

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 hemo- 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.

Martgorzata Ferenc

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.

Martgorzata Ferenc