

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: ziabkam@gmail.com

Otrzymano (Received) 30.01.2009

POLIMEROWE KOMPOZYTY GRADIENTOWE DLA ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

W pracy otrzymano i scharakteryzowano polimerowe kompozyty gradientowe. Wytworzone materiały charakteryzowały się gradientem porowatości (tworzącym się *in situ*), gradientem trwałości w warunkach *in vitro* oraz gradientem właściwości mechanicznych. Kompozyty gradientowe otrzymano przez dodatek do resorbowalnej osnowy kopolimeru laktydu i glikolidu (PGLA) biopolimeru - alginianu sodu w postaci proszku (NaAlg). Metodą odlewania otrzymano folie kompozytowe o różnym udziale wagowym modyfikatora (7+27%). Na podstawie przeprowadzonych badań degradacji (trwałości w warunkach *in vitro*), pomiarów profilometrycznych, testów mechanicznych oraz obserwacji mikroskopowych zaprojektowano i wykonano kompozytowe struktury gradientowe. Następnie materiały w formie kostek o różnym udziale wagowym modyfikatora poddano badaniom degradacji, stosując jako medium immersyjne płyn Ringera. Stopień degradacji kompozytów określono na podstawie zmian prędkości fali ultradźwiękowej oraz pH medium. Stwierdzono, że szybkość degradacji kompozytów zależy od udziału wagowego porogenu oraz od kolejności ułożenia warstw różniących się udziałem wagowym modyfikatora w kompozycie gradientowym.

Słowa kluczowe: gradientowe materiały kompozytowe, alginiany, degradacja polimerów

POLYMER GRADED COMPOSITES FOR MEDICAL APPLICATION

Functional gradation is one of characteristic feature of living tissue. Bioinspired materials open new approaches for manufacturing implants for bone replacement. Different routes for new implant materials are presented using the principle of functional gradation. In this paper an artificial biomaterial for bone replacement has been developed by building a graded structure consisting of resorbable polymer matrix modified with biopolymer powder. For preparation graded materials with different *in situ* porosity and *in vitro* durability diversification biopolymer in form of sodium alginate (NaAlg, powder) was introduced into resorbable polymer matrix of lactide-co-glycolide (PGLA). Then composite films were cast from polymer solution with deferent mass fraction of modifier (7+27%). On the basis of degradation tests (durability in *in vitro* conditions), profile measurements, mechanical tests and microscopic observations composite structures (cubical shape with different arrangement of composite layers) were designed. Two types of porosity gradients were obtained. These graded materials with different mass fraction of sodium alginate were investigated during the durability tests in Ringer solution. Degradation degree was defined on the basis of velocity changes of the ultrasonic wave and pH of the immersion medium. It was found that composite degradation rate depends on porogene mass fraction and it was also connected with its arrangement way in polymer matrix.

Keywords: graded composite materials, alginate, polymer degradation

WSTĘP

Coraz większa liczba pacjentów, którzy ulegają wypadkom komunikacyjnym, chorobom cywilizacyjnym czy urazom sportowym, jest jedną z głównych przyczyn wymuszających rozwój nowoczesnych biomateriałów przeznaczonych na implanty kostne. Jednym z podstawowych wymagań stawianych biomateriałom implantacyjnym dla tkanki kostnej jest otrzymanie materiału o zbliżonych właściwościach: mechanicznych, biologicznych, fizykochemicznych. Obserwując budowę tkanki kostnej, szczególną uwagę zwraca jej hierarchiczna struktura, w której pewne cechy zmieniają się płynnie wraz z budową, np. ze-

wnętrzna gęsta i sztywna kość zbita przechodzi w porowatą strukturę kości gąbczastej. Gradientowość struktury tkanki kostnej jest wymuszona przez funkcje biologiczne, jakie pełnią: kość zbita (przenoszenie obciążeń) i kość gąbczasta (odżywianie kości, przewodzenie impulsów nerwowych). Modelując nowoczesne biomateriały przeznaczone dla chirurgii kostnej, np. implanty kręgosłupa czy implanty kostne, duży nacisk kładzie się na otrzymanie struktur naśladujących naturalną tkankę [1]. Implanty gradientowe ze względu na swoją budowę i właściwości są materiałami wykazującymi cechy biomimetyzmu (naśla-

dowania) tkanek żywego organizmu. Sterowanie czasem degradacji, porowatością, a także właściwościami mechanicznymi stawia materiały gradientowe w grupie poszukiwanych biomateriałów przeznaczonych na implanty kostne [2, 3].

Jako matryce gradientowych materiałów dla zastosowań medycznych stosuje się resorbowalne polimery z grupy poliestrów (PGLA, PLA, P(L/DL)LA, PCL) [4]. W celu poprawy właściwości mechanicznych, chemicznych oraz biologicznych (bioaktywności) do matryc polimerowych wprowadza się różne fazy modyfikujące: ceramiczne cząstki bioaktywne (np. HAp, TCP, SiO₂), włókna wzmacniające (np. włókna węglowe, polimerowe), nanododatki modyfikujące właściwości magnetyczne (np. Fe₂O₃), elektryczne (CNT) lub inne, np. bakterioobójcze (TiO₂, Ag, Cu).

Kolejną cechą, jaką można nadać materiałowi gradientowemu, stosując odpowiednio dobrany modyfikator, jest porowatość [5, 6]. Wprowadzenie do matrycy polimeru modyfikatora, którego czas resorpcji jest krótszy niż czas degradacji osnowy, zapewnia szybszą degradację jednej z faz i umożliwia powstawanie porów, których rozmiar można kontrolować przez udział i jakość modyfikatora. Porowata struktura implantu ułatwia przerastanie biomateriału naturalną regenerującą się tkanką. Obecność modyfikatora w dostatecznej ilości może również wpływać na poprawę parametrów mechanicznych, szczególnie w pierwszym okresie tuż po implantacji, wtedy gdy potrzebna jest zwiększona zdolność implantu do przenoszenia obciążeń. W trakcie przebywania kompozytu polimerowego w warunkach żywego organizmu możliwa jest stopniowa degradacja fazy mniej trwałej (a więc odpowiedzialnej za właściwości mechaniczne układu), ale jednocześnie bioaktywnej, pobudzającej komórki tkanki kostnej do szybszej proliferacji i zasiedlania (przerastania) implantu [7].

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie oraz otrzymanie gradientowych biokompozytów o kontrolowanej szybkości resorpcji oraz o sterowanej porowatości, mogących znaleźć zastosowanie na ubytki tkanki kostnej. Odpowiednie zaprojektowanie materiałów stwarza możliwości otrzymania wielofunkcyjnych implantów, sprzyjających przerastaniu i właściwej regeneracji tkanki.

W pracy otrzymano kompozytowy materiał polimerowy, w którym jako modyfikatora użyto proszku z biopolimeru - alginianu sodu. Jest to materiał pochodzenia naturalnego (algi morskie), powszechnie dostępny i wykorzystywany wcześniej w celach biomedycznych (opatrunki, pokrycia leków, wypełnienia ubytków) [8]. Charakter chemiczny alginianu w dużej mierze uzależniony jest od kationu, z jakim polisacharyd ten jest związany; sole kationów dwuwartościowych (np. Ca(Alg)₂) są nierozpuszczalne w wodzie, natomiast sole kationów jednowartościowych są w wodzie rozpuszczalne (np. NaAlg). Wykorzystując tę właściwość, można otrzymać porowate struktury

tworzące się w miejscu wszczepienia. Odpowiednio dobrany udział objętościowy modyfikatora pozwala na otrzymanie pożądaných z punktu widzenia materiałów do leczenia tkanki kostnej parametrów mechanicznych. Natomiast wykorzystując podobieństwo struktury chemicznej alginianu (polisacharyd) do innego polisacharydu obecnego w macierzy zewnątrzkomórkowej, tj. hialuronianu, można spodziewać się poprawy wiązania pomiędzy implantem a otaczającą go tkanką [9].

MATERIAŁY I METODY

Otrzymywanie folii kompozytowych

Materiały kompozytowe otrzymane zostały metodą odlewania z roztworu. W tym celu do 10% roztworu polimeru resorbowalnego PGLA (kopolimer laktydu i glikolidu, PLA:PGA-83:17, Mn = 75 kDa, CMWiP Zabrze) w chlorku metylenu wprowadzono różny udział wagowy (7÷27%) proszku z alginianu sodu (PROTANAL 60/20, Nova Matrix, Norwegia) o zawartości ok. 60÷65% monomeru G (reszty kwasu gulonowego). Tak przygotowane materiały kompozytowe zostały poddane badaniom mechanicznym, w których określono ich wytrzymałość na rozciąganie (Zwick 1435). Następnie folie kompozytowe zostały poddane inkubacji w środowisku biologicznym (płyn Ringera/37±1°C). Na podstawie pomiarów pH określony został ich stopień degradacji (CP-315 Elmetron pH-metr). Materiał odniesienia stanowiła folia z czystego polimeru PGLA, poddawana degradacji w tych samych warunkach co materiały kompozytowe. W wyniku obserwacji mikrostruktury (SEM, Jeol JSM-5400) oraz dzięki przeprowadzonym testom profilometrycznym (HommelWelker profilometry) oszacowano porowatość powierzchniową materiałów. Przeprowadzone badania pozwoliły na zaprojektowanie kompozytowych struktur gradientowych o kontrolowanym czasie degradacji oraz o zróżnicowanej porowatości.

Otrzymywanie gradientowych struktur kompozytowych

W następnym etapie pracy otrzymano dwa rodzaje biomimetycznych materiałów gradientowych naśladujących strukturę tkanki kostnej. Z otrzymanych folii kompozytowych wycięto kwadraty o boku 1cm x 1cm, ułożono w formie i poddano jednoosiowemu prasowaniu, otrzymując kostki o następujących konstrukcjach:

- PGLA (próbka odniesienia)
- PGLA/NaAlg(I) z gradientem zmieniającym się w kierunku „góra-dół” (tab. 1A)
- PGLA/NaAlg(II) z gradientem zmieniającym się w kierunku centrum materiału (tab. 1B)

Materiały w postaci kostek (sześciątów: 1cm x 1cm x 1cm) poddano testom degradacji w śro-

dowisku *in vitro* (płyn Ringera/37°C/3 miesiące, woda destylowana/37°C/3 miesiące), kontrolując zmiany pH. Stopień degradacji materiału oraz zmiany mikrostruktury (w tym chropowatości i porowatości powierzchniowej) monitorowano pomiarem prędkości rozchodzenia się fali ultradźwiękowej poprzez poszczególne warstwy kompozytu gradientowego (Ultrasonic 895) oraz na podstawie obserwacji mikroskopowych w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM, Jeol JSM-5400).

TABELA 1. Materiały gradientowe o różnym sposobie ułożenia warstw kompozytowych

TABLE 1. Graded materials with different way of composite layers composition

A	PGLA / NaAlg gradient I z gradientem zmieniającym się w kierunku "górze-dół"	PGLA / 27% wag. NaAlg PGLA / 16% wag. NaAlg PGLA / 15% wag. NaAlg PGLA / 7% wag. NaAlg
B	PGLA / NaAlg gradient II z gradientem zmieniającym się w kierunku centrum materiału	PGLA / 27% wag. NaAlg PGLA / 16% wag. NaAlg PGLA / 15% wag. NaAlg PGLA / 7% wag. NaAlg PGLA / 15% wag. NaAlg PGLA / 16% wag. NaAlg PGLA / 27% wag. NaAlg

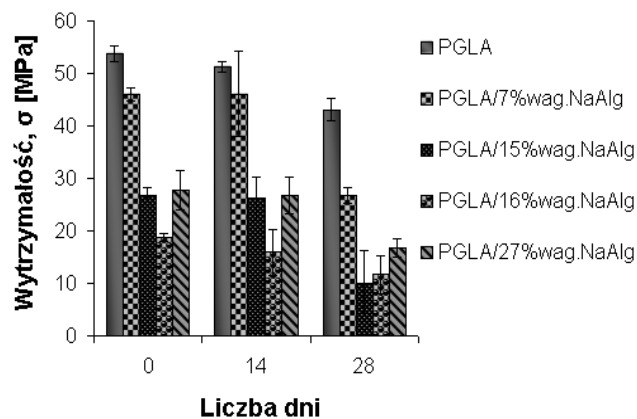
WYNIKI I DISKUSJA

Folie kompozytowe

Rezultaty otrzymane w pierwszej części doświadczenia dotyczące charakterystyki folii kompozytowych PLGA/NaAlg pokazały, że, sterując udziałem wagowym biopolimeru (NaAlg), można regulować wybrane parametry, takie jak: wytrzymałość mechaniczna, mikrostruktura, czas degradacji i porowatość (tworzącą się *in situ*). Testy mechaniczne (wytrzymałość na rozciąganie) wykazały, że ilość wprowadzanego alginianu sodu do resorbowalnej osnowy PGLA obniża wytrzymałość mechaniczną folii (rys. 1). Jej wartość spada po przetrzymywaniu folii w płynie Ringera dopiero po 4 tygodniach inkubacji. Spadek wytrzymałości zależy od udziału wagowego modyfikatora: ilość dodatku jest odwrotnie proporcjonalna do wartości wytrzymałości.

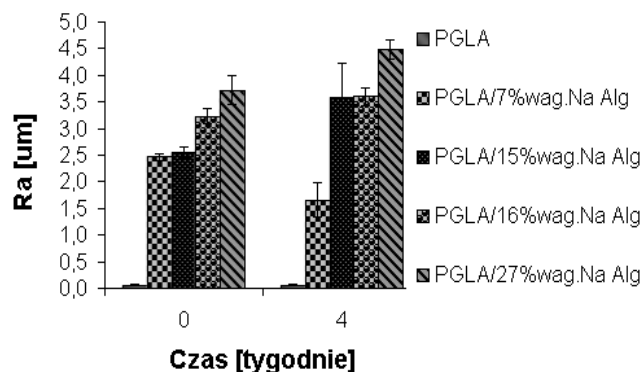
Komórki kostne (osteoblasty) są szczególnie czułe na nierówności powierzchni, stąd profil powierzchni to parametr ważny z biologicznego punktu widzenia w otrzymywanym materiale kompozytowym. Odpowiednio dobrana chropowatość zarówno w skali mikro, jak i nanometrycznej może w znaczący sposób wpłynąć na przyspieszenie procesu namnażania się osteoblastów [10]. Z przeprowadzonych testów profilometrycznych wynika, że chropowatość folii wzrasta wraz z udziałem modyfikatora w materiale kompozytowym (rys. 2). Analogiczne zachowanie - wzrost średniego poziomu chropowatości (R_a) - wykazują

folie po miesięcznej inkubacji w płynie Ringera. Wzrost chropowatości wywołany jest degradacją fazy modyfikującej - proszku NaAlg. Spadek średniej chropowatości, obserwowany dla kompozytu z 7% udziałem wagowym proszku alginowego, związany jest z nierównomierną dyspersją modyfikatora powstałą na etapie otrzymywania kompozytu.



Rys. 1. Wytrzymałość na rozciąganie folii PGLA i kompozytów PGLA/NaAlg w funkcji czasu inkubacji w płynie Ringera

Fig. 1. Tensile strength of PGLA film and PGLA/NaAlg composites versus incubation time in Ringer solution

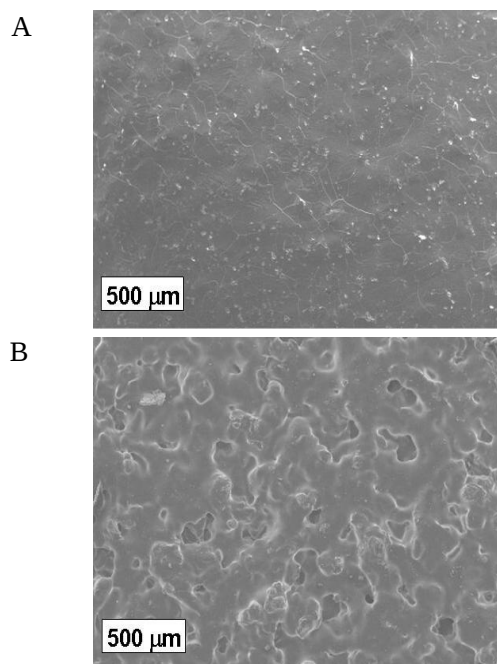


Rys. 2. Zmiana poziomu chropowatości (R_a) folii PGLA i kompozytów PGLA/NaAlg przed i po inkubacji w płynie Ringera

Fig. 2. Roughness level changes (R_a) for PGLA film and PGLA/NaAlg composites before and after Ringer incubation

Obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) mikrostruktury folii kompozytowych przed i po okresie inkubacji wykazują znaczące różnice. Stopień porowatości bezpośrednio związany jest z udziałem wagowym alginianu sodu: im większy udział NaAlg, tym większa porowatość kompozytów (rys. 3).

Wyniki pierwszej części eksperymentu pokazują, że: sterując udziałem wagowym proszku alginowego, można otrzymać materiał kompozytowy różniący się porowatością, trwałością w warunkach *in vitro*, odpowiednimi parametrami fizykochemicznymi powierzchni (profilem), a także właściwościami mechanicznymi.



Rys. 3. Mikrofotografie SEM folii PGLA/27%wag.NaAlg: A) przed inkubacją oraz B) po 4-tygodniowej inkubacji w płynie Ringera

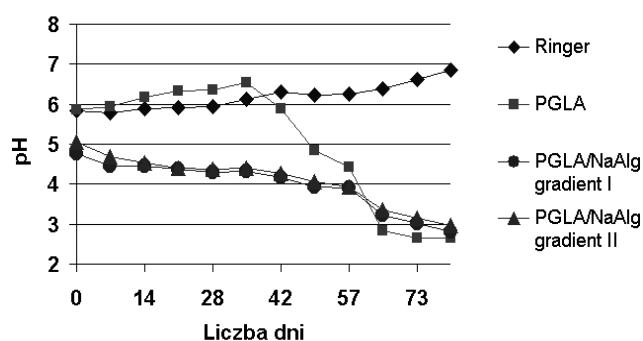
Fig. 3. SEM microphotographs of PGLA/27%wt.NaAlg film: A) before incubation and B) after 4 weeks of incubation in Ringer

Otrzymane folie kompozytowe PGLA/NaAlg są zatem odpowiednim materiałem bazowym do projektowania struktur gradientowych o kontrolowanej porowatości tworzącej się w warunkach *in situ*. Materiały kompozytowe wykazują sprzyjające właściwości powierzchniowe (chropowatość na poziomie mikrometrycznym), stymulujące osteoblasty do adhezji i proliferacji. Dodatkowo modyfikacja matrycy polimerowej alginianem sodu stwarza możliwości kontrolowania nie tylko czasu degradacji kompozytów, ale także sterowania ich właściwościami mechanicznymi (większy udział modyfikatora obniża wytrzymałość kompozytów, zwiększając porowatość). Na podstawie opisanych wyżej wyników zdecydowano się na otrzymanie dwóch rodzajów materiałów gradientowych, w których sposób ułożenia kompozytowych warstw naśladowałby budowę tkanki kostnej: PGLA/NaAlg gradient I z udziałem wag. modyfikatora zmieniającym się w kierunku „góra-dół”, w którym powstała porowatość powinna zmieniać się stopniowo od największej do coraz mniejszej oraz PGLA/NaAlg gradient II z udziałem wag. modyfikatora zmieniającym się w kierunku „centrum” materiału, w którym duża porowatość będzie stopniowo się zmniejszać wraz ze zbliżeniem się do wnętrza materiału. Tak otrzymane materiały gradientowe zostały poddane dalszym badaniom.

Kompozyty gradientowe o kontrolowanej porowatości

Testy trwałości biologicznej przeprowadzone w drugiej części eksperymentu na modelowych materiałach gradientowych w formie kostek wykazały wy-

rażne zmiany pH już w pierwszym miesiącu inkubacji. Stopniowy spadek pH spowodowany jest degradacją alginianu i przechodzeniem do roztworu jonów Na^+ . Zachowanie to obserwowane jest dla obydwóch otrzymanych struktur gradientowych I i II (rys. 4). Obecność modyfikatora (proszek NaAlg) przyspiesza wprawdzie proces degradacji kompozytów, jednak jego charakter jest stopniowy, w przeciwieństwie do degradacji czystego polimeru PGLA (który wyraźnie degraduje po 5 tyg. inkubacji - widoczny spadek pH na wykresie). Stabilny proces degradacji wiąże się z procesem pogarszania się właściwości mechanicznych materiału. Osłabienie struktury kompozytu jest spowodowane pojawieniem się porowatości, przy czym mechanizm ten jest na tyle wolny, że nie powinien on stanowić zagrożenia związanego z niedostatecznym przenoszeniem obciążeń. Na trwałość modeli gradientowych nie ma wpływu rodzaj medium immersyjnego. Przeprowadzone testy porównawcze na próbkach inkubowanych w wodzie destylowanej potwierdziły degradację alginianu wobec wolniej degradujących się materiałów gradientowych.



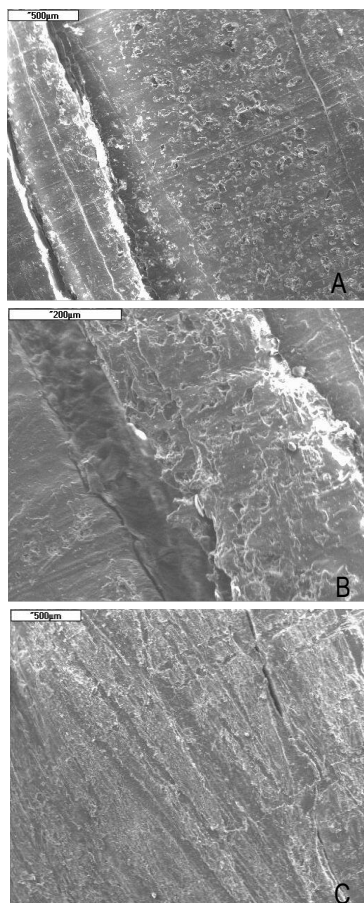
Rys. 4. Zmiana pH płynu Ringera w funkcji czasu inkubacji próbek

Fig. 4. pH changes of Ringer solution versus incubation time of samples

Przeprowadzone obserwacje mikroskopowe przekrojów materiałów gradientowych pokazały pojawiające się szczeliny pomiędzy warstwami. Otrzymywane metodą prasowania folii materiały gradientowe ulegają częściowej delaminacji, co z pewnością prowadzi do pogorszenia właściwości mechanicznych (rys. 5B). Powierzchnia materiałów gradientowych charakteryzuje się natomiast porowatością powstałą na skutek resorpcji fazy modyfikującej (NaAlg). Porowatość zmienia się wraz z udziałem wagowym alginianu.

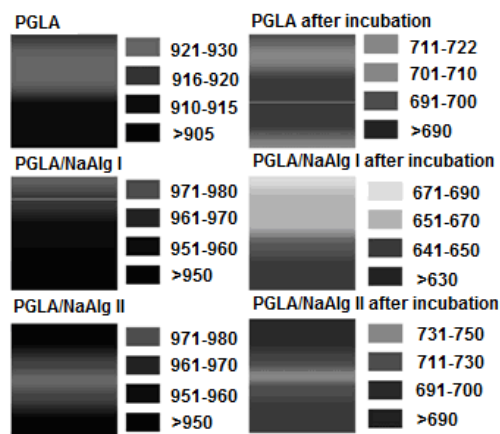
Degradację modelowych kostek gradientowych monitorowano również z pomocą pomiaru prędkości fali ultradźwiękowej (rys. 6). Badania te potwierdziły, że prędkość fali zmienia się wraz z powstałą porowatością: im większy udział wagowy alginianu w matrycy, tym szybszy proces degradacji kompozytu i większa porowatość. Duży wpływ na zmianę parametru prędkości mają również pojawiające się miejscami rozwarstwienia. Zewnętrzne warstwy kompozytu degradują się znacznie szybciej na skutek lepszej penetracji płynów immersyjnych, co ma zasadniczy wpływ

na szybkość rozpuszczania i wypłukiwania modyfikatora, a tym samym na zwiększoną porowatość. Przeprowadzone testy pokazały, że otrzymane próbki zachowują wyjściowy gradient nawet po 2 miesiącach inkubacji w warunkach *in vitro* pomimo zachodzącej częściowo delaminacji.



Rys. 5. Mikrofotografie SEM kompozytu PGLA/NaAlg gradient I po 8-tygodniowej inkubacji w wodzie destylowanej - przekrój przez warstwę (od lewej górna część kompozytu o największej porowatości)

Fig. 5. SEM microphotographs of PGLA/NaAlg gradient I composite after 8 weeks of incubation in distilled water - layers cross-section



Rys. 6. Zmiana prędkości fali ultradźwiękowej [m/s] badanych próbek przed i po inkubacji

Fig. 5. Velocity of ultrasonic wave [m/s] for samples before and after incubation

WNIOSKI

Zastosowanie jako modyfikatora resorbowalnej osnowy - alginianu sodu pozwala na otrzymanie folii kompozytowych, w których porowatość może powstawać w warunkach *in situ*. Obecność resorbowalnej fazy biopolimerowej może przyspieszać proces degradacji materiału. Dodatkowo sterując udziałem wagowym modyfikatora, możliwe jest kontrolowanie takich parametrów, jak porowatość i stopień degradacji materiałów, dzięki czemu można otrzymywać materiały dopasowane pod względem struktury i właściwości do tkanki kostnej.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego grant Nr R0802801.

LITERATURA

- [1] Pompe W., Worch H., Eppler M., Friess W., Gelinsky M., Greil P., Hempel U., Scharnweber D., Schulze K., Functionally graded materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering A* 2003, 362, 40-60.
- [2] Bianying Wen, Gang Wu, i in., A flat polymeric gradient material: preparation, structure and property, *Polymer* 2004, 45, 3359-3365.
- [3] Teneketzis Tenek L., Aifantis E.C., On some application of gradient elasticity to composite materials, *Composite Structures* 2001, 53, 189-197.
- [4] Tony G. van Tienen, Ralf G. Heijkants, Tissue ingrowths and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes, *Biomaterials* 2002, 23, 1731-1738.
- [5] Chłopek J., Szaraniec B., Pitak A., Wołowska-Czapnik D., Sobczak A., Polymer graded composites with controlled resorption time, *Engineering of Biomaterials* 2006, 58-60, 101-106.
- [6] Chłopek J., Projektowanie i wytwarzanie funkcjonalnych materiałów gradientowych: Projektowanie i opracowanie technologii wytwarzania funkcjonalnych materiałów gradientowych dla inżynierii biomedycznej, Polska Akademia Nauk, PAN Kraków 2007, 71-77.
- [7] Chłopek J., Szaraniec B., Michalska M., Bioactive graded composites, *Engineering of Biomaterials* 2006, 58-60, 94-97.
- [8] Tu J., Bolla S., Barr J. i in., Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization, *International Journal of Pharmaceutics* 2005, 303, 171-181.
- [9] Ueyama Yoshiya, Ishikawa Kunio, Mano Takamitsu: Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane, *Biomaterials* 2002, 23, 2027-2033.
- [10] Berry C.C., Campbell G., Spadicino A., Robertson M., Curtis A.S.G., The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility, *Biomaterials* 2004, 25, 5781-5788.