

Magdalena Ziąbka, Ewa Stodolak, Jan Chłopek*

Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Poland

* Corresponding author. E-mail: chlopek@agh.edu.pl

Otrzymano (Received) 28.01.2008

DEGRADOWALNE SKAFFOLDY KOMPOZYTOWE W CHIRURGII KOSTNEJ

Celem pracy było wytworzenie materiałów kompozytowych, które służyć mają jako porowate podłoża przeznaczone dla inżynierii tkankowej. Do konstrukcji tych materiałów zastosowano biopolimer alginian sodu (NaAlg), który w pierwszym etapie poddawano obróbce chemicznej (kąpiele żelujące w roztworze CaCl_2). Materiał formowano do postaci mikrosfer o średnicy $d \sim 300+400 \mu\text{m}$. Stanowił on jedną z faz porotwórczych dla syntetycznej matrycy polimerowej (PGLA). Drugim porogiem, jaki zastosowano w materiale kompozytowym, był wyjściowy proszek z alginianu sodu (ziarna wyjściowe o średnicy $d \sim 260 \mu\text{m}$). W następnym etapie materiał biopolimerowy (kulki alginianowe z $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ i wyjściowy proszek z NaAlg) wprowadzano do matrycy z kopolimeru laktydu i glikolidu (PGLA), otrzymując w ten sposób serię materiałów kompozytowych o różnym udziale masowym porogenu (60+63% wag. porogenu). Badano zachowanie się materiałów kompozytowych w środowisku biologicznym (badania degradacji *in vitro*), stosując jako medium immersyjne wodę i izotoniczny płyn wieloelektrolitowy (płyn Ringera). Stwierdzono, że szybkość degradacji kompozytu zależy od postaci porogenu. Szybszą degradację obserwuje się w przypadku zastosowania jako fazy porotwórczej proszku z alginianu sodu (monitoring przewodnictwa jonowego i pH płynu immersyjnego, obserwacje SEM). Dodatkowo wykazano (XRD), że zastosowana faza porotwórcza - kulki z alginianu wapnia ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$) są odpowiedzialne za krystalizację w porach materiału struktur apatytowych, a zatem otrzymany materiał może być uważany za materiał bioaktywny.

Słowa kluczowe: skaffoldy kompozytowe, alginiany, degradacja polimerów

COMPOSITE DEGRADABLE SCAFFOLDS IN BONE SURGERY

The aim of this study was to form composite materials which can be use as porous scaffolds for tissue engineering. The sodium alginate (powder form) was used as a biopolymer. In the first stage of the experiment alginate powder was chemically formed in bath gelation (CaCl_2 solution). During the formation process the spherical shape of the material was obtained. The diameter's range was between 300 and 400 μm . Alginate spheres were one of the porogene's phases which were used in the synthetic polymer matrix (PGLA). The second porogene which was used in the composite material was the initial alginate powder (grain's diameter, $d \sim 260 \mu\text{m}$). In the next stage the biopolymer material (alginate spheres with different diameters and alginate powder) were introduced into the polylactide-co-glicolide matrix (PGLA). In that way various series of composite materials with different volume fractions of porogene were obtained (PGLA/spheres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ with 60% of porogene and PGLA/spheres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /powder NaAlg with 63% of porogene). The behavior of composite materials in the biological environment was investigated (degradation test). As an immersion medium distilled water and an isotonic solution (Ringer) were used. On the basis of the pH medium changes and also from the observation of composite surfaces (optical microscope, SEM) the degradation rate was determined. Additionally, it was demonstrated (XRD) that porous materials such as spheres made of calcium alginate ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$) are responsible for forming an apatite structure in the material's pore. The obtained material can be considered as bioactive composite scaffolds.

Keywords: scaffold composite, alginate, polymer degradation

WPROWADZENIE

Materiały dla ortopedii od szeregu już lat stanowią jeden z głównych nurtów zainteresowania inżynierii biomedycznej. Szczególnie trudnym miejscem zastosowania implantów ortopedycznych są defekty chrząstnokostne - powstające na granicy stawu lub u nasady kości. Ze względu na swoje umiejscowienie zwane są często defektami międzyskawkowymi (ang. *multiple-tissue problem*). Tkanki te różnią się strukturą we-

wnętrzną, a także zadaniami, jakie mają pełnić w organizmie. Tkanka chrzęstna jest środowiskiem dużo bardziej wymagającym w porównaniu z tkanką kostną pod względem regeneracji. Chondrocyty różnią się trudniej niż komórki kostne. Dodatkowo chrząstka do prawidłowego wzrostu potrzebuje czynników stymulujących proliferację komórek. Miejsce uszkodzenia regeneruje się trudniej [1]. Biomateriały do leczenia takich uby-

ków muszą charakteryzować się odpowiednią porowatością (większa w obrębie tkanki kostnej, mniejsza w obrębie tkanki chrzęstnej), wielkością porów (pory mniejsze znajdować się powinny w obrębie miejsca ubytku chrzęstnego, natomiast pory o średnicy większej w obrębie ubytku kostnego), a także systemem ich połączenia [2]. Dodatkowe trudności stwarza zarówno samo miejsce ubytku, jego kształt, jak i dostępność naturalnych czynników wzrostu, stąd dobrym rozwiązaniem problemów chrzęstno-kostnych wydają się być materiały przeznaczone dla inżynierii tkankowej, czyli specyficzne podłoża przeznaczone do osadzania i namnażania w warunkach *in vitro* komórek pochodzących z ciała pacjenta (ang. *scaffold*). Wytwarzanie materiałów porowatych przeznaczonych na podłoża jest zagadnieniem znanym. Najczęściej tego typu materiały otrzymywane są z materiałów polimerowych, resorbowalnych, których celem jest stworzenie miejsca dla odbudowującej się tkanki przez zapewnienie odpowiedniej architektury (porowatości) prowadzącej do przerastania ubytku [3, 4]. Kolejną cechą takich materiałów jest ich określony czas funkcjonowania dopasowany do czasu regeneracji oraz fakt, że po spełnieniu swej funkcji implant taki zostaje zdegradowany, a tym samym nie jest potrzebna kolejna interwencja chirurgiczna (deimplantacja).

Niestety, niewiele implantów polimerowych spełnia tak ostre wymagania. Najczęściej trudności pojawiają się już z osiągnięciem odpowiedniej porowatości przy zachowaniu pożądanych właściwości mechanicznych. Stosowane metody (odlewanie, wymrażania, wymywania czy odwzorowywania - ang. *rapid prototyping*) otrzymywania materiałów porowatych zapewniają odpowiednią wprowadzić architekturę scaffoldu, jednakże obniżają znacznie wytrzymałość materiału tak, że służą jedynie jako wypełnienie miejsca ubytku, nie stymulując narastania uszkodzonej tkanki. Problem biokatywności materiału implantacyjnego rozwiązuje się jedynie w obszarze defektu kostnego, stosując jako modyfikator resorbowalnego polimeru hydroksyapatyt lub fosforan trójwapniowy [5, 6]. Dodatek bioaktywnych cząstek ceramicznych wspomaga odbudowę tkanki kostnej. Dużo większym problemem jest regeneracja uszkodzonej tkanki chrzęstnej. Jej przyspieszoną odbudowę można osiągnąć poprzez dodatek składników macierzy zewnątrzkomórkowej, które występują w naturalnej zdrowej tkance w postaci: siarczanu chondroityny, glikozaminoglikanów i kolagenu [7].

W pracy podjęto próbę wytworzenia porowatych materiałów kompozytowych przeznaczonych do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych. W tym celu wytworzono porogen, którym były kule z alginianu wapnia otrzymane na drodze wymiany jonowej ($\text{Na}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$) w kolejnych kąpielach żelujących [8]. Wcześniejsze prace na ten temat doprowadziły do wniosku, że zmienając średnicę kul alginianowych otrzymać można poprzez zastosowanie igieł o różnej średnicy ($d_1 = 0,5$ mm,

$d_2 = 0,7$ mm) [9]. Dodatkowym porogenem stosowanym w układzie kompozytowym był proszek z alginianu sodu (polisacharyd o budowie podobnej do składników glikozaminoglikanów). Materiały otrzymano metodą dwustopniowego odlewania: w pierwszym etapie odlewano folie polimerowe ze zdyspergowaną fazą NaAlg, a w drugim stopniu dodawano kule z alginianu wapnia. W ten sposób otrzymano gradient porowatości w macierzy polimerowej (PGLA). Zastosowane porogeny stwarzają szanse do szybszej odbudowy tkanki chrzęstnej (tam gdzie fazą zdyspergowaną jest proszek z alginianu sodu), a odpowiednia wielkość porów - powstających w trakcie usuwania kul z alginianu wapnia - zapewnia korzystne warunki dla adhezji i proliferacji (namnażanie się) komórek kostnych. Dodatkową zaletą zastosowanego porogenu ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$) jest obecność jonów wapnia, które stanowią zarodki krystalizacji struktur apatytowych widocznych w trakcie obserwacji mikroskopowych. Ich skład chemiczny potwierdzony został pomiarami rentgenograficznymi (XRD). Wytworzone materiały kompozytowe stosowane mogą być jako podłoża *in vitro*, ale także możliwe jest ich stosowanie jako rusztowań powstających *in situ* w miejscu uszkodzenia. Dzięki temu materiały te zachowują odpowiednie właściwości mechaniczne, nie tracąc na aktywności biologicznej (obecność porofora stymuluje zarówno tkankę chrzęstną - NaAlg, jak i kostną - $\text{Ca}(\text{Alg})_2$).

MATERIAŁY I METODY

Jednym z zastosowanych porogenów w otrzymywanych materiałach dla inżynierii tkankowej były kule alginowe otrzymane z soli sodowej kwasu alginowego (NaAlg). Do wytworzenia kul alginowych zastosowano biopolimer w postaci proszku (NovaMatrix-Biopolimer, Norwegia) o zawartości ok. 60÷65% monomeru G (reszty kwasu guluronowego). Formowanie biopolimeru do postaci kul przeprowadzono, rozpuszczając sól sodową alginianu w 0,3% roztworze NaCl. Roztwór NaAlg poddano homogenizacji w podwyższonej temperaturze (ok. 40÷60°C), uzyskując stężenie soli 1,6% NaAlg. Proces żelowania przeprowadzono, wkraplając przygotowany roztwór alginianu sodu do kąpieli żelującej, którą stanowił 8% roztwór soli CaCl_2 . Stosując igły o różnych średnicach ($d_1 = 0,5$ mm i $d_2 = 0,7$ mm), otrzymano dwa rodzaje kul alginowych o różnej średnicy. Kule z alginianu wapnia zostały poddane procesowi suszenia w temperaturze 60°C przez 12 godzin. Obserwacje powierzchni kul alginowych i skurczu materiału na skutek suszenia prowadzono w mikroskopie stereoskopowym Opticon 300 (Carl Zeiss, Niemcy). Na podstawie obserwacji i pomiarów średnicy kul oszacowano skurcz materiału (tab. 1).

Materiał biopolimerowy poddano badaniom degradacji w warunkach *in vitro*: woda/37°C/2 m-ce oraz płyn Ringera/37°C/2 m-ce. Stopień degradacji kontro-

lowano przez pomiar przewodnictwa płynu immersyjnego (wody destylowanej, konduktometr Elmetron typ CC-315) lub zmian pH płynu Ringera (pH-metr Elmetron typ CP-315). Równolegle prowadzono obserwacje mikroskopowe powierzchni kul alginowych inkubowanych w płynach immersyjnych (skaningowy mikroskop elektronowy Joel 5400).

TABELA 1. Średnica i skurcz kul alginowych
TABLE 1. Diameter and air-dried shrinkage of alginate spheres

	Roztwór żelujący CaCl_2
	1,6% NaAlg
Średnica kulek mokrych ($d_1 = 0,5 \text{ mm}$)	$0,53 \pm 0,04$
Średnica kulek suchych ($d'_1 = 0,5 \text{ mm}$)	$0,33 \pm 0,03$
Średnica kulek mokrych ($d_2 = 0,7 \text{ mm}$)	$0,56 \pm 0,03$
Średnica kulek suchych ($d'_2 = 0,7 \text{ mm}$)	$0,38 \pm 0,05$
Skurcz kulek (d_1 , %)	$24,14 \pm 2,2$
Skurcz kulek (d_2 , %)	$30,67 \pm 2,4$

W drugim etapie badań zaprojektowano dwa rodzaje skaffoldów, w których osnowę stanowił kopolimer laktydu (83%) i glikolidu (17%). Jako fazę modyfikującą zastosowano otrzymane wcześniej: kule alginianowe ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$) oraz alginian sodu (NaAlg) w postaci proszku. Badaniom degradacji poddano następujące materiały kompozytowe: PGLA/kule $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /NaAlg oraz PGLA/kule $\text{Ca}(\text{Alg})_2$. Jako materiał odniesienia stosowano folie z czystego polimeru (PGLA).

Otrzymane skaffoldy kompozytowe inkubowano w buforze fosforanowym (PBS). Stopień degradacji materiałów oceniano na podstawie zmian pH płynu immersyjnego (PBS/ $37^\circ\text{C}/3 \text{ m-ce}$) równocześnie prowadzono obserwacje mikroskopowe (Carl Zeiss, Niemcy, mikroskop optyczny, SEM Joel 5400).

WYNIKI I DISKUSJA

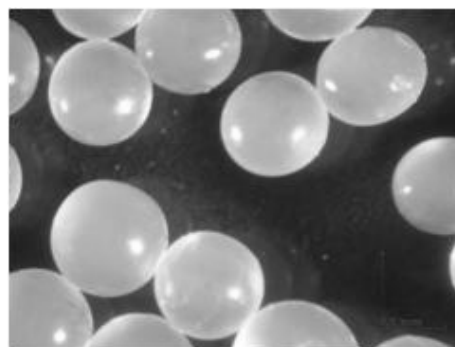
Otrzymywanie i degradacja kul alginowych

Kule alginianowe powstają w wyniku reakcji wymiany jonowej: prekursorowego roztworu alginianu sodu w roztworze dwudodatniej soli CaCl_2 . W trakcie wymiany jonu dochodzi do zmiany struktury biopolimeru, która z prostoliniowej zmienia się w kulistą (ang. *egg-box*). Mechanizm ten ułatwia formowanie się kul alginianowych, których średnica wyjściowa waha się w zależności od zastosowanej igły w granicach $500\text{--}560 \mu\text{m}$. Obserwacje mikroskopowe wykazały, że powierzchnia kul z biopolimeru jest gładka i nie zmienia się po wysuszeniu (rys. 1).

Stopień skurczu materiału biopolimerowego zależy od średnicy zastosowanej igły, a także od stężenia soli zestalającej alginianu sodu (niskie stężenie CaCl_2 powoduje deformacje kulistego kształtu). Największy skurcz (ok. 30%) zaobserwowano dla stężenia roztworu

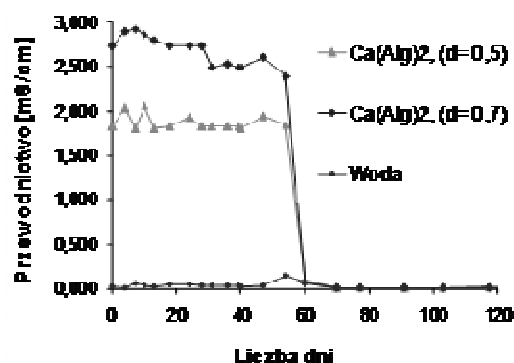
NaAlg (1,6%) żelowanego w 8% roztworze CaCl_2 (tab. 1). Degradacja materiału bipolimerowego (kule z $\text{Ca}(\text{Alg})_2$) przebiega najszybciej w pierwszych dwóch miesiącach inkubacji. Potwierdzeniem efektów makroskopowych są zmiany przewodnictwa jonowego płynu immersyjnego: woda/ $37^\circ\text{C}/4 \text{ m-ce}$ (rys. 2).

Po tym czasie wszystkie rodzaje kul alginowych pozostawały stabilne, przewodnictwo płynu immersyjnego pozostało na poziomie przewodnictwa wody destylowanej. Drugim testem trwałości kul alginianowych były badania degradacji materiału w wieloelektrolitowym płynie izotonicznym - płynie Ringera. Do oceny degradacji materiału posłużył pomiar pH płynu Ringera (rys. 3).



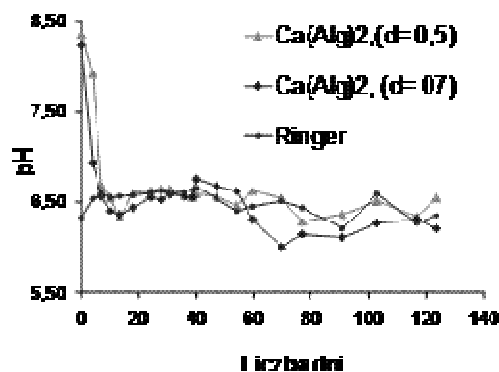
Rys. 1. Fotografia mikroskopowa 1,6% kul $\text{Ca}(\text{Alg})_2$; pow. 15x

Fig. 1. Microphotograph of 1.6% $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ spheres; magn. 15x



Rys. 2. Zmiana przewodnictwa kul alginowych

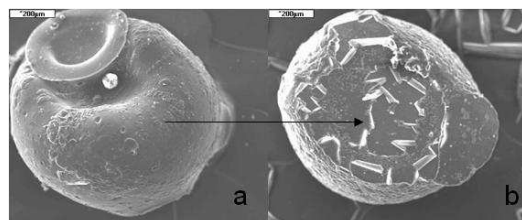
Fig. 2. Change of conductivity alginate spheres



Rys. 3. Zmiana pH płynu Ringera w funkcji czasu inkubacji kul alginianu sodu

Fig. 3. pH changes of Ringer solution versus incubation time of alginate spheres

Największe zmiany stężenia jonów wodorowych obserwowano w pierwszych dniach inkubacji, po tym czasie pH stabilizuje się na poziomie ok. 6. Obserwacje mikroskopowe powierzchni kul alginowych wykazały, że początkowo degradacji uległa powierzchnia kuli (rys. 4a, b), a następnie stwierdzono deformacje kształtu kuli. Zastosowany czas eksperymentu nie był wystarczający do uzyskania całkowitej degradacji biopolimeru.



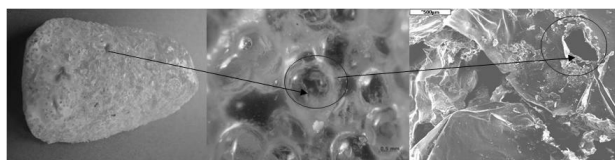
Rys. 4. Obraz kuli alginianu wapnia: a) przed inkubacją; b) po inkubacji w płynie Ringera; SEM, pow. 100x

Fig. 4. SEM microphotograph of calcium alginate sphere: a) before an incubation; b) after an incubation in Ringer solution; magn. 100x

Właściwości kompozytów polimerowych

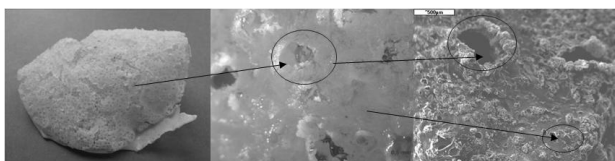
Kompozyty otrzymane metodą dwustopniowego odlewania charakteryzują się niejednorodną powierzchnią: gładką od strony dna formy i chropowatą od wierzchu. Obserwacje pod mikroskopem stereoskopowym dowodzą, że kompozyt: PGLA/kule alginowe/proszek NaAlg charakteryzuje się ułożeniem gradientowym porogenu (wyższy udział proszku z alginianu sodu widoczny jest od strony dna formy, wyższy udział kul z alginianu wapnia obserwowany jest od strony wierzchniej). W przypadku kompozytu złożonego z PGLA/kule z alginianu wapnia ułożenie porogenu jest równomierne w całej objętości matrycy. Pozwalało to na osiągnięcie odpowiedniej porowatości oraz wielkości porów w ostatecznej wersji skaffoldu.

Porogen usunięty został w trakcie dwustopniowego wymywania: najpierw usuwano proszek NaAlg (woda/37°C), a następnie usunięto kule z alginianu wapnia (PBS/37°C). Obie fazy porotwórcze ulegały gwałtownemu wymyciu, pozostawiając puste przestrzenie (rys. rys. 5, 6).



Rys. 5. Skaffold kompozytowy PGLA/kule $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ (aparatury cyfrowy/mikroskop stereoskopowy - pow. 30x /SEM - pow. 50x)

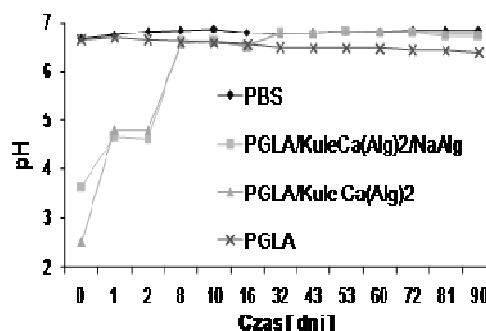
Fig. 5. PGLA/spheres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ composite scaffold



Rys. 6. Skaffold kompozytowy PGLA/kule $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /proszek NaAlg (aparatury cyfrowy/mikroskop stereoskopowy - pow. 30x /SEM - pow. 50x)

Fig. 6. PGLA/spheres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /powder NaAlg composite scaffold

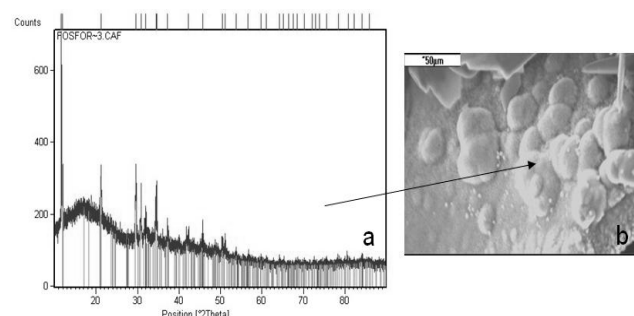
Otrzymane skaffoldy charakteryzowały się porami równymi wielkością ze średnicą zastosowanych porogów (pory po proszku alginowym 80÷120 μm , pory powstałe w wyniku usunięcia kul z $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ ok. 300÷400 μm). W trakcie usuwania kul z $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ następuje jednoczesna krystalizacja brzusytu - jednej z form apatytu ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Obecność jonów wapnia pochodzących z alginianu wapnia, a także obecność grup fosforanowych będących w roztworze immersyjnym (bufor fosforanowy, PBS) powoduje inicjację krystalizacji, której sprzyja niskie, lokalne pH (rys. 7).



Rys. 7. Zmiany pH PBS-u w funkcji czasu inkubacji skaffoldów

Fig. 7. PBS pH changes versus incubation time of scaffolds

Potwierdzeniem obecności brzusytu w porach po alginianie wapnia są mikrografie SEM oraz wykonane w miejscach charakterystycznych kalafiorowych wykwitów mikroanalizy rentgenowskie XRD (rys. rys. 8a, b). Reakcja ta ma istotny wpływ w przypadku zastosowania skaffoldów jako podłoża do regeneracji tkanki kostnej ze względu na fakt, iż brzusyt może przekształcać się w formy apatytowe.



Rys. 8. Analiza XRD skaffoldu PGLA/kule $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /proszek NaAlg (a); obraz SEM skaffoldu PGLA/kule $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /proszek NaAlg po miesięcznej inkubacji w PBS-ie (b); pow. 50x

Fig. 8. Analiza XRD of PGLA/spheres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /powder NaAlg composite scaffold (a); SEM microphotography of PGLA/spheres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ /powder NaAlg composite scaffold after one month incubation in PBS solution (b); magn. 50x

WNIOSKI

Wprowadzenie do osnowy z resorbowalnego polimeru (PGLA) modyfikatorów w postaci kul alginowych oraz alginianu sodu (proszek) o różnym czasie resorpcji

wpływa na proces degradacji skaffoldów kompozytowych. Obecność dwóch resorbowalnych faz biopolimerowych może przyspieszać proces degradacji materiału, jednocześnie umożliwiając otrzymanie skaffoldów o różnym stopniu porowatości. Stosując różne wielkości fazy zdyspergowanej, można otrzymać skaffoldy o zróżnicowanych właściwościach. Materiały takie mogą być wprowadzane do organizmu zarówno w postaci gotowych struktur porowatych, ale także jako częściowo porowate materiały oraz takie, w których porowatość tworzy się *in situ*. Zaproponowana metoda otrzymywania struktur porowatych może stanowić bazę do wytwarzania materiałów o gradiencie porowatości lub jako metoda otrzymywania kompozytów wielofunkcyjnych (porogen służyć może jako nośnik substancji aktywnych, a sam kompozyt będzie pełnił funkcję podporową lub wypełniającą ubytek).

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant Nr 0408/R/2/T02/06/01).

LITERATURA

- [1] Murat Burak Yaylaoglu, Cemil Yildiz, Feza Korkusuz, Vasif Hasirci, A novel osteochondral implant, *Biomaterials* 1999, 20, 1513-1520.
- [2] Tetsushi Taguchi, Yu Sawabe, Hisatoshi Kobayashi, Yusuke Moriyoshi, Kazunori Kataoka, Junzo Tanaka, Preparation and characterization of osteochondral scaffold, *Materials Science and Engineering C* 2004, 24, 881-885.
- [3] Schaefer D., Martin I., Shastr P., Padera R.F., Langer R., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G., In vitro generation of osteochondral composites, *Biomaterials* 2000, 21, 2599-2606.
- [4] Gotterbarm T., Richtera W., Junga M., Berardi Vilei S., Pierre Mainil-Varlet, Takeshi Yamashita, St. J. Breuschd, An in vivo study of a growth-factor enhanced, cell free, two-layered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defect, *Biomaterials* 2006, 27, 3387-3395.
- [5] Chu C.R., Chondral and osteochondral injuries: mechanisms of injury and repair responses, operative techniques in orthopaedics 2001, 11, 2, 70-75.
- [6] Ma P.X., Langer R., Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage, *J. Biomedical Materials Research* 1999, 44, 217-221.
- [7] Kikuchi T., Yamada H., Fujikawa K., Effects of high molecular weight hyaluronan on the distribution and movement of proteoglycan around chondrocytes cultured in alginate beads, *Osteoarthritis and Cartilage* 2001, 9, 351-356.
- [8] Stodolak E., Błazewicz M., Dyrba J. Alginate-based composites, 17-th *Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine*, Ryto 2007, Polska.
- [9] Ziabka M., Stodolak E., Chłopek J., Fabrication and preliminary study of gradient composites with controlled resorption time, *Engineering of Biomaterials* 2007, 69-72, 106-112.