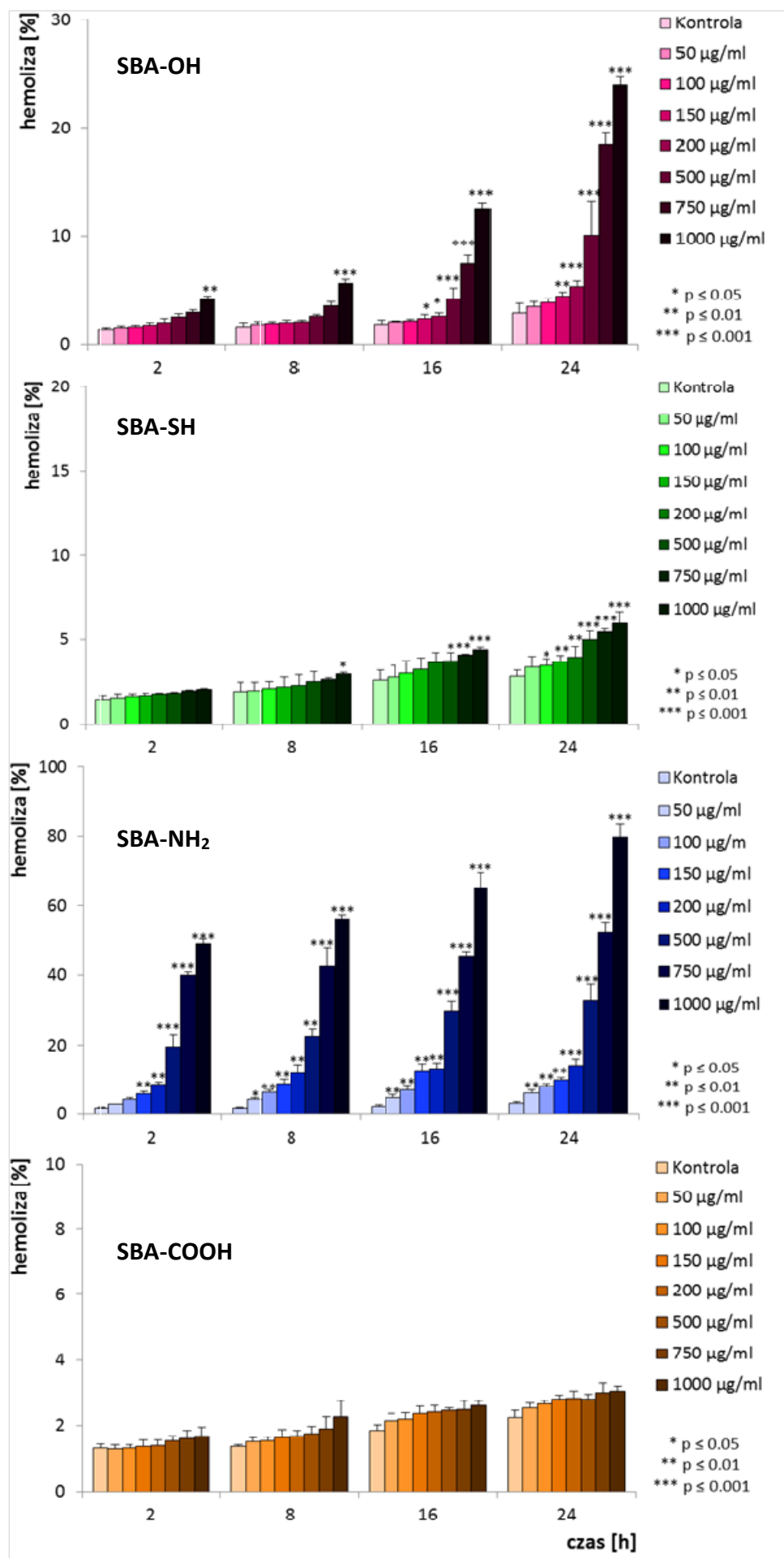
4.1. Badanie hemotoksyczności nanocząsteczek krzemionkowych

4.1.1. Wpływ krzemionek na erytrocyty

Stopień hemolizy indukowanej przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe był zależny od czasu inkubacji oraz użytego stężenia badanych materiałów (Wykres 1). Wszystkie krzemionki w stężeniach do 200 µg/ml były nietoksyczne względem erytrocytów. Z badanych krzemionek nanocząsteczki SBA-NH₂ były najbardziej hemotoksyczne. Już po dwugodzinnej inkubacji dla stężenia 1000 µg/ml zaobserwowano 50% hemolizę, podczas gdy dla pozostałych krzemionek w najwyższym stężeniu po 2 h hemoliza wynosiła odpowiednio: 5% dla SBA-OH, 2,7% - SBA-NH₂, 2,5% - SBA-SH i 1,5% - SBA-COOH.

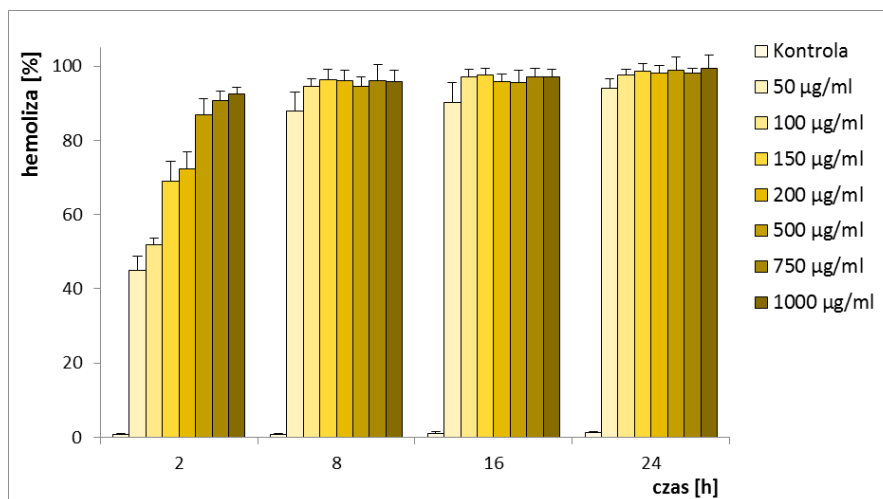
Po 24 h inkubacji nanocząsteczki SBA-NH₂ powodowały 80% hemolizę, SBA-OH – 25%, SBA-SH – 6%, SBA-COOH – 3%. Nanocząsteczki z grupami tiolowymi (-SH) oraz karboksylowymi (-COOH) w całym zakresie stężeń wywoływały tylko nieznaczną hemolizę.

Badanie aktywności hemolitycznej krzemionki amorficznej wykazało, iż materiał ten w najniższym stężeniu i już po 2-godzinnej inkubacji wywołuje hemolizę rzędu 50% (Wykres 2). Zależność stopnia hemolizy od stężenia obserwowano wyłącznie dla dwugodzinnego czasu inkubacji. Dla wszystkich stężeń po 8, 16 i 24 godzinach inkubacji hemoliza wynosiła powyżej 90%.



Wykres 1.

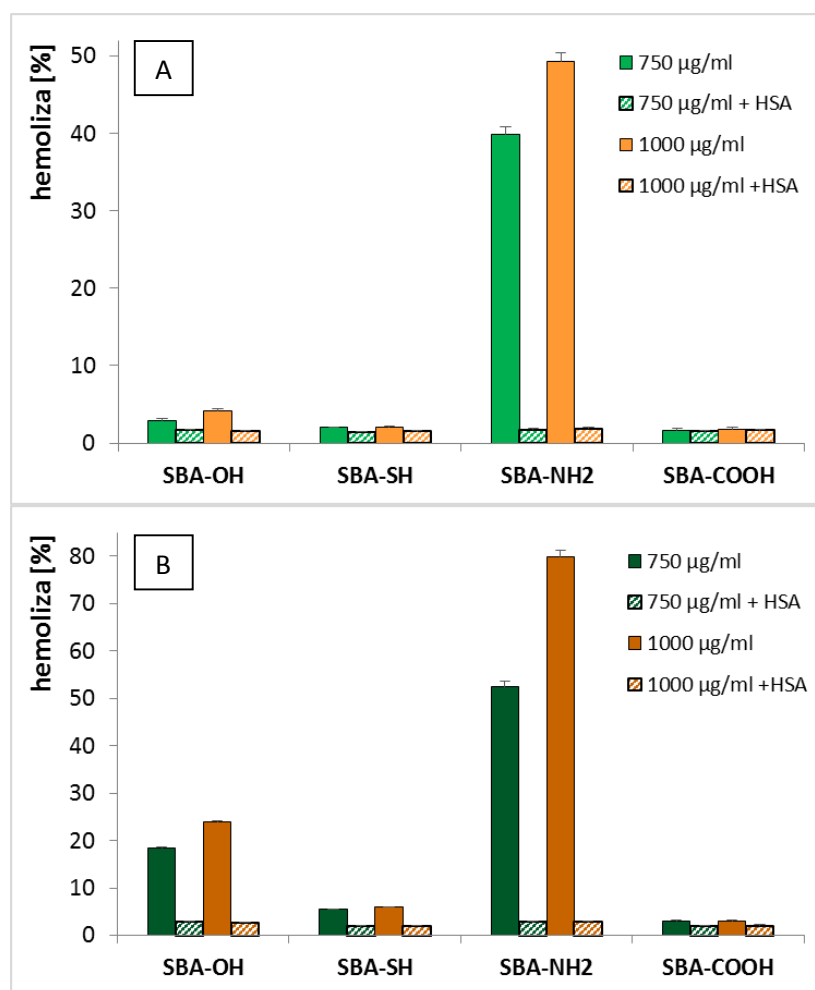
Hemoliza
indukowana przez
mezoporowate
nanocząsteczki
krzemionkowe.
Wyniki
przedstawione
jako średnia + SD;
n=6



Wykres 2. Aktywność hemolityczna krzemionki amorficznej α - SiO_2 .

Wyniki przedstawione jako średnia + SD; $n=6$; $p \leq 0.001$.

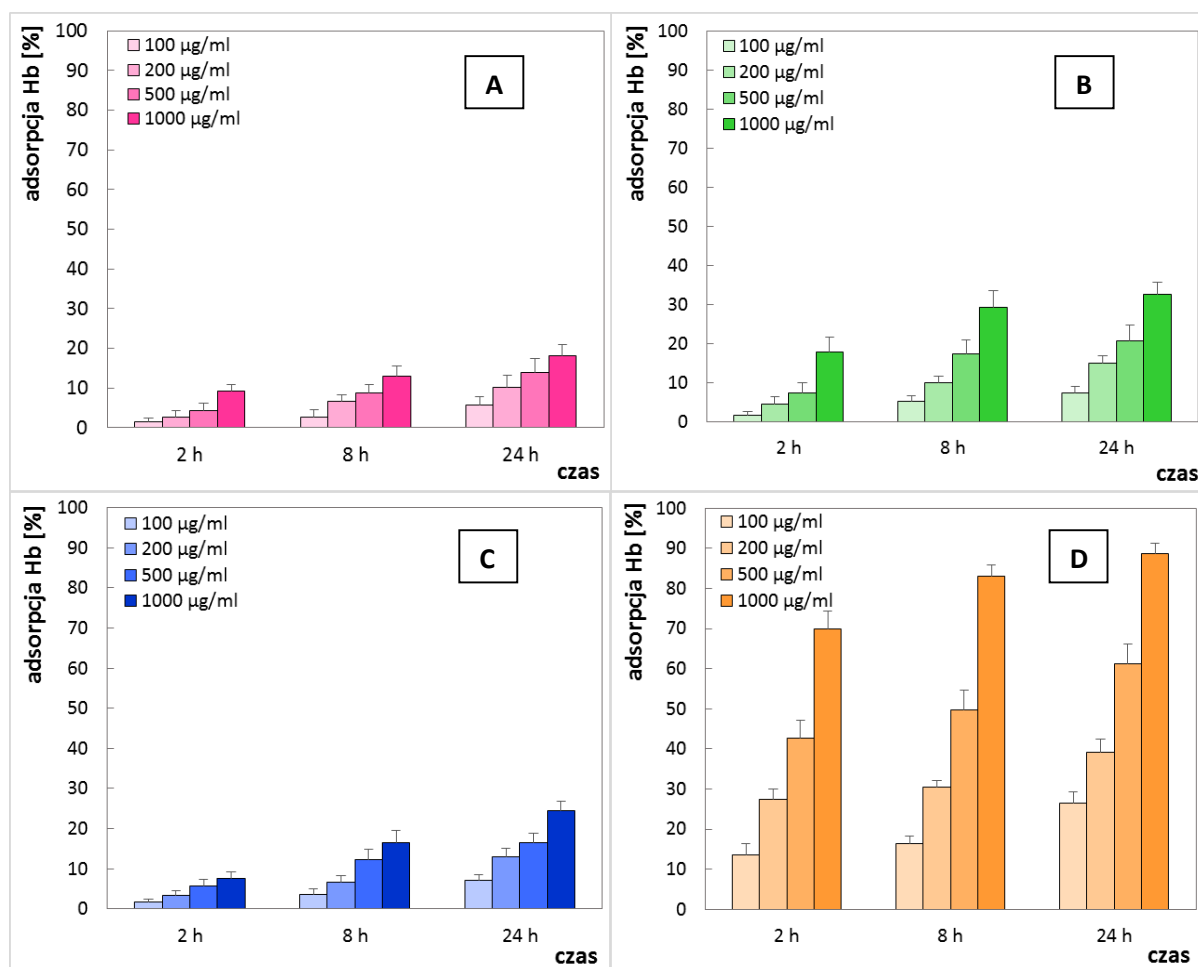
Dodanie albuminy surowicy człowieka (HSA) do układu badawczego spowodowało znaczną redukcję poziomu hemolizy wywołanej przez krzemionki. Dla stężeń krzemionek 750 µg/ml i 1000 µg/ml po 2 i 24 godzinach inkubacji obserwowano hemolizę na poziomie kontroli (Wykres 3).



Wykres 3. Wpływ HSA na hemolizę wywołaną przez nanocząsteczki krzemionkowe po **A)** 2 h inkubacji oraz **B)** 24 h inkubacji ($c_{HSA} = 2 \text{ mg/ml}$). Wyniki przedstawiono jako średnia + SD; $n=6$.

4.1.2. Wychwyt hemoglobiny przez nanocząsteczki krzemionkowe

Badania wychwytu hemoglobiny przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe wskazały, iż adsorpcja Hb wzrastała w każdym przypadku wraz z czasem inkubacji oraz stężeniem badanych cząstek. Dla krzemionek SBA-OH, SBA-SH oraz SBA-NH2 adsorpcja nie przekroczyła 35%. W przypadku tych materiałów po 24 h dla stężenia 1000 µg/ml odnotowano wychwyt równy odpowiednio: 18%, 33% oraz 24%. Jedynie dla krzemionki posiadającej grupy karboksylowe (SBA-COOH) zaobserwowano silną adsorpcję hemoglobiny, aż do 90% po 24 godzinach inkubacji dla najwyższego stężenia (Wykres 4).

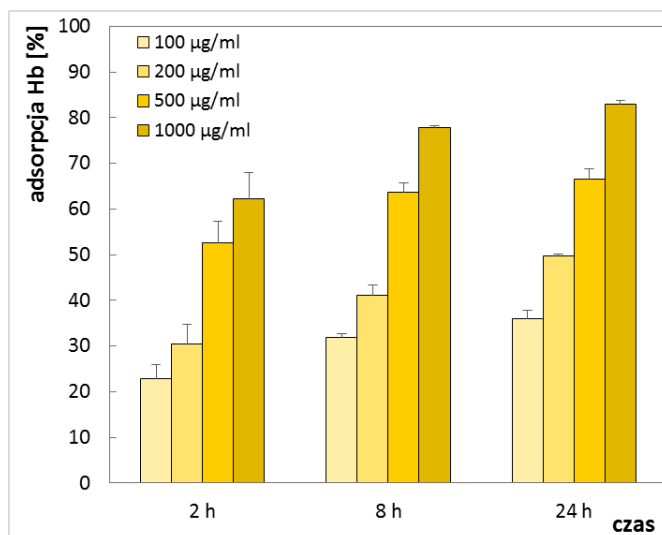


Wykres 4. Adsorpcja hemoglobiny przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe

A) SBA-OH, **B)** SBA-SH, **C)** SBA-NH₂, **D)** SBA-COOH.

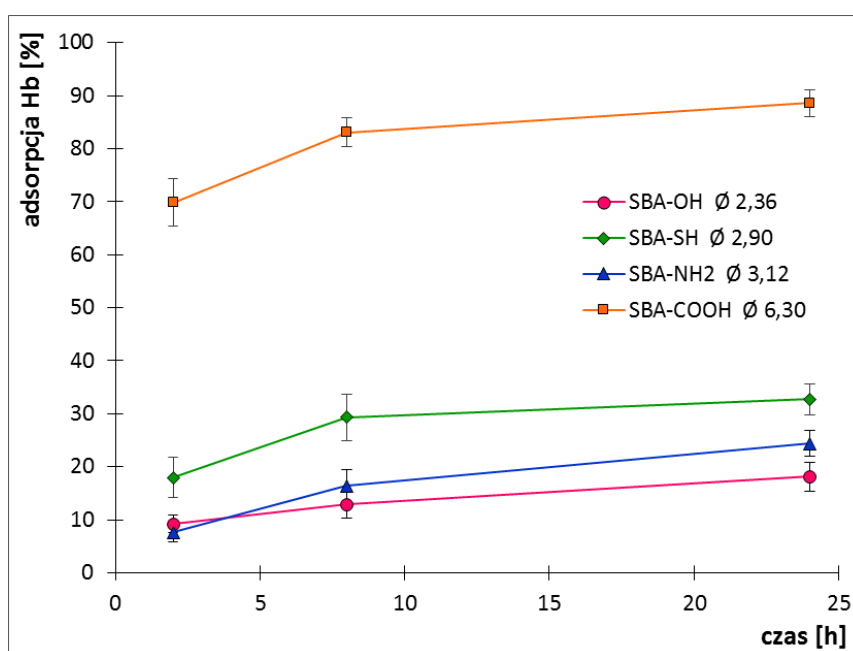
Wyniki przedstawiono jako średnia + SD; n=6.

Badania wychwytu hemoglobiny przeprowadzono również dla krzemionki amorficznej. Także dla tego materiału zaobserwowano wzrost adsorpcji Hb wraz ze wzrostem stężenia i wydłużającym się czasem inkubacji (Wykres 5). Dla najniższego użytego w badaniach stężenia – 100 µg/ml już po 2 godzinach inkubacji obserwowano wychwyt równy 23%. Po 24 godzinach, dla stężenia 1000 µg/ml adsorpcja hemoglobiny wynosiła 83%.



Wykres 5. Adsorpcja hemoglobiny przez krzemionkę amorficzną α -SiO₂.

Wyniki przedstawiono jako średnia + SD; n=6.



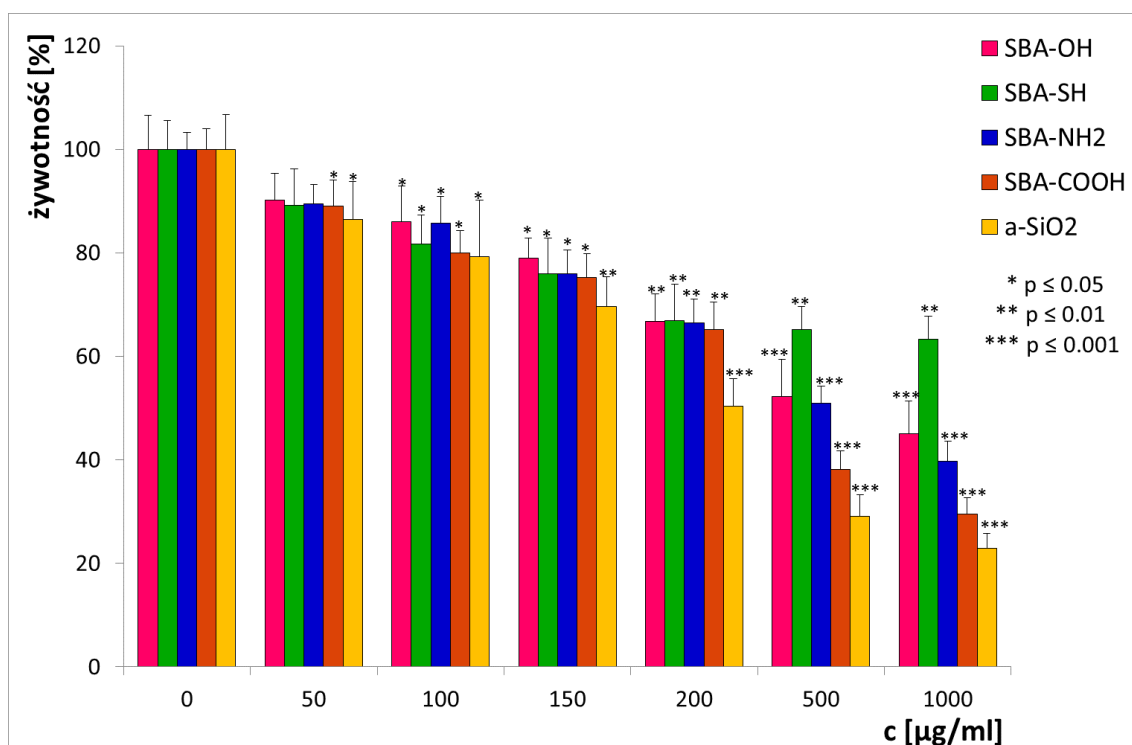
Wykres 6. Wychwyt hemoglobiny przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe – wpływ grup funkcyjnych oraz wielkości porów.

4.2. Badanie cytotoksyczności krzemionek *in vitro*

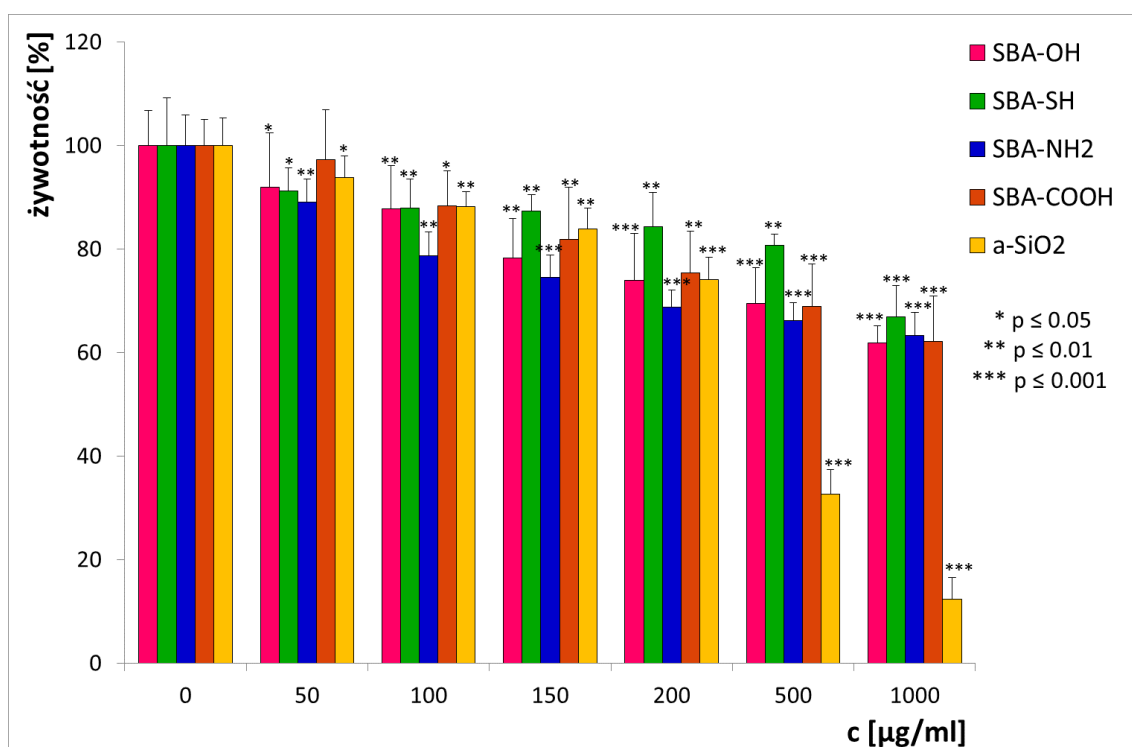
Początkowo oznaczanie cytotoksyczności krzemionek przeprowadzono wykorzystując metodę MTT. Jednakże nie uzyskano powtarzalnych i wiarygodnych wyników. W literaturze odnotowano, iż metoda ta nie jest dobra dla oznaczania cytotoksyczności nanocząsteczek krzemionkowych ze względu na zaburzony wewnątrzkomórkowy transport tj. przyspieszoną egzocytozę kryształów formazanu, która w efekcie powoduje zawyżanie wyników testu [81].

Następnie badanie cytotoksyczności mezoporowatych krzemionek oraz krzemionki amorficznej przeprowadzono przy użyciu spektrofлуorymetrycznej metody z resazuryną. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów (Wykresy 7-10).

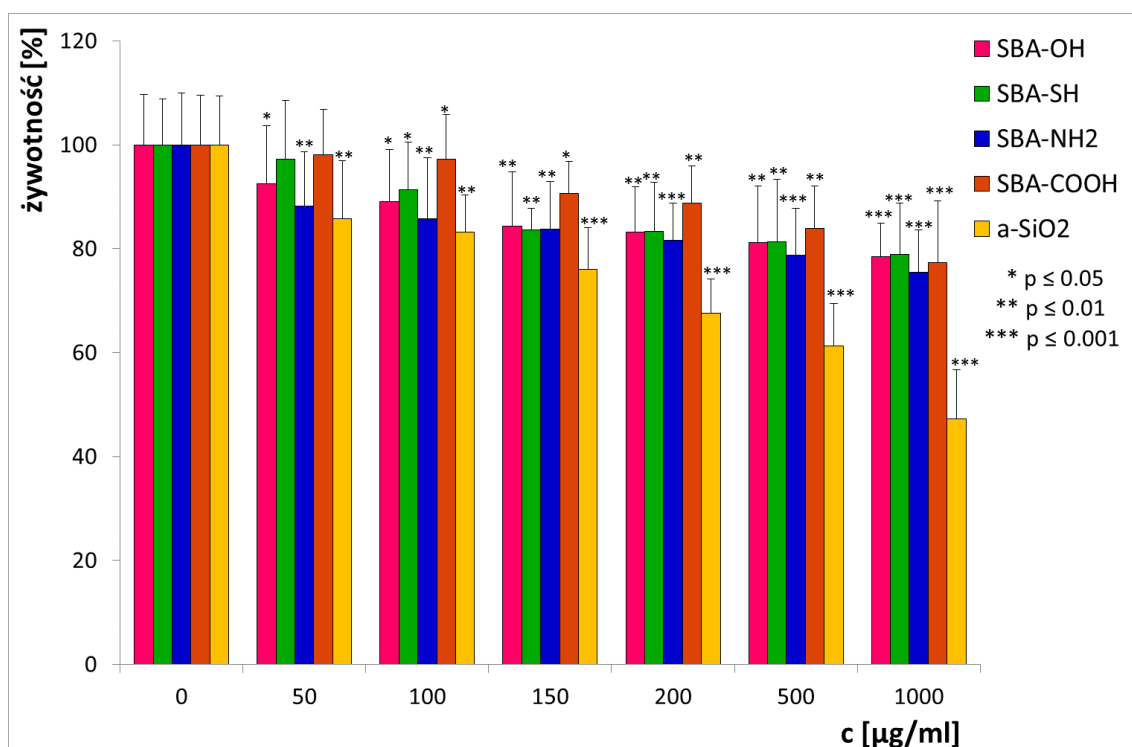
Zaobserwowano zależność cytotoksycznego efektu krzemionek od ich stężenia oraz typu nanocząsteczek. Dla badanych stężeń, dla wszystkich użytych linii komórkowych mezoporowate nanocząsteczki oraz krzemionka amorficzna były nietoksyczne (żywołność powyżej 80%) w stężeniach poniżej 100 µg/ml (Wykresy 7-10). Krzemionka amorficzna w najwyższym badanym stężeniu 1000 µg/ml we wszystkich liniach komórkowych powodowała najwyższy spadek żywołności (do 20 % dla B14, 15% dla 1301, 43% dla HL60 i 62% dla BRL). Z badanych krzemionek mezoporowatych najmniej toksyczna okazała się krzemionka z grupami –SH (SBA-SH). Dla tych nanocząsteczek niemożliwe było obliczenie parametru IC50 (stężenie, przy którym żywołność wynosi 50%). Stężenie IC50 zostało obliczone natomiast dla pozostałych krzemionek. Dla prawidłowej linii komórkowej B14, te stężenia dla SBA-OH, SBA-NH₂ oraz SBA-COOH odpowiednio wynosiły: 689 µg/ml, 306 µg/ml, 252 µg/ml, dla krzemionki amorficznej natomiast – 180 µg/ml. Dla linii komórkowych HL60 oraz 1301 możliwe było podanie parametru IC50 tylko dla krzemionki amorficznej (IC50 = 352 µg/ml), natomiast dla linii BRL żadna z krzemionek nie powodowała spadku żywołności do 50%. Wyniki obliczeń IC50 zostały przedstawione w tabeli 2.



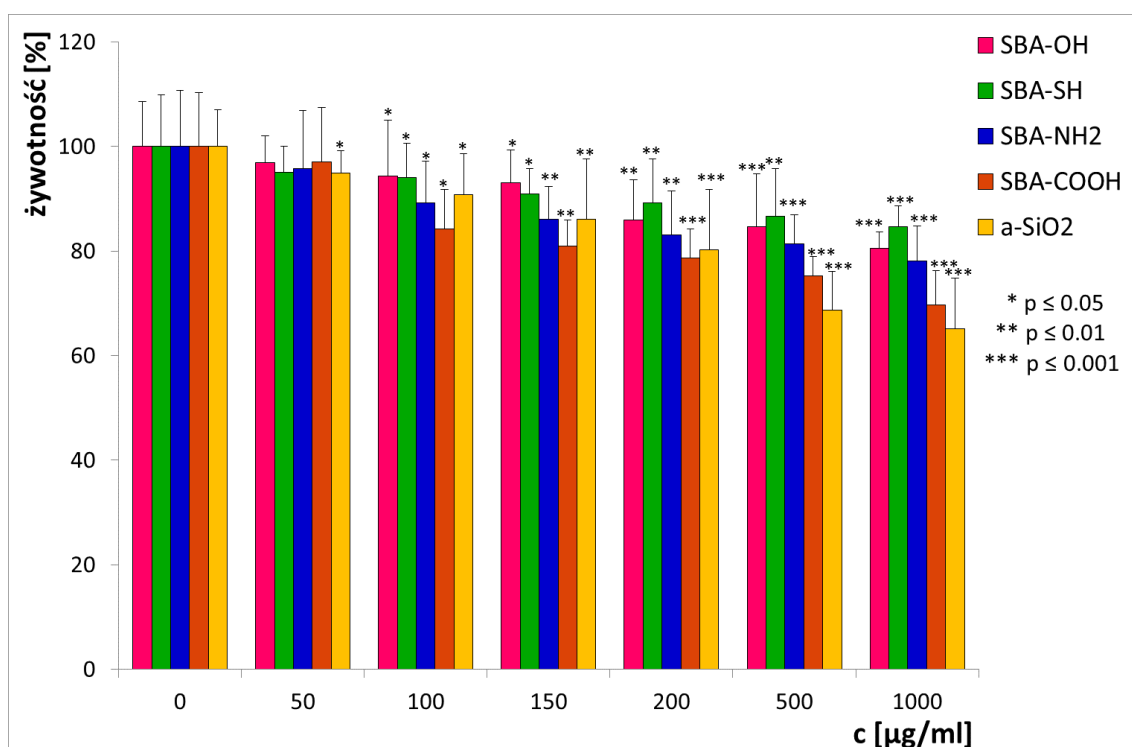
Wykres 7. Żywotność komórek B14 po 24 godzinach inkubacji z mezoporowatymi nanocząsteczkami krzemionkowymi oraz krzemionką amorficzną. Wyniki przedstawiono jako średnia + SD; n=6.



Wykres 8. Żywotność komórek 1301 po 24 godzinach inkubacji z mezoporowatymi nanocząsteczkami krzemionkowymi oraz krzemionką amorficzną. Wyniki przedstawiono jako średnia + SD; n=6.



Wykres 9. Żywotność komórek HL60 po 24 godzinach inkubacji z mezoporowatymi nanocząsteczkami krzemionkowymi oraz krzemionką amorficzną. Wyniki przedstawiono jako średnia + SD; n=6.



Wykres 10. Żywotność komórek BRL po 24 godzinach inkubacji z mezoporowatymi nanocząsteczkami krzemionkowymi oraz krzemionką amorficzną. Wyniki przedstawiono jako średnia + SD; n=6.

Tabela 2. Parametr aktywności IC50 dla nanocząsteczek krzemionkowych i krzemionki amorficznej.

		SBA-OH	SBA-SH	SBA-NH ₂	SBA-COOH	a-SiO ₂
B14	IC50 [µg/ml]	689	-	306	252	180
	<i>95% przedziały ufności [µg/ml]</i>	<i>360 - 13100</i>	<i>-</i>	<i>196 - 477</i>	<i>179 - 355</i>	<i>143 - 227</i>
1301	IC50 [µg/ml]	1387	-	1826	1492	352
	<i>95% przedziały ufności [µg/ml]</i>	<i>692 - 2783</i>	<i>-</i>	<i>612 - 3115</i>	<i>923 - 2412</i>	<i>290 - 426</i>
HL60	IC50 [µg/ml]	-	-	-	-	855
	<i>95% przedziały ufności [µg/ml]</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>579 - 1262</i>
BRL	IC50 [µg/ml]	-	-	-	-	2076
	<i>95% przedziały ufności [µg/ml]</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>979 - 4402</i>

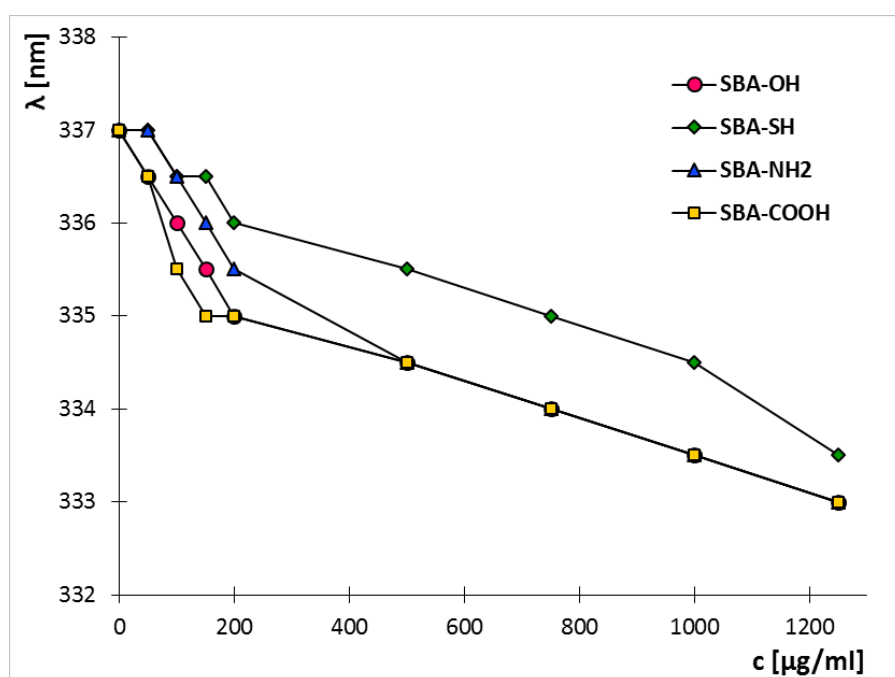
4.3. Interakcja nanocząsteczek krzemionkowych z albuminą surowicy człowieka

W pierwszej kolejności wykonano widma kontrolne, aby uzyskać pewność, że zmiany będą pochodzić jedynie od fluorescencji albuminy. Wykreślono widma fluorescencji dla samych nanocząsteczek krzemionkowych. Badania te wykazały, iż wszystkie krzemionki posiadają maksimum fluorescencji dla 580 nm przy wzbudzeniu długością fali równą 290 nm.

Badania gaszenia fluorescencji albuminy możliwe były do przeprowadzenia ponieważ białko to w swojej strukturze zawiera jeden tryptofan w pozycji 214 lokalizowany w subdomenie IIA. Intensywność fluorescencji HSA spadała po dodaniu wszystkich typów krzemionek. Dla stężeń w zakresie 50-1250 µg/ml obserwowano

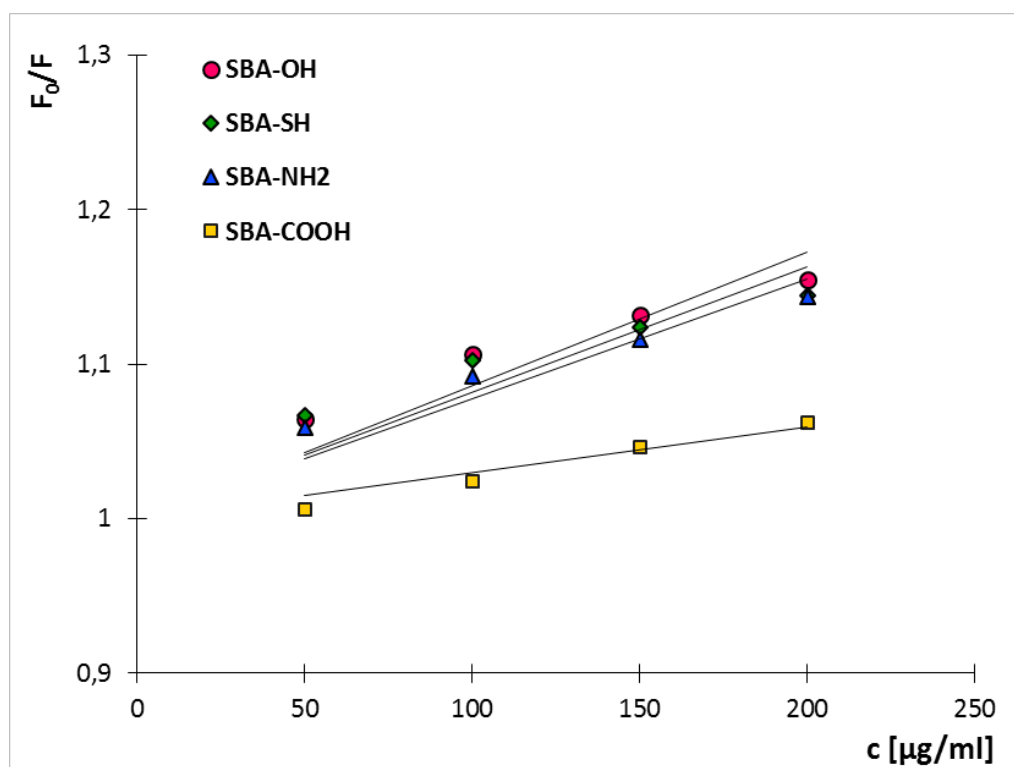
zmniejszenie intensywności fluorescencji do 40%. To wskazuje, że mezoporowate krzemionki jedynie częściowo gaszą fluorescencję albuminy. Największe wygaszanie zaobserwowano dla krzemionki SBA-OH posiadającej grupy hydroksylowe na swojej powierzchni.

Wygaszaniu fluorescencji albuminy surowicy człowieka towarzyszyło niewielkie przesunięcie maksimum emisji w stronę fal krótszych tzw. blueshift (Wykres 11).



Wykres 11. Przesunięcie maksimum widm fluorescencyjnych HSA.

Wykreślono wykresy Sterna-Volmera (Wykres 12), które miały przebieg liniowy dla wszystkich czterech typów wygaszaczy (nanocząsteczek krzemionkowych) dla stężeń krzemionek niższych od 200 μg/ml, co sugeruje dynamiczny mechanizm wygaszania w tym zakresie stężeń.



Wykres 12. Wykresy Sterna-Volmera dla wygaszania HSA przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe.

Dla tego zakresu stężeń obliczono stałe Sterna-Volmera z klasycznego równania Sterna-Volmera dla gaszenia dynamicznego, które ma postać:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

gdzie:

F – intensywność fluorescencji HSA w obecności krzemionek

F₀ – intensywność fluorescencji HSA

[Q] – stężenie krzemionki

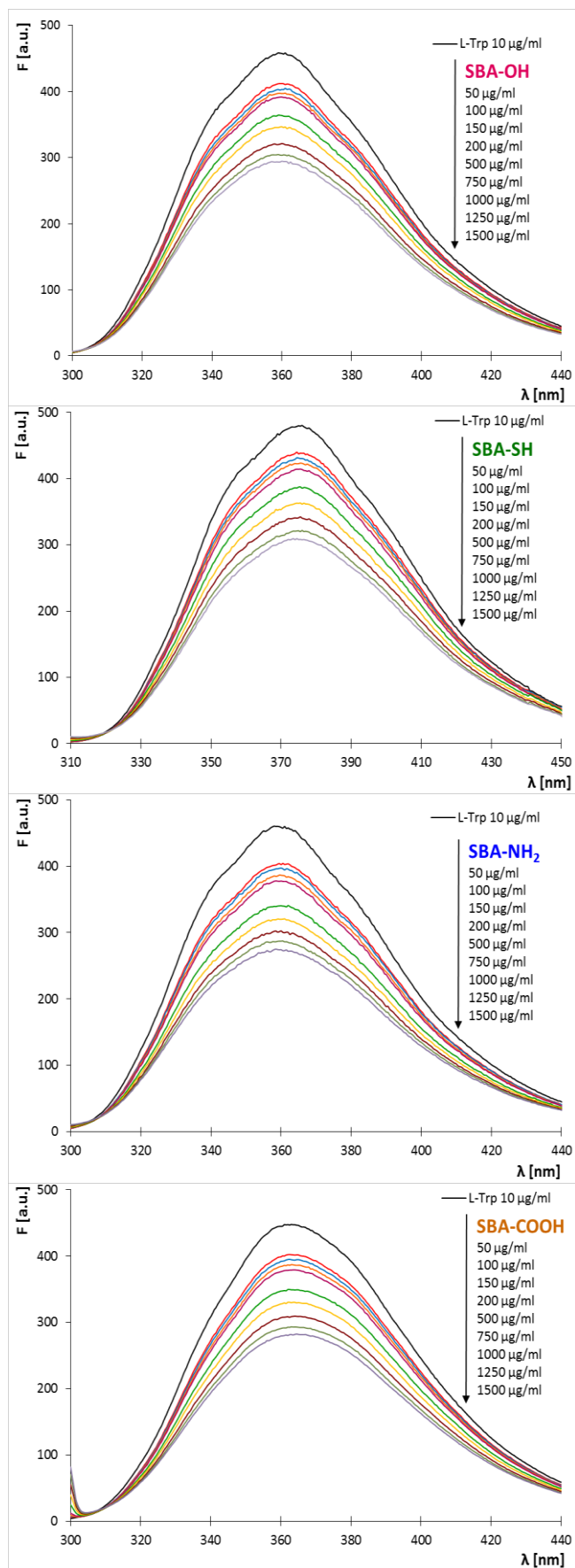
K_{sv} – stała Sterna-Volmera

Obliczone wartości stałych Sterna-Volmera podane są w tabeli 3.

Tabela 3. Wartości stałych Sterna-Volmera dla wygaszania albuminy surowicy człowieka (HSA) przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe.

	K_{sv} [l/g]
SBA-OH	$8,6 \times 10^4$
SBA-SH	$8,1 \times 10^4$
SBA-NH₂	$7,8 \times 10^4$
SBA-COOH	$3,0 \times 10^4$

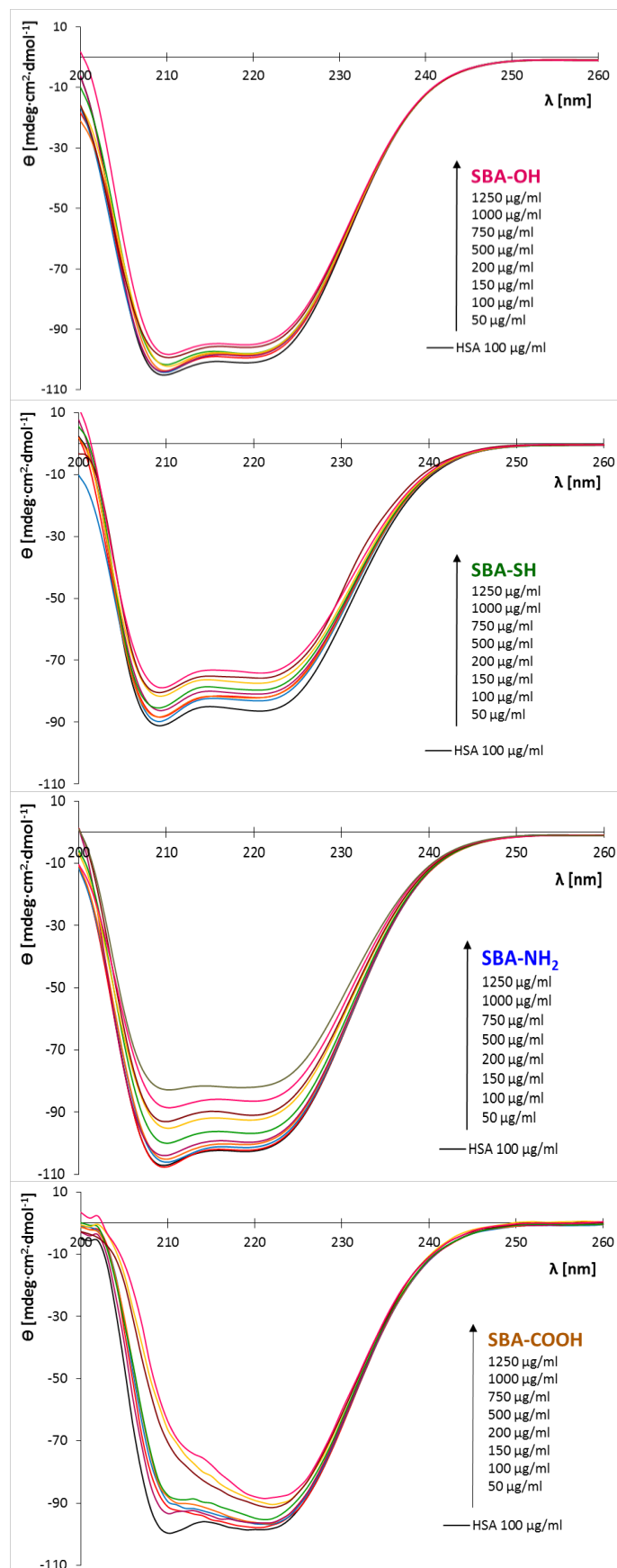
Wolny tryptofan posiada maksimum absorpcji przy długości fali 280 nm oraz emisji w zakresie 320 – 370 nm w zależności od polarności środowiska, w którym jest obecny [82]. Nanocząsteczki krzemionkowe w badanym zakresie długości fal (300-440 nm) nie wykazywały własnej fluorescencji. Intensywność fluorescencji L-tryptofanu malała wraz ze wzrostem stężenia krzemionek (Wykres 13), co wskazuje na reakcje pomiędzy tymi nanocząsteczkami a tryptofanem. Spadek intensywności dla stężeń krzemionek 50-1500 µg/ml wynosił tylko około 40%. Podczas badań nie zaobserwowano przesunięcia maksimum fluorescencji dla żadnej z nanocząsteczek krzemionkowych.



Wykres 13. Wygaszanie wolnego L-tryptofanu przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe.

Widmo CD czystej albuminy surowicy człowieka HSA w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ posiada dwa charakterystyczne maksima przy długości fali 210 nm oraz 222 nm.

Podczas miareczkowania albuminy mezoporowatymi nanocząsteczkami krzemionkowymi obserwowano jedynie niewielkie zmiany – wzrost stężenia krzemionek powodował nieznaczne zmiany w eliptyczności HSA (Wykres 14). Krzemionki SBA-OH, SBA-SH oraz SBA-NH₂ nie powodowały zmiany kształtu widma CD albuminy. Obliczenia składu struktury białka wykazały, iż nanocząsteczki te spowodowały jedynie 5-10% spadek zawartości α -helisy. Nanocząsteczki SBA-COOH wywołały zmianę kształtu widma CD białka. Wraz ze wzrostem stężenia tej krzemionki zaobserwowano całkowite zaniknięcie pierwszego z maksimów charakterystycznych dla HSA (210 nm). Obliczono, iż obecność SBA-COOH powodowała zmniejszenie zawartości α -helisy o około 20%, na korzyść innych struktur drugorzędowych, w szczególności nieregularnej struktury „kłębka statystycznego” (random coil) (Tabela 4).

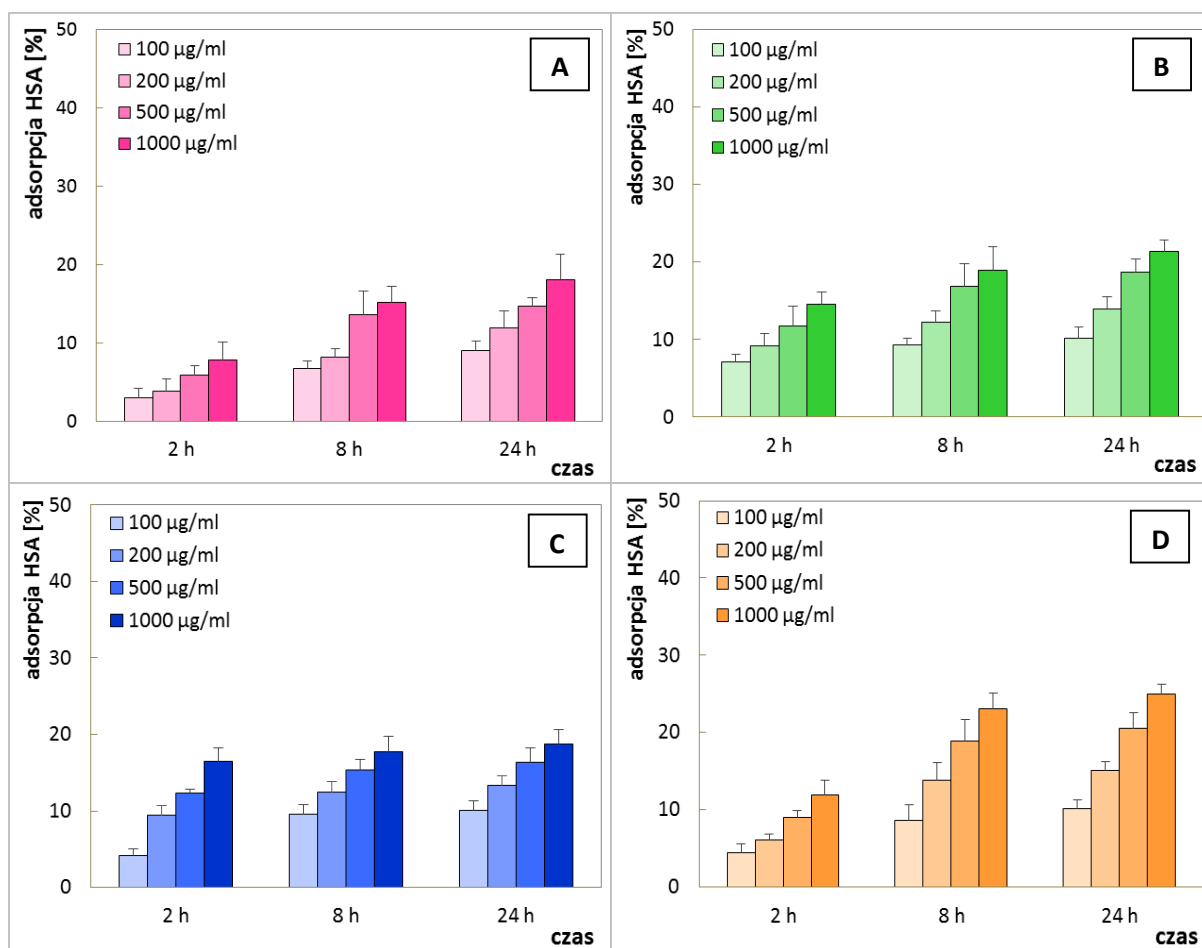


Wykres 14. Widma CD albuminy surowicy człowieka w obecności mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych.

Tabela 4. Zawartość struktur drugorzędowych albuminy surowicy człowieka w obecności mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych.

	HSA	50 μg/ml	100 μg/ml	150 μg/ml	200 μg/ml	500 μg/ml	750 μg/ml	1000 μg/ml	1250 μg/ml
SBA-OH									
α-helisa	70.61%	68.92%	68.83%	67.87%	67.37%	65.14%	65.16%	63.59%	64.41%
Antiparallel	2.55%	2.88%	2.84%	2.95%	2.99%	3.26%	3.39%	3.66%	3.25%
Parallel	2.78%	2.98%	2.98%	3.12%	3.19%	3.52%	3.49%	3.71%	3.60%
β-skręt	11.51%	11.96%	12.02%	12.16%	12.19%	12.58%	12.78%	13.09%	12.52%
Rndm. Coil	12.52%	13.30%	13.26%	13.83%	14.32%	15.55%	15.19%	15.99%	16.23%
SBA-SH									
α-helisa	63.14%	60.81%	60.13%	59.71%	58.04%	56.83%	55.31%	55.29%	55.09%
Antiparallel	3.47%	3.85%	4.03%	4.00%	4.22%	4.38%	4.65%	4.66%	4.64%
Parallel	3.77%	4.11%	4.20%	4.25%	4.52%	4.69%	4.91%	4.97%	4.98%
β-skręt	12.84%	13.35%	13.59%	13.48%	13.73%	13.98%	14.20%	14.24%	14.14%
Rndm. Coil	16.72%	17.87%	18.04%	18.66%	19.49%	20.06%	20.87%	20.89%	21.15%
SBA-NH₂									
α-helisa	70.82%	68.73%	67.48%	67.80%	68.18%	67.36%	64.72%	64.25%	60.13%
Antiparallel	2.55%	2.78%	2.94%	2.82%	2.88%	2.97%	3.30%	3.32%	3.96%
Parallel	2.75%	3.03%	3.20%	3.18%	3.13%	3.21%	3.54%	3.66%	4.23%
β-skręt	11.48%	11.97%	12.18%	11.99%	12.00%	12.06%	12.61%	12.57%	13.43%
Rndm. Coil	12.47%	13.54%	14.15%	14.26%	13.92%	14.47%	15.81%	16.23%	18.21%
SBA-COOH									
α-helisa	66.10%	62.50%	61.17%	60.22%	60.10%	59.68%	51.43%	49.54%	47.37%
Antiparallel	2.92%	3.23%	3.44%	3.54%	3.54%	3.55%	4.58%	4.77%	5.06%
Parallel	3.42%	3.83%	4.04%	4.15%	4.24%	4.26%	5.50%	5.79%	6.17%
β-skręt	11.97%	12.30%	12.54%	12.65%	12.63%	12.77%	13.75%	13.91%	14.07%
Rndm. Coil	15.69%	18.04%	18.91%	19.43%	19.49%	19.76%	24.75%	25.99%	27.33%

Dla lepszego zrozumienia, w jaki sposób oddziałują mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe z albuminą surowicy człowieka przeprowadzono badania adsorpcji HSA przez te nanocząsteczki. Zaobserwowano, że ilość zaadsorbowanej albuminy przez krzemionki tylko nieznacznie wzrasta wraz z czasem inkubacji (Wykres 15). Obserwowano niewielki wzrost wychwytu HSA wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek krzemionkowych, jednakże nawet przy najwyższym stężeniu krzemionek SBA-COOH (1000 $\mu\text{g/ml}$) po 24 godzinach inkubacji adsorpcja białka nie przekraczała 25%. Uzyskane wyniki wskazują, że nanocząsteczki krzemionkowe typu SBA-15 tylko częściowo adsorbują albuminę.

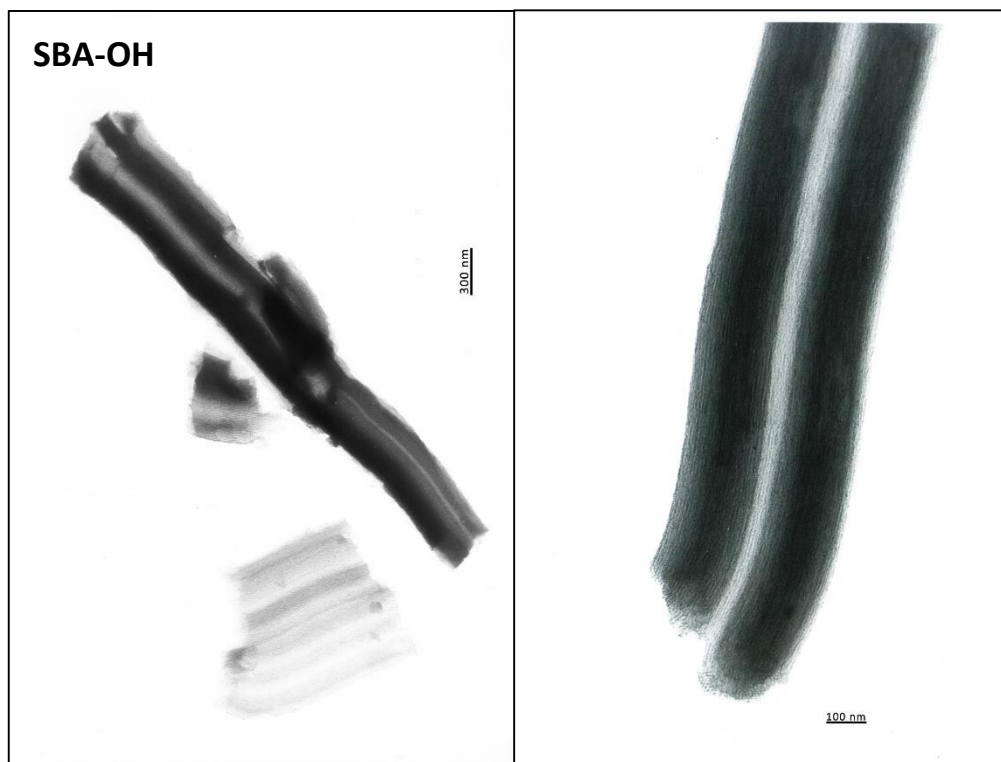


Wykres 15. Adsorpcja albuminy surowicy ludzkiej przez mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe: **A)** SBA-OH, **B)** SBA-SH, **C)** SBA-NH₂, **D)** SBA-COOH

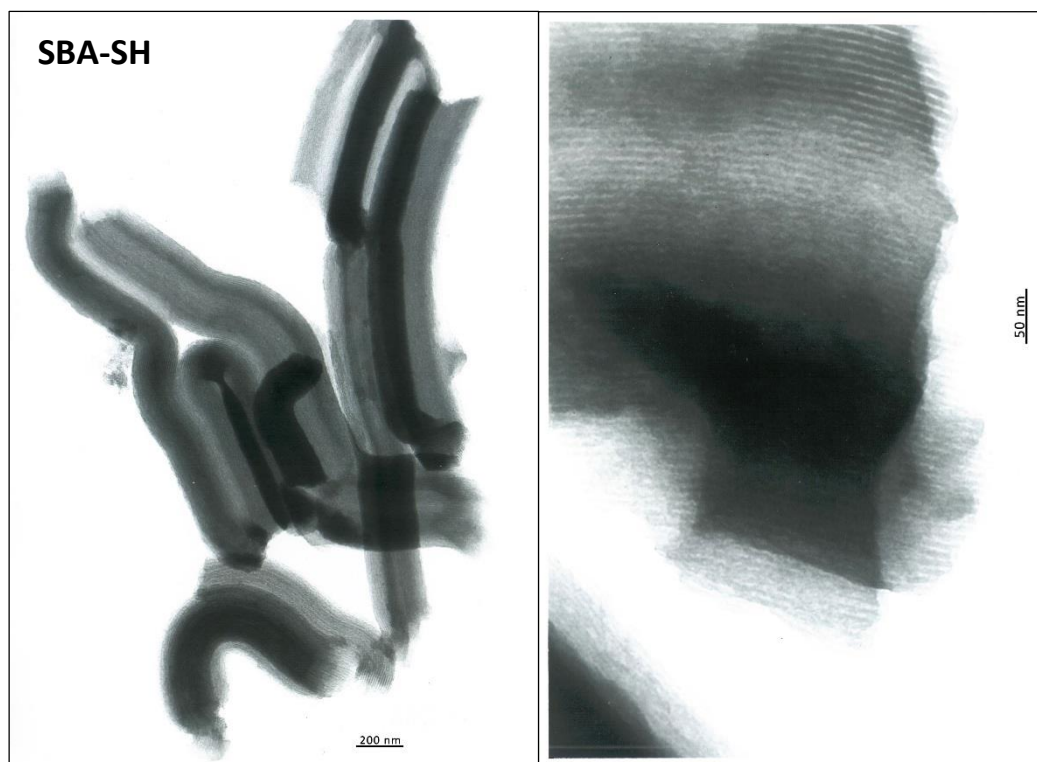
Wyniki przedstawione jako średnia + SD; $n=6$; $p \leq 0.001$.

4.4. Morfologia, potencjał zeta i charakterystyka powierzchni krzemionek

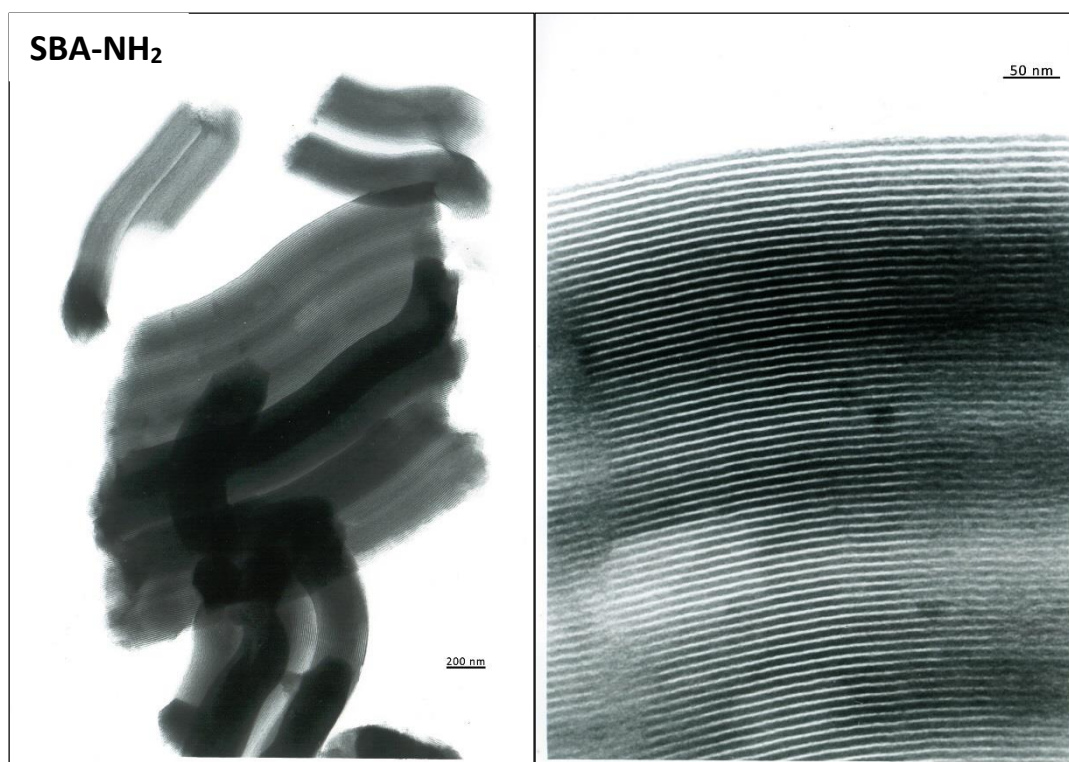
Obserwacje przeprowadzone za pomocą mikroskopu elektronowego ukazały, zgodnie z przewidywaniami, nanocząsteczki o podłużnym kształcie (Rysunki 4-7). Taki rodzaj morfologii nazywany jest budową prętową. Na obrazach wszystkich krzemionek widać mezokanały ułożone wzdłuż nanocząsteczek. Występowanie tych wysoce uporządkowanych struktur jest zgodne z wynikami uzyskanymi z analizy rentgenograficznej i fizysorpcji azotu wykonanych po syntezie krzemionek przez zespół El Kadiba. Należy podkreślić, że zastosowanie modyfikacji organicznych nie wpłynęło na zmianę struktury mezoporowatych nanocząsteczek, ponieważ zarówno niemodyfikowana krzemionka SBA-OH, jak i zmodyfikowane nanocząsteczki w obrazach mikroskopowych wykazały podobną budowę.



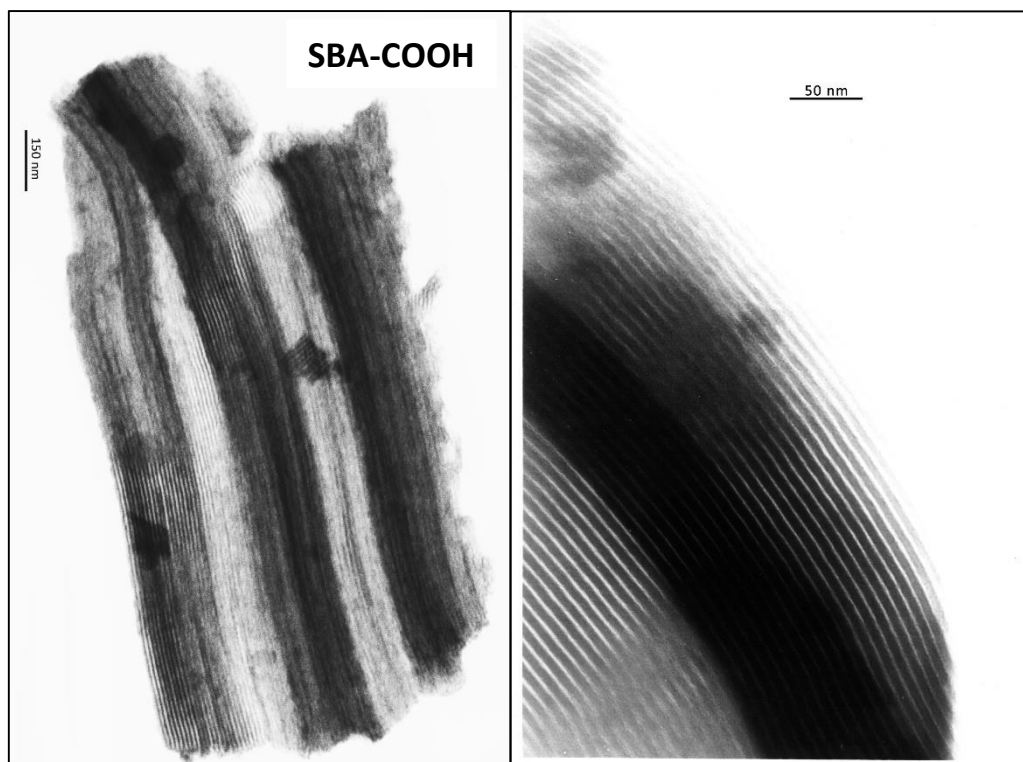
Rysunek 4. Zdjęcia z elektronowego mikroskopu transmisyjnego TEM przedstawiające mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe SBA-OH.



Rysunek 5. Zdjęcia z elektronowego mikroskopu transmisyjnego TEM przedstawiające mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe SBA-SH.



Rysunek 6. Zdjęcia z elektronowego mikroskopu transmisyjnego TEM przedstawiające mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe SBA-NH₂.

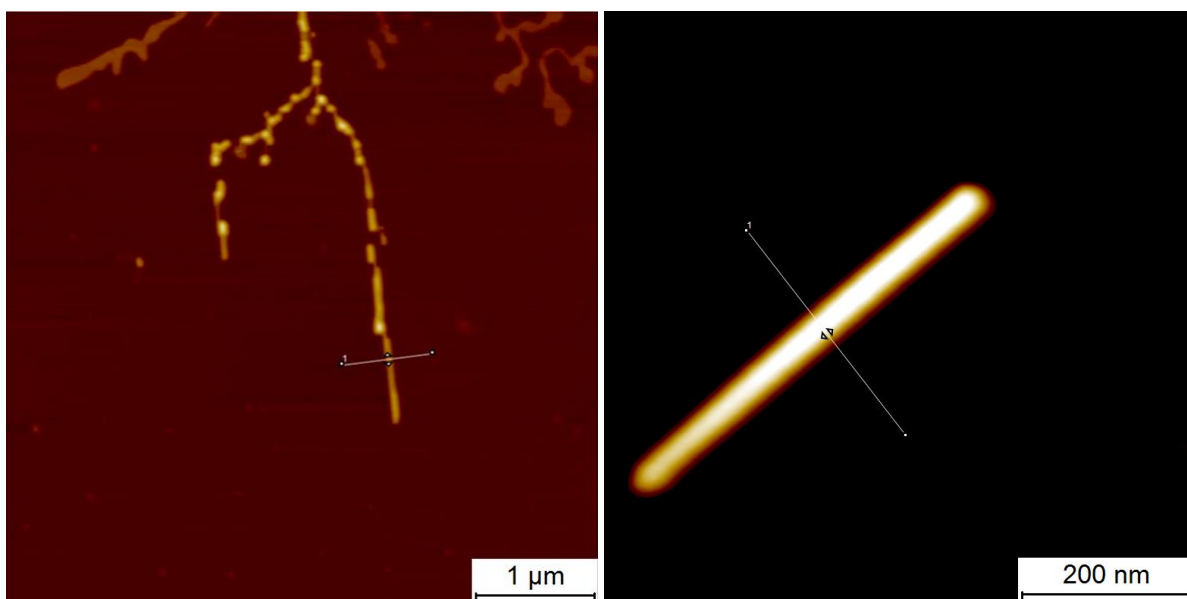


Rysunek 7. Zdjęcia z elektronowego mikroskopu transmisyjnego TEM przedstawiające mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe SBA-NH₂.

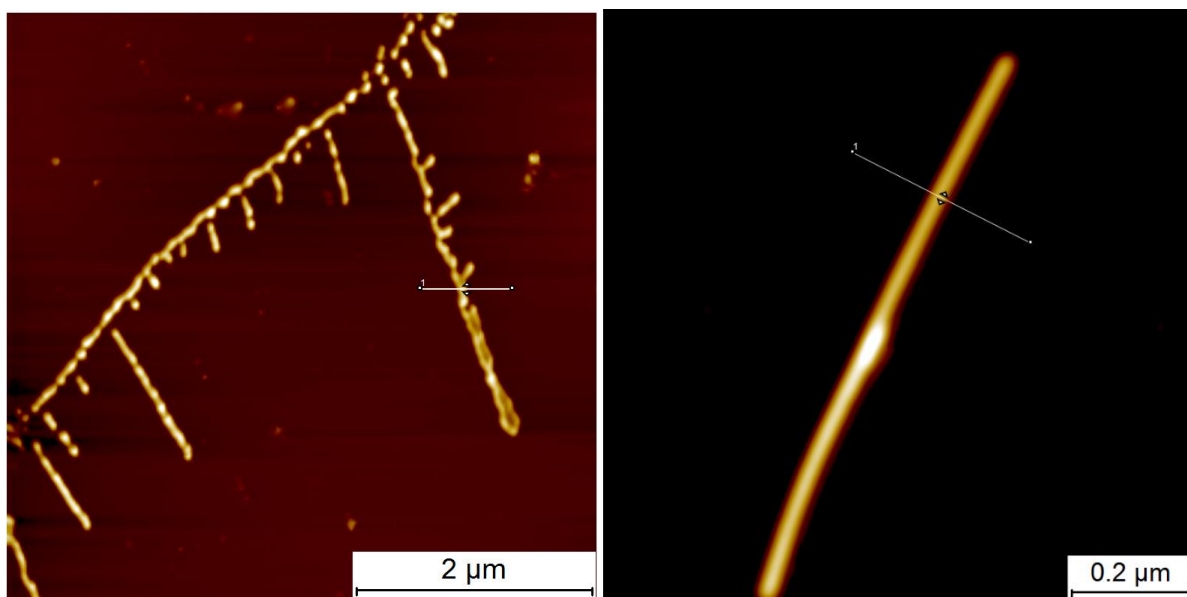
Badania za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego wskazały ponadto, iż nanocząsteczki krzemionkowe tworzą agregaty. Podobny wynik otrzymałam w badaniach wykonanych za pomocą mikroskopu sił atomowych. Ponadto dla krzemionek SBA-OH i SBA-SH udało się zaobserwować całe, pojedyncze, podłużne nanocząsteczki. Dla krzemionek SBA-NH₂ obserwowano fragmenty nanocząsteczek, natomiast w przypadku SBA-COOH nie odnaleziono w badanych próbkach niezagregowanych, dobrze widocznych nanocząsteczek.

Poza obserwacją zagregowanych krzemionek i bardzo nielicznych pojedynczych nanocząsteczek (Rysunek 8-9) AFM nie dostarczył dodatkowych informacji. Wynika to być może z konieczności zastosowania procesu suszenia podczas przygotowywania próbek. W literaturze znajdują się informacje, iż nanocząsteczki mogą się samoorganizować na podłożach stosowanych w badaniach AFM, a nawet tworzyć kilka warstw [83], co utrudnia obrazowanie i obserwację pojedynczych nanocząsteczek.

SBA-OH

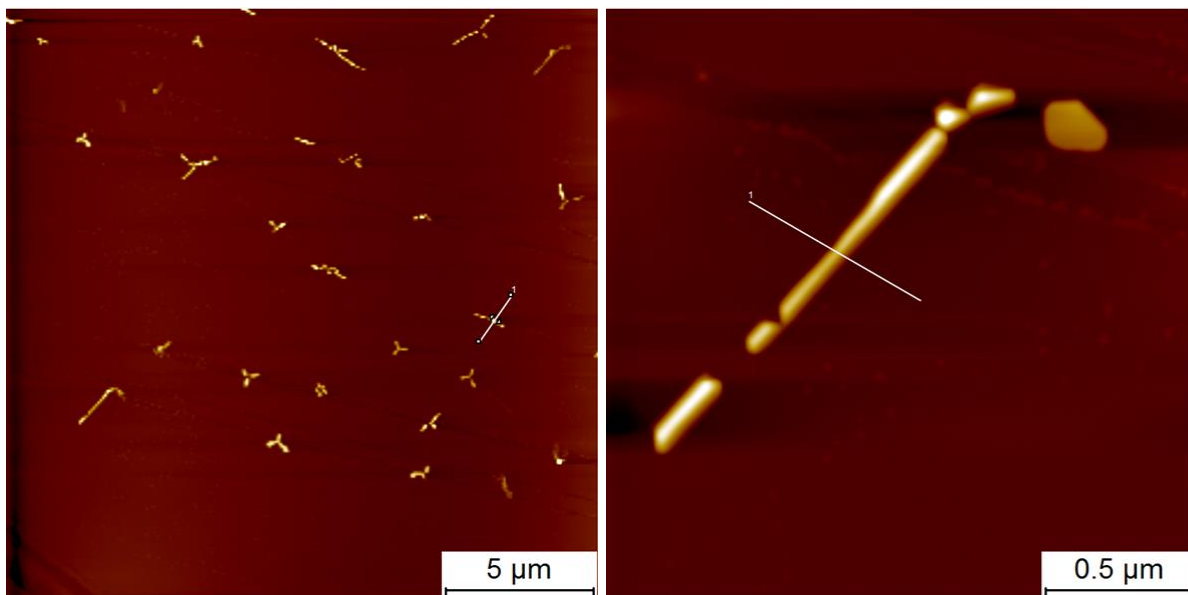


SBA-SH

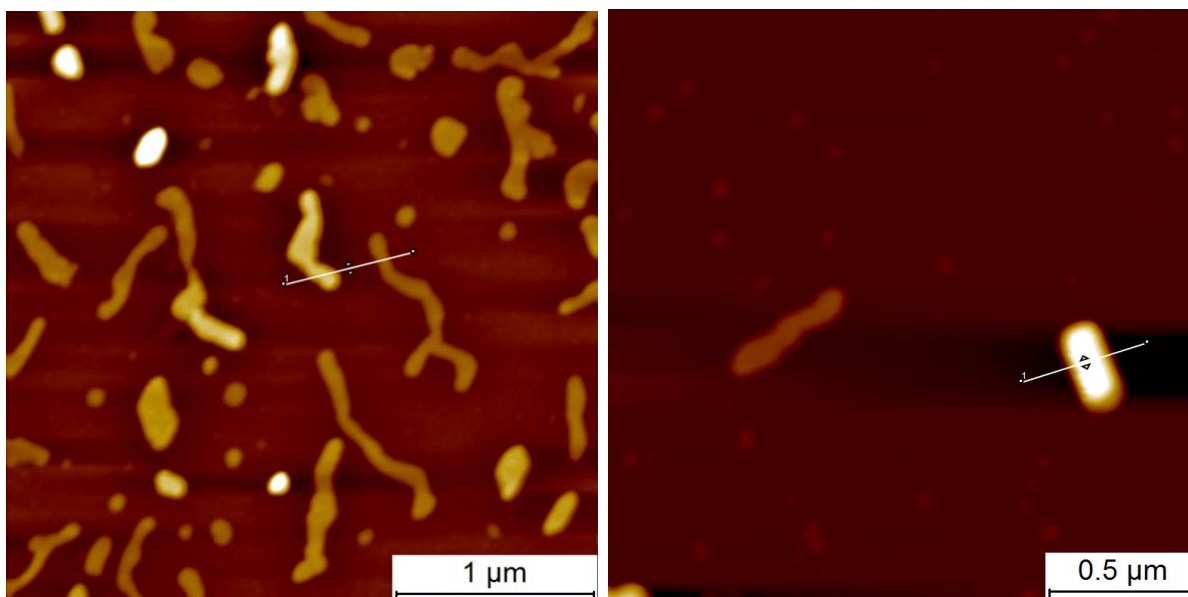


Rysunek 8. Zdjęcia mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych wykonane za pomocą mikroskopu sił atomowych AFM.

SBA-NH₂



SBA-COOH



Rysunek 9. Zdjęcia mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych wykonane za pomocą mikroskopu sił atomowych AFM.

Pomiary potencjału zeta mezoporowatych nanocząsteczek i krzemionki amorficznej zostały przeprowadzone w celu lepszego poznania ich powierzchni. Krzemionka amorficzna posiada najniższy potencjał zeta równy -17,8 mV. Natomiast sfunkcjonalizowana grupami aminowymi krzemionka SBA-NH₂ posiada najwyższy

potencjał zeta wynoszący -5,6 mV. Wartości potencjału zeta dla wszystkich krzemionek zostały przedstawione w tabeli 5.

Tabela 5. Potencjał zeta mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych oraz krzemionki amorficznej.

<i>Nanocząsteczki</i>	<i>Potencjał zeta [mV]</i>
SBA-OH	-15.0
SBA-SH	-14.1
SBA-NH ₂	-5.6
SBA-COOH	-13.2
aSiO ₂	-17.8

Badania polegające na wykreśleniu izoterm adsorpcji/desorpcji azotu pozwoliły oszacować powierzchnię właściwą krzemionek mezoporowatych, całkowitą objętość porów oraz ich średnicę. Wyniki przedstawiono w tabeli 6. Wyniki te są zbliżone do wyników, które otrzymał zespół El Kadiba tuż po syntezie nanocząsteczek. Oznacza to, że proces rozpuszczania krzemionek w PBS, a także działanie ultradźwięków, którym zostały one poddane nie zmieniają właściwości powierzchni tych nanocząsteczek.

Tabela 6. Charakterystyka powierzchni mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych.

<i>Nanocząsteczki</i>	<i>Powierzchnia właściwa [m²/g]</i>	<i>Całkowita objętość porów [cm³/g]</i>	<i>Średnica porów [nm]</i>
SBA-OH	594	0,37	2,56
SBA-SH	458	0,48	2,81
SBA-NH ₂	542	0,71	3,14
SBA-COOH	481	0,65	6,19

5. Dyskusja

Biokompatybilność nanocząsteczek we krwi jest niezwykle ważnym parametrem w przypadku podawania ich jako leków bądź jako nośników cząstek terapeutycznych. Określenie toksyczności mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych względem czerwonych krwinek zasługuje na szczególną uwagę, ponieważ ich zastosowanie biomedyczne może wymagać dostarczania poprzez bezpośrednie wstrzykiwanie do krwiobiegu, a to oznacza, że ze składnikami krwi nastąpi ich pierwszy kontakt. Nanocząsteczki wstrzyknięte do krwi mogą wywoływać wiele ujemnych skutków, z których najczęstszym jest hemoliza [84]. Hemoliza jest to rozpad erytrocytów, w wyniku którego czerwony barwnik krwi – hemoglobina zostaje uwolniony do osacza.

Dotychczas postulowano, iż za aktywność hemolityczną krzemionek odpowiada kilka czynników. Są to przede wszystkim: wytwarzanie reaktywnych form tlenu na powierzchni krzemionki, denaturacja białek błonowych poprzez elektrostatyczne oddziaływania z krzemionkami oraz wysokie powinowactwo grup silanolowych krzemionek do tetraalkilowych grup amoniowych znajdujących się na błonie komórkowej erytrocytów [85]. Wykazano, że stabilne oddziaływania elektrostatyczne zachodzą pomiędzy zakrzywioną powierzchnią krzemionki i głowami lipidów budujących dwuwarstwę, która stanowi podstawową strukturalną część błony komórkowej [86].

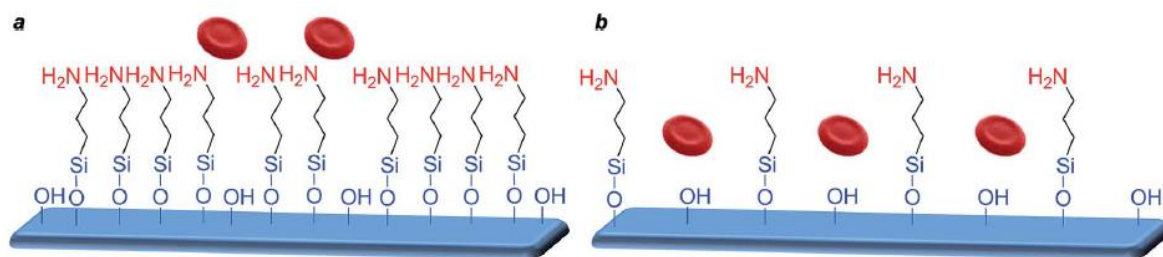
Kolejnym problemem wymagającym rozważenia przed iniekcją dożylną krzemionek jest adsorpcja białek. Obecne we krwi białka po zaadsorbowaniu na powierzchni nanocząsteczek mogą sprzyjać fagocytozie powodując, iż krzemionki stają się widoczne dla komórek fagocytarnych. Powoduje to szybki klirens nanocząsteczek z krwi, zanim dotrą do docelowego miejsca, a w efekcie zmniejszenie efektywności danej terapii [87, 88].

Wyżej wymienione problemy z biokompatybilnością mezoporowatych krzemionek we krwi ściśle wiążą się z właściwościami powierzchni tych nanocząsteczek. Poprzez modyfikację ich powierzchni można więc zwiększyć bądź wyeliminować aktywność hemolityczną krzemionek oraz niespecyficzną adsorpcję białka. Moje badania potwierdziły wpływ grup powierzchniowych i modyfikacji na stopień hemolizy.

Nie bez znaczenia pozostaje ponadto wielkość porów obecnych w strukturze krzemionek.

Skuteczną modyfikacją okazało się być przyłączenie glikolu polietylenowego (PEG) do powierzchni krzemionek. Badania potwierdziły, że tak zmodyfikowane nanocząsteczki krzemionkowe wykazują mniejszą aktywność hemolityczną w porównaniu z „gołymi” MSN [89]. Organiczna modyfikacja PEGiem również wpływa na obniżenie adsorpcji białek krwi przez krzemionki [90].

W literaturze przedstawiono sprzeczne wyniki dotyczące wpływu modyfikacji kwasem aminopropylowym powierzchni krzemionki typu MCM-41 na jej aktywność hemolityczną. Slowing i wsp. zauważyli, że aktywność hemolityczną mezoporowatych krzemionek można obniżyć za pomocą takiej właśnie modyfikacji [84]. W przeciwieństwie do tego Yu et.al. podali, że modyfikacja kwasem aminopropylowym zwiększa aktywność hemolityczną krzemionek [91]. Jednakże należy zauważyć, że Slowing i wsp. funkcjonalizację przeprowadzali w bezwodnym toluenie, natomiast Yu i wsp. jako nośnika modyfikacji użyli etanolu. Asefa i wsp. udokumentowali silny wpływ rozpuszczalnika (polarnego albo niepolarnego) na etapie projektowania materiałów na bazie krzemionki i wykazali za pomocą badań katalitycznych, że etanol pozwala dobrze izolować grupy aminowe przyłączane do powierzchni krzemionki tak, że grupy silanolowe są dostępne dla kolejnych przyłączanych grup aminowych (Rysunek 10) [92]. Odwrotnie ma się sprawa w przypadku funkcjonalizacji w bezwodnym toluenie, który umożliwia uzyskanie wysokiej gęstości unieruchomionych grup aminopropylowych, a nawet ich zagęszczenie i pozostawienie niewielkiej liczby grup silanolowych [91]. Należy zatem zachować ostrożność przy porównywaniu działania różnych materiałów, ponieważ nawet mały szczegół może mieć duże znaczenie i prowadzić do błędów w interpretacji wyników.



Rysunek 10. Wpływ rozpuszczalnika na ułożenie grup na powierzchni mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych podczas przyłączania grup funkcyjnych.

a) przyłączanie w toluenie indukuje tworzenie klastrów na powierzchni;

(b) w etanolu: grupy aminowe są dobrze rozdzielone a grupy silanolowe są bardziej dostępne [67].

W moich badaniach stwierdziłam, iż spośród wszystkich modyfikowanych krzemionek, mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe z grupami aminowymi na powierzchni wywoływały największą hemolizę, natomiast krzemionki z grupami tiolowymi nawet w najwyższych stężeniach (do 1000 µg/ml) były nietoksyczne w stosunku do erytrocytów. Wszystkie krzemionki typu SBA były syntezowane z wykorzystaniem etanolu. Jak już wspomniano, każda modyfikacja powodowała redukcję aktywności hemolitycznej w porównaniu z krzemionką amorficzną.

W pracach wspomnianych wyżej badaczy wystąpiła również rozbieżność co do źródła pochodzenia aktywności hemolitycznej nanocząsteczek krzemionkowych. Slowing i wsp. [83] stwierdzili, że aktywność hemolityczna MSN związana jest z grupami silanolowymi powierzchni, zaś Yu i wsp. [89] stwierdzili, że jest ona związana z potencjałem zeta krzemionek.

W przypadku badanych przeze mnie mezoporowatych nanocząsteczek zaobserwowałam wpływ zarówno grup powierzchniowych krzemionek, jak i potencjału zeta na aktywność hemolityczną krzemionek. Najbardziej toksyczne względem erytrocytów były krzemionki SBA-NH₂, które mają najwyższy potencjał zeta (-5.6 mV) oraz krzemionka amorficzna o najniższym potencjale (-17,8 mV). W przypadku krzemionki amorficznej znaczny wpływ na hemotoksyczność mają również grupy silanolowe. Krzemionki mezoporowate na swojej powierzchni również posiadają grupy silanolowe, ale są one mniej liczne w wyniku modyfikacji – przyłączenia grup organicznych. Pandurangi i wsp. odnotowali korelację pomiędzy liczbą wolnych grup

silanolowych na powierzchni a aktywnością hemolityczną krzemionek [93]. W moich badaniach zaobserwowałam, iż wszelkie modyfikacje powierzchni krzemionek zapobiegają oddziaływaniu grup silanolowych z błonami komórkowymi i w efekcie obniżają aktywność hemolityczną nanocząsteczek. Podobne efekty odnotowali Pavan i wsp. [94], a także Yildirim i wsp. [95] w swojej pracach opisujących wpływ modyfikowanych krzemionek na ich biokompatybilność we krwi.

Lin i Haynes badali aktywność hemolityczną kilku MSN o różnych średnicach (pomiędzy 25 a 225 nm) i stwierdzili, że zwiększenie rozmiaru cząstek obniża aktywność hemolityczną do pewnego stopnia [96]. Ponadto, Yu i wsp. wykazali, że podłużne (o strukturze pręta) nanocząsteczki krzemionkowe powodują niższą hemolizę niż te o kształcie kulistym [90]. Niemniej jednak, w każdym wspomnianym przypadku, niemodyfikowane powierzchniowo mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe powodowały znaczną hemolizę, zwłaszcza przy wysokich stężeniach. Zgodnie z moimi badaniami także wcześniejsze badania innych autorów pokazywały, że krzemionka amorficzna powoduje znacznie wyższą hemolizę w porównaniu do mezoporowatej krzemionki typu MCM-41 [84, 85], co przypisuje się większej reaktywnej powierzchni kontaktującej się z błoną komórkową krzemionki amorficznej w porównaniu do mezoporowatej [90]. Poprzednie porównawcze badania biologiczne wykazały również znaczące różnice pomiędzy mezoporowatymi i nieporowatymi krzemionkami. Zarówno MCM-41, jak i SBA-15, katalizowały utlenianie adrenaliny, a nieporowate krzemionki nie wykazały jakiegokolwiek aktywności katalitycznej. Ta duża różnica spowodowana jest możliwością generowania rodników tlenowych wewnątrz mezoporów [97]. W moich badaniach także zaobserwowałam różnice pomiędzy materiałami porowatymi (krzemionki mezoporowate), a nieporowatymi (krzemionka amorficzna). Co więcej, dla wszystkich nanocząsteczek, odnotowałam zależność aktywności hemolitycznej od stężenia krzemionek i czasu ekspozycji.

Elementem potwierdzającym znaczny wpływ grup powierzchniowych na aktywność hemolityczną krzemionek jest przeprowadzone przeze mnie doświadczenie badające stopień hemolizy wywoływanej przez MSN w obecności albuminy surowicy człowieka. Cząsteczki HSA tworzyły na powierzchni swoistą warstwę izolującą grupy silanolowe krzemionek od erytrocytów. Zablockowanie powierzchni MSN powodowało

znaczący spadek stopnia hemolizy. Podobne obserwacje podczas doświadczeń zanotowali Shia i wsp. [98] oraz Yildirim i wsp. [94]. Odnotowano kilka strategii prowadzących do obniżenia aktywności hemolitycznej krzemionek (zarówno mezoporowatych, jak i nieporowatych). Zbadano między innymi adsorpcję do powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych poli-N-tlenku 2-winylopirydyny [99, 100], białek i lipidów [97, 101], chlorochiny [102, 103], chlorku glinu i mleczanu aluminium [101], a także zastąpienie grup hydroksylowych trimetylosilanowymi [104].

Liczne wspomniane badania podkreślają, że to właśnie powierzchnia mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych jest jednym z dominujących czynników decydujących o oddziaływaniu ze składnikami krwi, zatem potrzebne są systematyczne badania kompatybilności nowych, zmodyfikowanych krzemionek posiadających grupy jonowe, hydrofobowe lub polarne na swojej powierzchni.

Przeprowadzone przeze mnie obserwacje mikroskopowe pokazały, iż wszystkie badane krzemionki ulegają agregacji. Także ten proces ma wpływ na hemolizę, która może nastąpić w wyniku uszkodzenia błony komórkowej krwinki czerwonej. Im większa jest powierzchnia agregatu oddziałująca z błoną erytrocytu tym większe odkształcenia, a co za tym idzie stopień hemolizy będzie wyższy [105]. Niewielkie stężenia krzemionek w roztworze sprawiają, że proces tworzenia się agregatów jest wolniejszy – oddziaływanie z błoną komórkową słabsze, a więc obserwowana przeze mnie aktywność hemolityczna była niewielka. Jednakże zastosowanie stężeń wyższych (powyżej 500 µg/ml) powodowało nasilenie hemotoksyczności.

Powierzchnia białek nie jest jednorodna i zawiera równocześnie naładowane, polarne i hydrofobowe ugrupowania. Ze względu na różne grupy powierzchniowe białka mogą łatwo wchodzić w reakcje z nanocząsteczkami poprzez wiele oddziaływań: jonowe, hydrofobowe oraz przez wiązania wodorowe. W konsekwencji, gdy nanocząsteczki są wstrzykiwane do krwi, ich powierzchnia szybko przykrywa się warstwą białek licznie obecnych we krwi, taka warstwa nazywana jest „koroną białkową” [106, 107]. Dla wielu zastosowań biomedycznych formowanie się takiej białkowej warstwy na powierzchni krzemionek jest niepożądane, ponieważ zwiększa ono wychwyt nanocząsteczek przez komórki układu odpornościowego, co w efekcie zmniejsza czas krążenia MSN we krwi. W celu efektywnego wykorzystania nanocząsteczek

oddziaływanie białek z powierzchnią krzemionek powinno zostać możliwie silnie zredukowane [108]. Glikol polietylenowy (PEG) jest jedną z lepiej przebadanych i równocześnie skutecznych modyfikacji zapobiegających oddziaływaniu powierzchni nanocząsteczek z białkami. Dzieje się tak, ponieważ PEG ma hydrofilową i elastyczną naturę [109]. Naukowcy z dwóch zespołów He i wsp. [90] oraz Wang i wsp. [110] wskazali, że przyłączanie białka na powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych może zostać zmniejszone przez zmodyfikowanie ich powierzchni powłokami z PEGu. Yildirim i wsp. otrzymali podobne wyniki w redukcji przyłączania białek do krzemionek dzięki modyfikacji ich powierzchni małymi, organokrzemowymi ligandami metylofosfonianu propylu [94]. Także w moich badaniach, wszystkie zastosowane powierzchniowe modyfikacje sprawiały, iż mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe oddziaływały z albuminą surowicy człowieka tylko w pewnym stopniu.

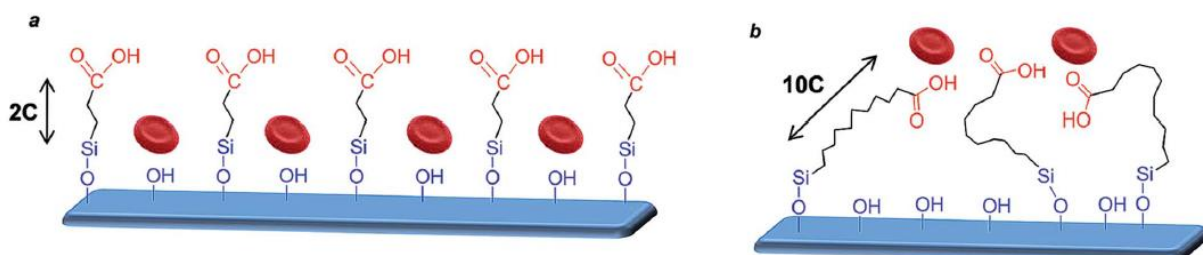
Adsorpcja małych cząsteczek do wnętrza porów jest zjawiskiem pożądanym i związanym z potencjalną możliwością przenoszenia leków przez krzemionki. Taka unikatowa właściwość mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych związana jest z obecnością w ich strukturze licznych porów, których średnica może być determinowana podczas syntezy. Znaczący wpływ na adsorpcję różnych cząsteczek (np. leków czy znaczników fluorescencyjnych) do wnętrza porów mają parametry geometryczne porów. Wnikać do wnętrza porów mogą jedynie te substancje, których średnica krytyczna, czyli średnica okręgu opisanego na najmniejszym przekroju cząsteczki, jest mniejsza niż średnica porów danego materiału [111, 112]. W zależności od wielkości porów występują różne procesy [113]. W przypadku mezoporów siły adsorpcyjne nie działają w całej ich objętości, ale tylko w pewnej odległości od ścianek nanocząsteczki. Wraz ze wzrostem rozmiaru porów siły te maleją. Równocześnie zwiększa się udział oddziaływań międzycząsteczkowych [112, 114].

W badanych przeze mnie nanocząsteczkach krzemionkowych średnica porów waha się od 2,19 nm do 3,12 nm dla krzemionek SBA-OH, SBA-SH, SBA-COOH oraz 6,30 nm dla SBA-COOH. Tak ściśle określone rozmiary porów zapewniają maksymalną selektywność oraz wysoką pojemność adsorpcyjną nanocząsteczek [113]. Można wyróżnić dwa rodzaje wnikania cząsteczek do wnętrza porów: adsorpcja pełna, gdy jedne cząsteczki przechodzą przez pory do ich wnętrza, a inne, charakteryzujące się

większymi rozmiarami – nie oraz adsorpcja częściowa – gdy do wnętrza porów wnika część cząsteczki, np. jeden łańcuch białka [115].

W badaniach zaobserwowałam, iż ilość zaadsorbowanej przez nanocząsteczki krzemionkowe hemoglobiny zwiększała się w czasie i wraz ze wzrostem stężenia krzemionek. Wyniki te jasno pokazały przewagę krzemionki z grupami karboksylowymi nad pozostałymi badanymi nanocząsteczkami. Wydajność wychwytu przez SBA-COOH jest trzy do siedmiu razy lepsza od adsorpcji przez inne krzemionki. SBA-COOH w najwyższym stężeniu (1000 µg/ml) zmniejsza ilość hemoglobiny w roztworze o więcej niż 50% ciągu dwóch godzin, natomiast po upływie 24 godzin prawie 90% hemoglobiny jest zaadsorbowanej.

Warto zwrócić uwagę, że na właściwości adsorpcyjne nanocząsteczek wpływ ma również łącznik pomiędzy powierzchnią krzemionki a grupą karboksylową (Rysunek 11). SBA-COOH posiada łącznik o długości dwóch węgli. Dla porównania, analogiczne nanocząsteczki SBA-FA-COOH mają łącznik o długości dziesięciu węgli i są mniej efektywne w adsorbowaniu cząsteczek hemoglobiny niż SBA-COOH [67]. W najwyższym stężeniu SBA-FA-COOH (1000 µg/ml) wydajność adsorpcji nie przekroczyła 18%, podczas gdy dla SBA-COOH obserwowano wychwyt na poziomie 90%.



Rysunek 11. Zależność dostępu do powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych od długości łącznika **a)** SBA-COOH, **b)** SBA-FA-COOH [67].

W przeciwieństwie do niewielkich porów SBA-OH, SBA-SH oraz SBA-NH₂, duża średnica porów krzemionki SBA-COOH, która jest większa niż 6 nm wystarczy, aby cząsteczki hemoglobiny o rozmiarach 6,5 x 5,3 x 5,4 nm [116] zmieściły się w tych przestrzeniach. Średnica porów SBA-FA-COOH również osiąga podobny wymiar

(6,15 nm), jednakże niewielką pojemność adsorpcyjną tłumaczy po pierwsze niski wskaźnik liczby grup funkcyjnych przyłączonych do powierzchni krzemionki (0,85 mmol/g w porównaniu z 3,88 mmol/g dla SBA-COOH) oraz, po drugie, hydrofobowa natura łańcuchów kwasu tłuszczowego, które mogą odpychać hemoglobinę od powierzchni krzemionki [67].

Zmniejszona aktywność hemolityczna SBA-COOH nie odzwierciedla faktycznej toksyczności tej krzemionki w stosunku do erytrocytów. Silna adsorpcja hemoglobiny do wnętrza mezoporów jest przyczyną nieprecyzyjnego określenia aktywności hemolitycznej tych nanocząsteczek.

Bardzo ważnym procesem podczas podawania leków w obecności nanocząsteczek do organizmu jest oddziaływanie nośników z białkami. W moich badaniach jako białko modelowe została wybrana albumina surowicy ludzkiej (HSA), która jest najliczniej występującym w osoczu białkiem (55-65% wszystkich białek osocza) [117]. W celu zbadania oddziaływania sfunkcjonalizowanych krzemionek typu SBA z HSA został przeprowadzony szereg doświadczeń: badania dichroizmu kołowego, wygaszanie fluorescencji albuminy oraz wolnego tryptofanu, a także adsorpcja albuminy przez nanocząsteczki.

Metoda dichroizmu kołowego jest bardzo wrażliwa na wszelkie zmiany w drugorzędowej strukturze białek wywoływane przez ich wiązanie z innymi cząsteczkami [118]. Zmiany w strukturze białek wpływają na ich aktywność, dlatego też poznanie tych zmian jest bardzo ważne. Wykonane przeze mnie badania CD wskazały, iż najsilniejsze zmiany struktury HSA występują podczas oddziaływania z krzemionką SBA-COOH. Oddziaływania te są silniejsze niż dla krzemionki SBA-OH nieposiadającej modyfikacji organicznej. Wynik ten może wskazywać, że tworzenie korony białkowej na powierzchni mezoporowatych nanocząsteczek nie dotyczy wyłącznie krzemionek „gołych” – posiadających tylko grupy hydroksylowe. Występowanie innych grup funkcyjnych może prowadzić do bardziej korzystnych oddziaływań i lepszego dopasowania białek do powierzchni nanocząsteczek [119].

Albumina surowicy ludzkiej posiada tylko jeden tryptofan zlokalizowany w pozycji 214 subdomeny IIA [120]. To sprawia, że analizy fluorescencyjne HSA są łatwiejsze

w interpretacji. Pomiar intensywności fluorescencji reszt tryptofanu czystej albuminy i po dodaniu krzemionek pozwoliły określić zmiany konformacyjne HSA. Emisja fluorescencji przesuwana się ku czerwieni w roztworach bardziej polarnych z powodu strat energii w stanie wzbudzonym, natomiast w roztworach mniej polarnych obserwujemy przesunięcie w kierunku niebieskim [121]. Tę właściwość można wykorzystać do badania zmian strukturalnych białka. Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że krzemionkami mezoporowatymi najsilniej wygaszającymi tryptofan albuminy były nanocząsteczki SBA-OH. Te najsilniejsze oddziaływania najprawdopodobniej wywołane są wpływem grup Si-OH i Si-O-Si, które są jedynymi grupami występującymi w krzemionce SBA-OH. Powierzchnia pozostałych krzemionek jest izolowana od białka występującego w roztworze poprzez grupy organiczne, wówczas w oddziaływaniu z HSA biorą udział jedynie grupy funkcyjne zlokalizowane na końcu łączników. Dla wszystkich mezoporowatych krzemionek zaobserwowałam lekkie przesunięcie maksimum emisji w kierunku fal krótszych. Ta zmiana pokazuje, że środowisko, w którym znajdował się tryptofan stawało się mniej polarne po dodaniu krzemionek. Otrzymane wyniki pokazały, że wygaszaniu fluorescencji HSA towarzyszyły zmiany konformacji białka. Obniżenie polarności wynika prawdopodobnie z oddziaływania grup organicznych krzemionek i hydrofobowych mostków siloksanowych.

Wyliczenie stałych Sterna-Volmera pozwoliło określić dostępność fluoroforu dla wygaszacza [122]. Najwyższą stałą otrzymano dla krzemionki SBA-OH, co wskazuje na najsilniejsze oddziaływanie z albuminą. Dla wszystkich krzemionek obserwowano dynamiczny mechanizm wygaszania albuminy dla stężeń nanocząsteczek nieprzekraczających 200 µg/ml. Jednakże złożoność układu polegająca na możliwości oddziaływania krzemionek z albuminą zarówno na powierzchni zewnętrznej, jak i wewnętrznej oraz tworzenie się agregatów pozwala sugerować również bardziej złożony mechanizm wygaszania. Wykresy Sterna-Volmera zakrzywiały się w dół (tzw. „downward-curving”) przy bardzo wysokich stężeniach nanocząsteczek krzemionkowych. Takie zakrzywienie może wskazywać na istnienie dwóch populacji cząsteczek: dostępnych dla wygaszacza (cząsteczek korony białkowej związanych z powierzchnią krzemionek) oraz niedostępnych dla wygaszacza, które znajdują się w pewnej odległości od powierzchni krzemionki.

Badania adsorpcji albuminy zostały przeprowadzone w celu lepszego zrozumienia oddziaływań pomiędzy białkami a krzemionkami. Adsorpcja HSA nieznacznie rosła w czasie, jednakże nawet po 24 godzinach inkubacji i dla najwyższego zastosowanego stężenia nanocząsteczek (1000 $\mu\text{g/ml}$) nie przekroczyła 25%. Wynik ten wskazuje, że mezoporowate krzemionki są w stanie adsorbować albuminę jedynie do pewnego stopnia i to wyłącznie na zewnętrznej powierzchni. Najprawdopodobniej dzieje się tak z powodu braku lepszej dostępności do powierzchni i porów. Jedynie krzemionka z grupami karboksylowymi SBA-COOH oddziaływała z albuminą w większym stopniu. Wynika to z znacznie większego rozmiaru porów tej krzemionki (6,3 nm) w porównaniu z pozostałymi nanocząsteczkami, których średnica porów wynosiła od 2,3 do 3,2 nm.

Na oddziaływanie krzemionek z albuminą ma wpływ morfologia nanocząsteczek: wielkość porów oraz rodzaj grup funkcyjnych i obecność łańcuchów organicznych. W literaturze odnotowano podobne obserwacje [123]. Warto podkreślić, że także wynik tych badań (adsorpcja białka na poziomie maksymalnie 25%) potwierdza formowanie się korony białkowej na powierzchni krzemionek. Równocześnie oznacza to, że taka ilość białka była wystarczająca do pokrycia całej powierzchni mezoporowatych nanocząsteczek. Fakt ten potwierdza omówione już badanie aktywności hemolitycznej krzemionek w obecności HSA, gdy dodanie białka całkowicie ją redukowało. Pełne pokrycie krzemionek albuminą sprawia, że stają się one nowymi cząsteczkami i zyskują odmienne właściwości, co pozwala uzyskać lepszą biokompatybilność nanocząsteczek i obniżyć ich aktywność hemolityczną [106, 124, 125].

Kolejnym niezwykle ważnym aspektem wymagającym dokładnego zbadania, zanim mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe znajdą praktyczne zastosowanie, jest cytotoksyczność tych materiałów. Musi ona zostać jasno określona przed podjęciem jakichkolwiek badań *in vivo*. Liczne badania udowodniły, że istnieją ogromne różnice w cytotoksyczności różnych rodzajów nanocząsteczek krzemionkowych, z uwagi na dużą zmienność ich właściwości fizykochemicznych [126]. Krzemionki mogą wywoływać różne reakcje biologiczne ze względu na ładunki powierzchniowe, hydrofilowość, morfologię (rozmiary i kształty), zdolności agregowania, biotrwałość czy dawkę [127, 128]. Dokładny mechanizm indukowania przez nanocząsteczki krzemionkowe śmierci

komórek wciąż nie jest znany, jednakże do tej pory zaproponowano kilka uzasadnień biologicznych [129, 130].

Cytotoksyczność krzemionek mezoporowatych oraz krzemionki amorficznej zbadalam na komórkach prawidłowych i nowotworowych. Amorficzna krzemionka okazała się najbardziej toksyczna względem każdej linii komórkowej już w najniższych użytych stężeniach w porównaniu z odpowiadającymi stężeniami krzemionek mezoporowatych. Toksyczność amorficznej krzemionki była najwyższa w stosunku do prawidłowej linii B14 oraz nowotworowej linii komórkowej 1301, dla tych komórek żywotność została zredukowana do około 20% przy stężeniu 1000 µg/ml. Wobec nowotworowych linii komórkowych HL60 oraz BRL krzemionka amorficzna wykazywała natomiast znacznie niższą toksyczność (przy stężeniu 1000 µg/ml odpowiednio 50% i 70%). Wynik ten wskazuje na ogromny wpływ rodzaju linii komórkowej, wobec której badana jest toksyczność krzemionek. Niemniej jednak w porównaniu z mezoporowatymi nanocząsteczkami krzemionkowymi, krzemionka amorficzna charakteryzuje się wyższą cytotoksycznością. Podobne obserwacje niejednokrotnie zostały odnotowane w literaturze [131, 132].

6. Podsumowanie

Głównym celem pracy było scharakteryzowanie mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych mając na uwadze ich potencjalne zastosowanie w naukach biomedycznych. Ważnym celem pracy było również określenie, czy mezoporowata struktura oraz modyfikacje powierzchniowe wpływają na polepszenie właściwości krzemionek.

Wykonane przeze mnie badania i uzyskane wyniki pozwalają twierdząco odpowiedzieć na pytanie postawione w celu pracy – **modyfikowanie powierzchni krzemionek poprzez przyłączanie grup funkcyjnych oraz łączników organicznych ma kluczowe znaczenie dla właściwości mezoporowatych nanocząsteczek.**

Toksyczność nanocząsteczek oraz ich biokompatybilność są niezwykle ważnymi parametrami podczas podawania leków wraz z nośnikami. Otrzymane wyniki wskazują, iż mezoporowata struktura krzemionek, obecność porów i grup powierzchniowych wpływa na obniżenie hemo- i cytotoksyczności. Przeprowadzenie doświadczeń w szerokich zakresach stężeń pozwoliło określić stężenia, w których nanocząsteczki krzemionkowe są nietoksyczne względem linii komórkowych oraz erytrocytów. Dla wszystkich czterech rodzajów krzemionek typu SBA można zdecydowanie stwierdzić, iż są one nietoksyczne zarówno wobec erytrocytów oraz innych ssaczych komórek prawidłowych w stężeniach mniejszych/równych 100 µg/ml. Badania pokazały, iż mezoporowate krzemionki są w stanie adsorbować albuminę jedynie do pewnego stopnia. Niewielkie oddziaływanie z białkiem zarówno na powierzchni zewnętrznej, jak i wewnątrz porów krzemionek jest kolejnym atutem tych nanocząsteczek.

Funkcjonalizowane krzemionki mają szansę stać się nośnikami dzięki możliwości łatwego przyłączania cząsteczek terapeutycznych do ich powierzchni bądź lokowania się ich w mezoporach. Przeprowadzone przeze mnie badania sugerują, że dzięki modyfikacjom można stworzyć krzemionki, które spełnią postawione przed nimi zadania. Po uwolnieniu leku w miejscu docelowym, „gołe” nanocząsteczki pozostają w kontakcie z krwią, dlatego też ich biokompatybilność jest niezwykle ważnym parametrem. Badane przeze mnie materiały różniły się pomiędzy sobą jedynie powierzchnią: posiadały różne modyfikacje organiczne oraz grupy powierzchniowe.

Dokładna analiza wszystkich wykonanych badań potwierdza, iż to właśnie grupy powierzchniowe mają kluczowy wpływ na zachowanie się mezoporowatych nanocząsteczek w stosunku do komórek prawidłowych oraz nowotworowych, a także erytrocytów i obecnych we krwi białek. Uzyskane wyniki pokazują, że z czterech badanych krzemionek, nanocząsteczki SBA-COOH posiadają największy potencjał aplikacyjny. Dzięki obecności grup karboksylowych na powierzchni są najbardziej toksyczne w stosunku do komórek nowotworowych, a także oddziałują z białkiem z najmniejszym stopniem spośród badanych materiałów. Występujące w nanocząsteczkach SBA-COOH znacznie większe, w porównaniu z pozostałymi krzemionkami, mezopory umożliwiają lokowanie w nich mniejszych cząsteczek.

7. Literatura

1. IUPAC, 1994, *Recommendations for the characterization of porous solids*. Pure Appl. Chem., 66, 1739-1758;
2. IUPAC, 1978, *Manual of symbols and terminology*. Pure Appl. Chem., 31, 578;
3. Yanagisawa T., Shimizu T., Kuroda K., Kato C., 1990, *The preparation of alkyltrimethylammonium-kanemite complexes and their conversion to microporous materials*. Bull. Chem. Soc. Jpn. 63, 988-992;
4. Yanagisawa T., Shimizu T., Kuroda K., Kato C., 1990, *Trimethylsilyl derivatives of alkyltrimethylammonium-kanemite complexes and their conversion to microporous SiO₂ materials*. Bull. Chem. Soc. Jpn. 63, 1535-1537;
5. Mobile Oil Co., Beck J.S., Chu C.T.W., Johnson I.D., Kresge C.T., Leonowicz M.E., Roth W.J., Vartuli J.C., 1991, WO patent 91/11390
6. Beck J.S., Vartuli J.C., Roth W.J., Leonowicz M.E., Kresge C.T., Schmitt K.D., Chu C.T.W., Olson D.H., Sheppard E.W., McCullen S.B., Higgins J.B., Schlenker J.L., 1992, *A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates*. J. Am. Chem. Soc., 114, 10834-10843;
7. Kresge C.T., Leonowicz M.E., Roth W.J., Vartuli J.C., Beck J.S., 1992, *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism*. Nature, 359, 710-712;
8. Burleigh M.C., Dai S., *Functionalized nanoporous adsorbents for environmental remediation*, in: Lu G.Q., Zhao X.S., Eds., 2004, *Nanoporous Materials: Science and Engineering*, Imperial College Press, Londyn
9. Zhao D.Y., Feng J.L., Huo Q.S., Melosh N., Fredrickson G.H., Chmelka B.F., Stucky G.D., 1998, *Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores*. Science 279: 548-552.
10. Zhao D.Y., Huo Q.S., Feng J.L., Chmelka B.F., Stucky G.D., 1998, *Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures*. J. Am. Chem. Soc., 120: 6024-6036
11. Gao C., Sakamoto Y., Sakamoto K., Terasaki O., Che S., 2006, *Synthesis and characterisation of mesoporous silica AMS-10 with a novel bicontinuous cubic Pn-3m symmetry*. Angew. Chem. Int. Ed 45: 4295-4298;
12. Vinu A., Gokulakrishnan N., Balasubramanian V.V., Alam S., Kapoor M.P., Ariga K., Mori T., 2008, *Three-dimensional ultralarge-pore Ia3d mesoporous silica with various pore diameters and their application in biomolecule immobilization*. Chem. Eur. J. 14: 11529-11538;
13. Atluri R., Hedin N., Garcia-Bennett A., 2009, *Nonsurfactant supramolecular synthesis of ordered mesoporous silica*. J. Am. Chem. Soc. 131: 3189-91.

14. Prouzet E., Cot F., Boissière C., Kooyman P.J., Larbot A., 2002, *Nanometric hollow spheres made of MSU-X-type mesoporous silica*. J. Material. Chem. 12: 1553-1556;
15. Galarneau A., Sartori F., Cangiotti M., Mineva T., Di Renzo F., Ottaviani M.F., 2010, *Sponge mesoporous silica formation using disordered phospholipid bilayers as template*. J. Phys. Chem. B 114, 2140-2152;
16. Hench L.L., Polak J., 2002, *Third-generation biomedical materials*. Science 295: 1014–1017;
17. Vallet-Regí M., 2006, *Revisiting ceramics for medical applications*. Dalton Trans., 44: 5211–5220;
18. Vallet-Regí M., 2006, *Ordered mesoporous materials in the context drug delivery systems and tissue engineering*. Chem. Eur. J. 12: 5934–5943;
19. Zhuravlev L.T., 2000, *The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model*. Colloids Surf. A 173: 1–38.
20. Rosenholm M., Sahlgren C., Linden M., 2011, *Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for combined therapeutic, diagnostic and targeted action in cancer treatment*. Curr. Drug Targets 12: 1166–1186;
21. Merisko-Liversidge E.M., Liversidge G.G., 2008, *Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds*. Toxicol. Pathol. 36: 43–48;
22. Lee J.E., Lee N., Kim H., Kim J., Choi S.H., Kim J.H., Kim T., Song I.C., Park S.P., Moon W.K., Hyeon T., 2010, *Uniform mesoporous dye-doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery*. J. Am. Chem. Soc. 132: 552–557;
23. Hillegass J.M., Blumen S.R., Cheng K., MacPherson M.B., Alexeeva V., Lathrop S.A., Beuschel S.L., Steinbacher J.L., Butnor K.J., Ramos-Niño M.E., Shukla A., James T.A., Weiss D.J., Taatjes D.J., Pass H.I., Carbone M., Landry C.C., Mossman B.T., 2011, *Increased efficacy of DOXorubicin delivered in multifunctional microparticles for mesothelioma therapy*. Int. J. Cancer 129: 233–244;
24. Wang T.T., Chai F., Fu Q., Zhang L., Liu H., Li L., Liao Y., Su Z., Wang C, Duanc B., Rene D., 2011, *Uniform hollow mesoporous silica nanocages for drug delivery in vitro and in vivo for liver cancer therapy*. J. Mater. Chem. 21: 5299–5306.
25. Meng H., Xue M., Xia T., Ji Z., Tarn D.Y., Zink J.I., Nel A.E., 2011, *Use of size and a copolymer design feature to improve the biodistribution and the enhanced permeability and retention effect of DOXorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model*. ACS Nano 5: 4131–4144;
26. Lu J., Tang F., Liu H., Liu T., Hao N., Chen D., Teng X., He J., 2010, *In vivo delivery of silica nanorattle encapsulated docetaxel for liver cancer therapy with low toxicity and high efficacy*. ACS Nano 4: 6874–6882;

27. Lu J., Liong M, Li Z., Zink J.I., Tamanoi F., 2010, *Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals*. Small 6: 1794–1805;
28. Lu J., Li Z., Zink J.I., Tamanoi F., 2012, *In vivo tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles based drug-delivery system: enhanced efficacy by folate modification*, Nanomedicine 8: 212–220;
29. Cao Y., DePinho R.A., Ernst M., Vousden K., 2011, *Cancer research: past present and future*. Nat. Rev. Cancer 11: 749–754;
30. Mamaeva V., Rosenholm J.M., Bate-Eya L.T., Bergman L., Peuhu E., Duchanoy A., Fortelius L.E., Landor S., Toivola D.M., Lindén M., Sahlgren C., 2011, *Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer*. Mol. Ther. 19: 1538–1546;
31. Wu Y., Cain-Hom C., Choy L., Hagenbeek T.J., de Leon G.P., Chen Y., Finkle D., Venook R., Wu X., Ridgway J., Schahin-Reed D., Dow G.J., Shelton A., Stawicki S., Watts R.J., Zhang J., Choy R., Howard P., Kadyk L., Yan M., Zha J., Callahan C.A., Hymowitz S.G., Siebel C.W., 2010, *Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors*. Nature 464: 1052–1057;
32. Moellering R.E., Cornejo M., Davis T.N., Del Bianco C., Aster J.C., Blacklow S.C., Kung A.L., Gilliland D.G., Verdine G.L., Bradner J.E., 2009, *Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex*. Nature 462: 182–188.
33. Verma I.M., Somia N., 1997, *Gene therapy - promises, problems and prospects.*, Nature 389: 239–242;
34. Mellott A.J., Forrest M.L., Detamore M.S., 2013, *Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering*. Ann. Biomed. Eng. 41: 446–468;
35. Slowing I.I., Trewyn B.G., Giri S., Lin V.S.-Y., 2007, *Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications*. Adv. Funct. Mater. 17: 1225–1236;
36. Xia T.A., Kovochich M., Liong M., Meng H., Kabehie S., George S., Zink J.I., Nel A.E., 2009. *Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs*. ACS Nano 3: 3273–3286;
37. Meng H.A., Liong M., Xia T., Li Z., Ji Z., Zink J.I., Nel A.E., 2010, *Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver DOXorubicin and P-glycoprotein siRNA to overcome drug resistance in a cancer cell line*. ACS Nano 4: 4539–4550;
38. Bharali D.J., Klejbor I., Stachowiak E.K., Dutta P., Roy I, Kaur N., Bergey E.J., Prasad P.N., Stachowiak M.K., 2005, *Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102: 11539–11544;

39. Kumar M., Sameti M., Mohapatra S.S., Kong X., Lockey R.F., Bakowsky U., Lindenblatt G., Schmidt H., Lehr C.M., 2004, *Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo*. J. Nanosci. Nanotechnol. 4: 876–881;
40. Li X., Zhang J.X., Gu H.C., 2011, *Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles*. Langmuir 27: 6099–6106;
41. Li X., Xie Q.R., Zhang J., Xia W., Gu H., 2011, *The packaging of siRNA within the mesoporous structure of silica nanoparticles*. Biomaterials 32: 9546–9556;
42. Solberg S.M., Landry C.C., 2006, *Adsorption of DNA into mesoporous silica*. J. Phys. Chem. B 110: 15261–15268;
43. Gao F., Botella P., Corma A., Blesa J., Dong L., 2009, *Monodispersed mesoporous silica nanoparticles with very large pores for enhanced adsorption and release of DNA*. J. Phys. Chem. B 113: 1796–1804;
44. Kim M.H., Na H.K., Kim Y.K., Ryoo S.R., Cho H.S., Lee K.E., Jeon H., Ryoo R., Min D.H., 2011, *Facile synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles with ultralarge pores and their application in gene delivery*. ACS Nano 5: 3568–3576;
45. Lage H., 2008, *An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem*. Cell. Mol. Life Sci. 65: 3145–3167.
46. Chen A.M., Zhang M., Wei D., Stueber D., Taratula O., Minko T., He H., 2009, *Co-delivery of DOXorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells*. Small 5: 2673–2677;
47. Taratula O., Garbuzenko O.B., Chen A.M., Minko T., 2011, *Innovative strategy for treatment of lung cancer: targeted nanotechnology-based inhalation co-delivery of anticancer drugs and siRNA*. J. Drug Target. 19: 900–914;
48. Huang I.P., Sun S.P., Cheng S.H., Lee C.H., Wu C.Y., Yang C.S., Lo L.W., Lai Y.K., 2011, *Enhanced chemotherapy of cancer using pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles to antagonize P-glycoprotein-mediated drug resistance*. Mol. Cancer Ther. 10: 761–769;
49. He Q., Gao Y., Zhang L., Zhang Z., Gao F., Ji X., Li Y., Shi J., 2011, *A pH-responsive mesoporous silica nanoparticles-based multi-drug delivery system for overcoming multi-drug resistance*. Biomaterials 32: 7711–7720;
50. Gary-Bobo M., Hocine O., Brevet D., Maynadier M., Raehm L., Richeter S., Charasson V., Looock B., Morère A., Maillard P., Garcia M., Durand J.O., 2012, *Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT*. Int. J. Pharm. 423: 5149–5150†

51. Gary-Bobo M., Mir Y., Rouxel C., Brevet D., Basile I., Maynadier M., Vaillant O., Mongin O., Blanchard-Desce M., Morère A., Garcia M., Durand J.O., Raehm L., 2011, *Mannose-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient two-photon photodynamic therapy of solid tumors*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50: 11425–11429;
52. Gary-Bobo M., Mir Y., Rouxel C., Brevet D., Hocine O., Maynadier M., Gallud A., Da Silva A., Mongin O., Blanchard-Desce M., Richeter S., Looock B., Maillard P., Morère A., Garcia M., Raehm L., Durand J.O., 2012, *Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma: drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy*. *Int. J. Pharm.* 432: 99–104;
53. Qiao X.F., Zhou J.C., Xiao J.W., Wang Y.F., Sun L.D., Yan C.H., 2012, *Triple-functional core-shell structured upconversion luminescent nanoparticles covalently grafted with photosensitizer for luminescent, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy in vitro*. *Nanoscale* 4: 4611–4623;
54. Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L., 2008, *Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics*. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60: 1615–1626;
55. Kamen B.A., Capdevila A., 1986, *Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5983–5987;
56. Antony A.C., 1992, *The biological chemistry of folate receptors*. *Blood* 79: 2807–2820;
57. Mamaeva V., Rosenholm J.M., Bate-Eya L.T., Bergman L., Peuhu E., Duchanoy A., Fortelius L.E., Landor S., Toivola D.M., Lindén M., Sahlgren C., 2011, *Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer*. *Mol. Ther.* 19: 1538–1546.
58. Tsai C.P., Chen C.Y., Hung Y., Chang F.H., Mou C.Y., 2009, *Monoclonal antibody-functionalized mesoporous silica nanoparticles (MSN) for selective targeting breast cancer cells*. *J. Mater. Chem.* 19: 5737–5743;
59. Zhu C.L., Song X.Y., Zhou W.H., Yang H.H., Wen Y.H., Wang X.R., 2009, *An efficient cell-targeting and intracellular controlled-release drug delivery system based on MSN-PEM-aptamer conjugates*. *J. Mater. Chem.* 19: 7765–7770;
60. Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J., 2010, *Targeting of drugs and nanoparticles to tumors*. *J. Cell Biol.* 188: 759–768;
61. von Maltzahn G., Park J.H., Lin K.Y., Singh N., Schwöppe C., Mesters R., Berdel W.E., Ruoslahti E., Sailor M.J., Bhatia S.N., 2011, *Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting*. *Nat. Mater.* 10: 545–552;
62. Shen S.C., Ng W.K., Shi Z., Chia L., Neoh K.G., Tan R.B., 2011, *Mesoporous silica nanoparticle-functionalized poly(methyl methacrylate)-based bone cement for effective antibiotics delivery*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22: 2283–2292;

63. Feng X., Liu J., Fryxell G. E., 1998, *Surface functionalized mesoporous material and method of making same*. United States 6326326 B1;
64. Timchalk C., Creim J.A., Sukwarotwat V., Wiacek R., Addleman R.S., Fryxell G.E., Yantasee W., 2010, *In vitro and in vivo evaluation of a novel ferrocyanide functionalized nanoporous silica decorporation agent for cesium in rats*. Health Phys. 99 : 420–429;
65. Suwalski A., Dabboue H., Delalande A., Bensamoun S.F., Canon F., Midoux P., Saillant G., Klatzmann D., Salvetat J.P., Pichon C., 2010, *Accelerated Achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles*. Biomaterials 31: 5237–5245;
66. Armstead A.L., Li B., 2011, *Nanomedicine as an emerging approach against intracellular pathogens*. Int. J. Nanomedicine 6: 3281–3293;
67. Ferenc M., Katir N., Miłowska K., Bousmina M., Majoral J.P., Bryszewska M., El Kadib A., 2015, *Haemolytic activity and cellular toxicity of SBA-15-type silicas: elucidating the role of the mesostructure, surface functionality and linker length*. J. Mater. Chem. B 3: 2714–2724;
68. El Kadib A., Katir N., Finiels A., Castel A., Marcotte N., Molvinger K., Biolley C., Gaveau P., Bousmina M., Brunel D., 2013, *Mesostructured fatty acid-tethered silicas: sustaining the order by co-templating with bulky precursors*. Dalton Trans. 42: 1591–1602;
69. Rosenholm J. M., Penninkangas A., Linden M., 2006, *Amino-functionalization of large-pore mesoscopically ordered silica by a one-step hyperbranching polymerization of a surface-grown polyethyleneimine*. Chem. Commun. 37: 3909–3911;
70. Webb J.D., MacQuarrie S., McEleney K., Crudden C. M., 2007, *Mesoporous silica-supported Pd catalysts: An investigation into structure, activity, leaching and heterogeneity*. J. Catal. 252: 97–109;
71. El Kadib A., McEleney K., Seki T., Wood T. K., Crudden C. M., 2011, *Cross-Coupling in the Preparation of Pharmaceutically Relevant Substrates using Palladium Supported on Functionalized Mesoporous Silicas*. ChemCatChem 3: 1281–1285;
72. El Kadib A., Molvinger K., Bousmina M., Brunel D., 2010, *Decoration of Chitosan Microspheres with Inorganic Oxide Clusters : Rational Design of Hierarchically Porous, Stable and Cooperative Acid-Base Nanoreactors*. J. Catal. 273: 147–155;
73. El Kadib A., Molvinger K., Cacciaguerra T., Bousmina M., Brunel D., 2011, *Chitosan templated synthesis of porous metal oxide microspheres with filamentary nanostructures*. Microporous Mesoporous Mater. 142: 301–307;
74. Malesa M., 2006, *Nanonapełniacze kompozytów polimerowych. Część II. Krzemionka*. Elastomery 2, 10-15;
75. Zou H., S. Wu, J. Shen, 2008, *Polymer/silica nanocomposites: preparation, characterization, properties, and applications*. Chem. Rev. 108: 3893-3957;

76. P.K. Jal, S. Patel, B.K. Mishra, 2004, *Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions*. Talanta. 62: 1005-1028;
77. K. Kupiec, P. Konieczka, 2007, *Charakterystyka, procesy chemicznej modyfikacji oraz zastosowanie krzemionki*. Ecol. Chem. Eng. 14: 473-487;
78. Krysztafkiewicz A., M. Maik, L. Domka, 1979, *Metody oznaczania grup silanolowych na powierzchni krzemionki*. Chemik, 32: 313-348;
79. Smoluchowski M., Graetz L. (Ed.), *Handbuch der Elektrizität und de Magnetismus* (2nd ed.), Barth, Verlag, Leipzig 1921, p. 366;
80. Hunter, R.J., *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Academic Press, UK 1988;
81. Fisichella M., Dabboue H., Bhattacharyya S., Saboungi M.-L., Salvétat J.-P., Hevor T., Guerin M., 2009, *Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes*. Toxicol. In Vitro 23: 697–703;
82. Vivian J.T., Callis P.R., 2001, *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins*. Biophys. J. 80: 2093-2109;
83. Klapetek P., Valtr M., Nečas D., Salyk O., Dzik P., 2011, *Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions*. Nanoscale Res. Lett. 6: 514;
84. Sharifi S., Behzadi S., Laurent S., Forrest M.L., Stroeve P., Mahmoudi M., 2012, *Toxicity of nanomaterials*. Chem. Soc. Rev. 41: 2323–2343;
85. Slowing I. I., Wu C. W., Vivero-Escoto J. L., Lin V. S., 2009; *Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells*. Small 5: 57–62;
86. Roitier Y., Ornatska M., Rammohan A. R., Balakrishnan J., Heine D. R., Minko S., 2008, *Interaction of nanoparticles with lipid membrane*. Nano Lett. 8: 941-944;
87. Owens III D. E., Peppas N. A., 2006, *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. Int. J. Pharm. 307: 93–102;
88. Aggarwal P., Hall J. B., McLeland C. B., Dobrovolskaia M. A., McNeil S. E., 2009, *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. Adv. Drug Delivery Rev. 61: 428–437;
89. Zhao Y., Sun X., Zhang G., Trewyn B. G., Slowing I. I., Lin V. S., 2011, *Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects*. ACS Nano 5: 1366–1375;
90. He Q., Zhang J., Shi J., Zhu Z., Zhang L., Bu W., Guo L., Chen Y., 2010, *The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses*. Biomaterials 31: 1085–1092;
91. Yu T., Malugin A., Ghandehari H., 2011, *Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity*. ACS Nano, 5: 5717–5728;

92. Sharma K. K., Asefa T., 2007, *Efficient Bifunctional Nanocatalysts by Simple Postgrafting of Spatially Isolated Catalytic Groups on Mesoporous Materials*. Angew. Chem., Int. Ed., 46: 2879–2882;
93. Pandurangi R.S., Seehra M.S., Razzaboni B.L., Bolsaitis P., 1990, *Surface and Bulk Infrared Modes of Crystalline and Amorphous Silica Particles: A Study of the Relation of Surface-Structure to Cytotoxicity of Respirable Silica*. Environ. Health Perspect. 86: 327–336;
94. Pavan C., Tomatis M., Ghiazza M., Rabolli V., Bolis V., Lison D., Fubini B., 2013, *In search of the chemical basis of the hemolytic potential of silicas*. Chem. Res. Toxicol. 26: 1188–1198;
95. Yildirim A., Ozgur E., Bayindir M., 2013, *Impact of mesoporous silica nanoparticle surface functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption*. J. Mater. Chem. B. 1: 1909–1920;
96. Lin Y. S., Haynes C. L., 2010; *Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity*. J. Am. Chem. Soc. 132: 4834–4842;
97. Tao Z., Wang G., Goodisman J., Asefa T., 2009, *Accelerated oxidation of epinephrine by silica nanoparticles*. Langmuir, 25: 10183–10188;
98. Shia J., Hedberg Y., Lundin M., Wallinder I. O., Karlsson H. L., Möller L., 2012, *Hemolytic properties of synthetic nano and porous silica particles: the effect of surface properties and the protection by the plasma corona*. Acta Biomater., 8: 3478–3490;
99. Nolan R.P., Langer A.M., Harington J.S., Oster G., Selikoff I.J., 1981, *Quartz hemolysis as related to its surface functionalities*. Environ Res. 26: 503–520;
100. Singh S.V., Viswanathan P.N., Rahman Q., 1983, *Interaction between erythrocyte plasma membrane and silicate dusts*. Environ Health Perspect. 51: 55–60;
101. Hadnagy W., Marsetz B., Idel H., 2003, *Hemolytic activity of crystalline silica – Separated erythrocytes versus whole blood*. Int. J. Hyg. Environ. Health, 206: 103–107;
102. Depasse J., *Interaction between silica and hydrophobic cations*. 1978, Br. J. Ind. Med. 35: 32–34;
103. Rabolli V., Thomassen L.C.J., Princen C., Napierska D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Hoet P.H., Huaux F., Kirschhock C.E.A., Martens J.A., Lison D., 2010, *Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types*. Nanotoxicology. 4: 307–318;
104. Gun'ko V., Galagan N., Grytsenko I., Zarko V., Oranska O., Osaulenko V., Bogatyrev V., Turov V., 2007, *Interaction of unmodified and partially silylated nanosilica with red blood cells*. Cent. Eur. J. Chem. 5: 951–969;

105. Thomassen L.C., Rabolli V., Masschaele K., Alberto G., Tomatis M., Ghiazza M., Turci F., Breynaert E., Martra G., Kirschhock C.E., Martens J.A., Lison D., Fubini B., 2011, *Model System to Study the Influence of Aggregation on the Hemolytic Potential of Silica Nanoparticles*. Chem. Res. Toxicol. 24: 1869–1875;
106. Aggarwal P., Hall J. B., McLeland C. B., Dobrovolskaia M. A., McNeil S. E., 2009, *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. Adv. Drug Delivery Rev., 61: 428–437;
107. Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K. A., Linse S., 2007, *Understanding the nanoparticle protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 2050–2055;
108. Cavadas M., Gonzalez-Fernandez A., Franco R., 2011, *Pathogen-mimetic stealth nanocarriers for drug delivery: a future possibility*. Nanomedicine, 7: 730–743;
109. Jeon S. I., Lee J. H., Andrade J. D., De Gennes P. G., 1991, *Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide I. Simplified theory*. J. Colloid Interface Sci. 142: 149–158;
110. Wang L. S., Wu C. L., Lu S. Y., Chang L. L., Teng I. T., Yang C. M., Ho J. A., 2010, *Biofunctionalized phospholipidcapped mesoporous silica nanoshuttles for targeted drug delivery: improved water suspensibility and decreased nonspecific protein binding*. ACS Nano 4: 4371–4379;
111. Chatterjee A., *Structure Property Correlations for Nanoporous Materials*. Taylor & Francis Group, New York 2010;
112. Sarbak Z., *Nieorganiczne materiały nanoporowate*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2009;
113. Thommes M., 2010, *Physical Adsorption Characterization of Nanoporous Materials*. Chem. Ing. Tech., 82: 1058-1073;
114. Dąbrowski A., 2001, *Adsorption – from theory to practice*. Adv. Colloid Interfac., 93: 135-224;
115. Stapf, S., 2006, *Porous materials: How molecules huddle in holes*. Nature Physics 2: 731 – 732;
116. Erickson H.P., 2009, *Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy*. Biol. Proced. Online. 11: 32-51
117. Adkins J.N., Varnum S.M, Auberry K.J., Moore R.J., Angell N.H., Smith R.D., Springer D.L., Pounds J.G., 2002, *Toward a Human Blood Serum Proteome: Analysis By Multidimensional Separation Coupled With Mass Spectrometry*. Mol. Cell. Proteomics 1: 947–955;
118. Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C., 2005, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochim. Biophys. Acta 1751: 119–139;

119. Shahabi S., Döscher S., Bollhorst T., Treccani L., Maas M., Dringen R., Rezwan K., 2015, *Enhancing Cellular Uptake and Doxorubicin Delivery of Mesoporous Silica Nanoparticles via Surface Functionalization: Effects of Serum*. ACS Appl. Mater. Interfaces. 7: 26880–26891;
120. Swaney J.B., Klotz I.M., 1970, *Amino acid sequence adjoining the lone tryptophan of human serum albumin. A binding site of the protein*. Biochemistry 9: 2570–2574;
121. Stryer L., 1968, *Fluorescence Spectroscopy of Proteins*. Science 162: 526–533;
122. Eftink M.R., *Fluorescence quenching reactions: probing biological macromolecular structures. w: Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*. Dewey T.G., Ed. NewYork, 1991.
123. Ma Z., Bai J., Wang Y., Jiang X., 2014, *Impact of Shape and Pore Size of Mesoporous Silica Nanoparticles on Serum Protein Adsorption and RBCs Hemolysis*. ACS Appl. Mater. Interfaces 6: 2431–2438.
124. Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G.J., Puentes V., 2010, *Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona*. ACS Nano 4: 3623 – 3632;
125. Lundqvist M., Stigler J., Cedervall T., Berggård T., Flanagan M.B., Lynch I., Elia G., Dawson K., 2011, *The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study*. ACS Nano 5: 7503–7509;
126. Fubini B., Hubbard A., 2003, *Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis*. Free Radic. Bio. Med. 34: 1507–1516;
127. Mollo L., Levresse V., Ottaviani M.F., ElloukAchard S., Jaurand M.C., Fubini B., 1997, *Study of the stability of a paramagnetic label linked to mesoporous silica surface in contact with rat mesothelial cells in culture*. Environ. Health Persp. 105: 1031–1036;
128. Nel A., Xia T., Madler L., Li N., 2006, *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science 311: 622–627;
129. Elias Z., Poirot O., Fenoglio I., Ghiazza M., Daniere M.C., Terzetti F., Darne C., Coulais C., Matekovits I., Fubini B., 2006, *Surface reactivity, cytotoxic, and morphological transforming effects of diatomaceous earth products in Syrian hamster embryo cells*. Toxicol. Sci. 91: 510–520;
130. Hamilton R.F., Thakur S.A., Holian A., 2008, *Silica binding and toxicity in alveolar macrophages*. Free Radic. Bio. Med. 44: 1246–1258;
131. Costantini L.M., Gilberti R.M., Knecht D.A., 2011, *The Phagocytosis and Toxicity of Amorphous Silica*. PLoS One. 6: e14647.
132. Napierska D., Thomassen L.C., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Martens J.A., Hoet P.H.. 2009, *Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells*. Small 5: 846–853j;

Streszczenie

Mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe są stosunkowo nowymi związkami. Od momentu pierwszej syntezy w 1992 roku ich potencjalne zastosowanie upatrywano w licznych, unikatowych właściwościach, które wynikają z ich struktury. Krzemionki posiadają liczne mezopory o jednolitej i regularnej wielkości, a ich objętość jest bardzo duża. Ponadto nanocząsteczki te charakteryzują się regularną wielkością oraz bardzo dużą powierzchnią zewnętrzną. Warto podkreślić ich silną bioaktywność, która wynika z obecności licznych grup funkcyjnych zarówno na zewnętrznej, jak i wewnętrznej powierzchni. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, iż krzemionki mogą być w łatwy sposób modyfikowane podczas syntezy, bądź w późniejszych etapach pracy z tymi materiałami. Umożliwia to dołączanie organicznych i nieorganicznych grup, łączników czy całych cząsteczek, które pozwalają osiągnąć pożądane właściwości mezoporowatych krzemionek. Szeroka charakterystyka poszczególnych materiałów mezoporowatych przyczynia się zatem do ich lepszego poznania, określenia ich potencjalnego użycia w naukach biomedycznych i wyselekcjonowania najlepszych materiałów do poszczególnych zastosowań.

Niniejsza praca jest charakterystyką czterech typów mezoporowatych nanocząsteczek krzemionkowych: SBA-OH, SBA-SH, SBA-NH₂ oraz SBA-COOH. Nanocząsteczki te różnią się między sobą grupami powierzchniowymi oraz modyfikacjami organicznymi, a także wielkością porów. Krzemionki te zostały także porównane z krzemionką amorficzną. Celem niniejszej rozprawy było określenie czy i w jakim stopniu modyfikacje organiczne oraz grupy funkcyjne wpływają na właściwości krzemionek. Badano wpływ mezoporowatych nanocząsteczek na czerwone komórki krwi poprzez ocenę stopnia hemolizy w próbkach erytrocytów oraz erytrocytów w obecności albuminy surowicy człowieka (HSA). Ponadto określono zdolność krzemionek do adsorbowania hemoglobiny (Hb). W pracy badano również cytotoksyczność krzemionek względem linii komórkowej prawidłowej (B14 – fibroblasty chomika chińskiego) oraz linii nowotworowych (HL60 – ludzkie komórki ostrej białaczki szpikowej, 1301 – ludzkie komórki ostrej białaczki komórek T oraz BRL – szczurze komórki raka wątroby) wykorzystując testy MTT oraz AlamarBlue. Kolejnym etapem były

badania oddziaływania mezoporowatych krzemionek z białkiem – albuminą surowicy ludzkiej z wykorzystaniem dichroizmu kołowego, gaszenia fluorescencji HSA oraz wolnego L-tryptofanu, a także oznaczenia adsorpcji albuminy. Ostatnim etapem pracy było poznanie właściwości powierzchni krzemionek poprzez badanie rozmiaru porów, ich objętości oraz powierzchni właściwej nanocząsteczek. Ponadto zbadano potencjał zeta oraz za pomocą mikroskopu sił atomowych AFM oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego TEM obserwowano morfologię krzemionek.

Wszystkie cztery typy badanych nanocząsteczek wpływały na czerwone komórki krwi, jednak w różnym stopniu: krzemionki z grupami aminowymi powodowały najsilniejszą hemolizę. Jednakże najbardziej szkodliwe działanie miała krzemionka amorficzna, która już w najniższych stężeniach powodowała wysoką hemolizę. Obecność albuminy powodowała obniżenie stopnia hemolizy do poziomu kontroli (erytrocytów nietraktowanych krzemionkami). Krzemionki typu SBA były toksyczne względem wszystkich badanych linii komórkowych, ale w znacznie niższym stopniu obniżały żywotność komórek niż krzemionka amorficzna. Dla mezoporowatych nanocząsteczek możliwe było określenie stężenia, dla którego nie obserwowano efektu hemolizy i cytotoksycznego. Stężenie to wynosi 100 g/ml.

Wszystkie mezoporowate krzemionki oddziaływały w niewielkim stopniu z albuminą i adsorbowały ją maksymalnie na poziomie 25%. Wykonane badania pozwoliły stwierdzić, iż na powierzchni krzemionek tworzy się korona białkowa, która przyczynia się do obniżenia stopnia hemolizy, jednakże do jej powstawania wystarczy jedynie pewna ilość zaadsorbowanego białka (25%). Pokrycie powierzchni nanocząsteczek białkiem sprawia, że zyskują one nowe – lepsze właściwości.

Obserwacje mikroskopowe pozwoliły stwierdzić, że nanocząsteczki krzemionkowe mają budowę prętową z dobrze widocznymi mezokanałami. Krzemionki na zastosowanych podłożach łatwo ulegały agregacji. Potencjał zeta krzemionek mezoporowatych wynosił od -5,6 mV dla SBA-NH₂ do -15 mV dla niemodyfikowanej SBA-OH. Oznacza to, iż wszelkie modyfikacje powierzchni przyczyniają się do podwyższenia tego parametru. Potencjał zeta krzemionki amorficznej był najniższy i wynosił -17,8 mV. Badania powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych pozwoliły oszacować powierzchnię właściwą, całkowitą objętość porów oraz ich średnicę. Wyniki

te były zgodne z wartościami uzyskanymi przez zespół El Kadiba tuż po syntezie. Oznacza to, że badane krzemionki są stabilne, a proces rozpuszczania w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS), a także działanie ultradźwięków nie wpływa na właściwości powierzchni tych nanocząsteczek.

Wszystkie badania oraz porównanie krzemionek mezoporowatych i krzemionki amorficznej pozwalają stwierdzić, iż zarówno struktura, jak i modyfikacje organiczne oraz przyłączanie grup powierzchniowych wpływają na właściwości tych materiałów. Znacznie niższa hemo- i cytotoksyczność, a także oddziaływanie z białkiem ukazują przewagę mezoporowatych krzemionek nad krzemionką amorficzną.

Streszczenie w języku angielskim

Mesoporous silica nanoparticles are relatively new compounds. Since their first synthesis in 1992, their potential use in biomedical science was sought due to their unique properties associated with their structure. Silicates have numerous mesopores of uniform and regular size, as well as a large volume. In addition, these nanoparticles are characterized by a regular particle size and a very large outer surface area. It is worth noting that they exhibit strong bioactivity, which is related to the presence of numerous functional groups on both the external and internal surfaces. Significant is the fact that the silica can be easily modified during or after their synthesis. This enables the attaching of organic and inorganic groups, linkers, or whole particles, which can grant the mesoporous silica nanoparticle various desired properties. A wide characterisation of the different mesoporous materials will contribute to their better knowledge, determine their potential use in biomedical sciences and will aid in selecting the best materials for specific applications.

This work characterises four types of mesoporous silica nanoparticles: SBA-OH, SBA-SH, SBA-NH₂, and SBA-COOH. These nanoparticles vary in surface groups, organic modifications and mesopore size. The SBA-type (mesoporous) silicates were also compared with the amorphous silica. The aim of this work was to determine how modifications and addition of organic functional groups affect the properties of the silicates. The effect of mesoporous nanoparticles on red blood cells by evaluating the haemolytic activity in samples of pure erythrocytes and erythrocytes in the presence of human serum albumin (HSA) was investigated. Moreover, the ability of the silicates to adsorb haemoglobin (Hb) was determined. In this study the cytotoxicity of silica nanoparticles relative to the normal cell line (B14 - Chinese hamster fibroblast) and tumour lines (HL60 – human promyelocytic leukaemia cells, 1301 – T cell lymphoblastic leukaemia, and BRL – Buffalo rat liver cells) were investigated using the MTT and AlamarBlue assays. The next step was to study the interactions between mesoporous silica nanoparticles and protein (human serum albumin) using circular dichroism,

fluorescence quenching of free HSA and L-tryptophan and the adsorption of albumin. The final step of the presented work was to determine the surface properties of the silicates: the pore size, their volume and surface area. Furthermore, the zeta potential was measured and the atomic force microscope (AFM) and transmission electron microscope (TEM) were used to observe the morphology of silica.

All four types of the tested nanoparticles affect the red blood cells, but at different levels: the silicates with amino groups cause the strongest haemolysis. However, the most harmful was amorphous silica, which even in the lowest concentrations caused high haemolysis. The presence of albumin decreased of haemolysis to the control level (erythrocytes untreated by silicates). The SBA-type silica nanoparticles were toxic to all tested cell lines, but they much less decreased cell viability than the amorphous silica. For mesoporous nanoparticles, it was possible to determine the concentration for which there was no haemo- and cytotoxic effect. This concentration is 100 µg/ml.

All mesoporous silica interacted slightly with albumin and adsorbed up to 25% of HSA. The completed investigations have shown that the reduction of haemolytic activity occurs due to the protein corona which is formed on the surface of the silica nanoparticles. For the formation of the protein corona only a certain amount of adsorbed protein (25%) is needed. Covering the surface of the silica nanoparticles by proteins makes that they gain new – better properties.

Microscopic observation revealed that the silica nanoparticles had a rod-like shape with clearly visible mesocanals. The silicates aggregated easily. The zeta potential of the mesoporous silica ranged from -5.6 mV for SBA-NH₂ to -15 mV for unmodified SBA-OH. This means that any surface modifications contribute to an increase in the zeta potential. The zeta potential of amorphous silica was the lowest and amounted to -17.8 mV. The examination of silica nanoparticles surface evaluated surface area, total pore volume and its diameter. These results were consistent with the values obtained by the team of El Kadib straight after synthesis. This means that the tested silicates are stable and the dissolution process in a buffered saline solution (PBS) or the use of ultrasounds do not affect the surface of the nanoparticles.

All the studies and the comparison of mesoporous silica with amorphous silica allow for the conclusion that structure, organic modifications and attachment of surface groups affect the properties of these materials. Significantly lower haemo- and cytotoxicity, as well as slightly increased interaction with the protein show the advantage of mesoporous silica nanoparticles over the amorphous one.