

Barbara Szaraniec*, Krzysztof Kotula, Jan Chłopek

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

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

Otrzymano (Received) 23.02.2009

KOMPOZYTY GRADIENTOWE DLA MEDYCYNY REGENERACYJNEJ

Otrzymano trzy rodzaje biodegradowalnych kompozytów gradientowych przeznaczonych na implanty dla chirurgii kostnej. Osnowę kompozytów stanowił kopolimer laktydu z glikolidem, a jako faz modyfikujących użyto zarówno długich włókien węglowych oraz poliakrylonitrylowych, jak również cząstek alginianowych i β -TCP. Włókna odpowiadają przede wszystkim za właściwości mechaniczne kompozytów, natomiast głównym zadaniem cząstek jest zapewnienie materiałom lepszych właściwości biologicznych poprzez resorpcję *in vitro*, tworzenie odpowiedniej porowatości, poprawę osteointegracji z tkanką kostną oraz jej stymulację do szybszej regeneracji (bioaktywność TCP). Kompozyty gradientowe w postaci sześciennych kostek otrzymano metodą prasowania na gorąco folii kompozytowych. Próbki inkubowano w sztucznym środowisku biologicznym (8 tygodni, woda destylowana, 37°C) i co tydzień mierzono pH oraz przewodność płynu. Na podstawie zmian właściwości mechanicznych próbek, ich masy oraz prędkości fali ultradźwiękowej oraz obserwacji mikroskopowych (SEM) oceniano trwałość kompozytów oraz sposób ich degradacji.

Słowa kluczowe: kompozyty gradientowe, kompozyty polimerowe, materiały biomimetyczne, kompozyty włókniste

GRADED COMPOSITES FOR REGENERATIVE MEDICINE

Composites are the most often investigated materials for tissue repair or replacement. Especially the biomimetic composites with graded structure are under special attention. The majority of natural tissues, among other bone tissue, represents the same structure and can be characterized by properties varying with directions. The Young modulus and porosity gradients, existing in bone, are the most important gradients from the point of view of biomedical applications. One of the most important expectations for present and future implants for regenerative medicine is their various microstructure (e.g. strengthening directions, porosity), and controllable biodegradation rate that match the rate of tissue growth. Concept of graded composite material allows manufacturing of biofunctional implants tailored to fit tissue structure and properties.

In this work we present three types of graded composites differing in composition and arrangement of modifying phases. All these composites are biodegradable. They are containing polylactide-co-glycolide (PGLA) as a matrix and long fibers of carbon (C) and polyacrylonitrile (PAN) as reinforcement. Additionally resorbable powders of tricalcium phosphate (TCP) and sodium alginate (NaAlg) assure an obtainment of proper porosity and improvement of osteointegration with tissue. The samples (cubes 10x10 mm) were prepared by mould pressing of thin composite films. As a consequence of their graded nature they show controlled Young modulus, porosity and resorption time. Their behaviour was examined in artificial biological environment (8 weeks, distilled water, 37°C) by measuring the velocity of ultrasonic wave, conductivity, pH and mass changes, and microscopic observations (SEM). Before and after incubation mechanical properties of composites were compared using universal testing machine.

Keywords: graded composites, polymer composites, biomimetic materials, fibrous composites

WPROWADZENIE

Złożona budowa ludzkiego ciała, niejednorodność właściwości mechanicznych tkanek, a także niekorzystne reakcje organizmu na wszczepione materiały powodują konieczność ciągłego udoskonalania stosowanych we współczesnej medycynie implantów. Analizując przykładowo budowę tkanki kostnej, można potraktować ją jako układ gradientowy o zmieniających się właściwościach (np. gradient porowatości, modułu Younga, aktywności biologicznej), realizowany dzięki temu, iż kość posiada równocześnie strukturę włóknistą, porowatą, płytkową (laminaty). W przypadku implantów kostnych kompromis pomiędzy właściwościami me-

chanicznymi i biologicznymi oraz biomimetyczną budową materiału jest możliwy do osiągnięcia poprzez projektowanie kompozytów, których właściwości będą zmieniały się gradientowo [1-3].

Ze względu na to, iż kość jest strukturą biologiczną o dużych zdolnościach regeneracyjnych, optymalnym rozwiązaniem jest, aby implanty stosowane w rekonstrukcji elementów kostnych ulegały stopniowej resorpcji z równoczesnym zastępowaniem ich odbudowującą się tkanką. Właśnie dlatego coraz większe znaczenie w medycynie zaczynają mieć polimery resorbowalne, takie jak np. polilaktyd czy poliglikolid. Wytwarzane

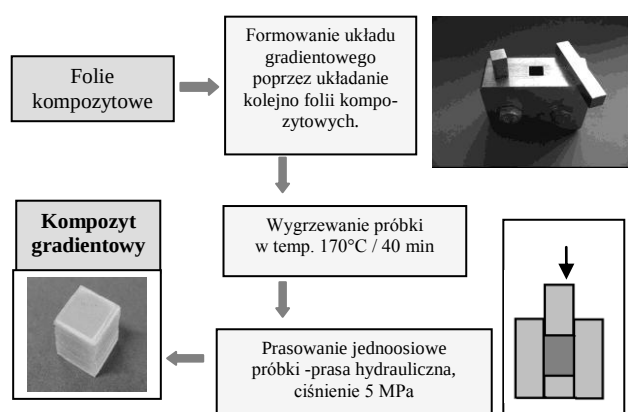
z nich materiały kompozytowe, w zależności od rodzaju wzmocnienia, jego udziału objętościowego i rozmieszczenia przestrzennego, stwarzają szerokie możliwości sterowania zarówno właściwościami mechanicznymi, jak również pozwalają wpływać na zachowanie biologiczne wykonanego z nich implantu.

Kompozyty z resorbowalną osnową polimerową pozwalają na uzyskanie materiałów wielofunkcyjnych, które w początkowym etapie pełnią funkcję mechaniczną, a następnie ulegając kontrolowanej degradacji, pozwalają regenerowanej tkance na stopniowe przejmowanie obciążeń, zaś zmodyfikowane cząstkami bioaktywnymi dodatkowo stymulują jej wzrost. Po procesie resorpcji osnowy faza wzmacniająca może jeszcze przez pewien czas pełnić rolę rusztowania dla wzrostu tkanki kostnej [4].

W przedstawionej pracy podjęto próbę opracowania kompozytowych materiałów gradientowych z gradientem modułu Younga oraz porowatości przeznaczonych na implanty medyczne ze szczególnym wskazaniem na implanty dokręgosłupowe.

MATERIAŁY I METODY

Otrzymano trzy rodzaje kompozytów gradientowych o osnowie z kopolimeru glikolidu (15% mol) z laktydylem (85% mol) - PGLA o średnio liczbowym ciężarze cząsteczkowym 16 kDa i dyspersji masy cząsteczkowej $D = 2$ (prod. Centrum Materiałów Węglowych i Polimerowych w Zabrzu) [5]. Próbkki w formie kostek o wymiarach ok. 10x10 mm wytwarzano metodą prasowania na gorąco cienkich folii kompozytowych (rys. 1).



Rys. 1. Schemat wytwarzania kompozytów gradientowych

Fig. 1. Scheme of graded composites manufacturing

Jako dodatki modyfikujące zastosowano długie włókna węglowe T300 (prod. Torayca, Japonia), długie włókna poliakrylonitrylowe (prod. Katedra Włókien Sztucznych, Wydział Inżynierii i Marketingu Tekstyliów, Politechnika Łódzka), proszek alginianowy o masie cząsteczkowej ok. 198 kDa (prod. Protanal 60/20, Nova Matrix, Norwegia) oraz proszek fosforanu wapnia TCP - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (prod. Fluka). Folie wzmoc-

niane jednokierunkowo włóknami otrzymywano metodą ciekłej impregnacji, zaś modyfikowane cząstkami metodą odlewania z zawiesiny polimerowej.

Zastosowanie włókien miało na celu zarówno zapewnienie kompozytom odpowiednich parametrów mechanicznych, jak również dzięki znacznie wolniejszej degradacji stworzenie rusztowania dla odbudowującej się tkanki. Celem modyfikacji polimeru proszkami było natomiast uzyskanie odpowiedniej porowatości w warstwach wierzchnich, co w efekcie powinno ułatwić osteointegrację z tkankami poprzez wytworzenie złącza biologicznego i wrastanie tkanki w pory materiału. Proszek TCP, będący resorbowalnym materiałem bioaktywnym, będzie stanowił źródło jonów wapnia i fosforu dla odbudowującej się kości oraz umożliwi miejscowo wytworzenie chemicznego złącza na granicy kość-implant. W tabeli 1 przedstawiono schematy zaprojektowanych kompozytów gradientowych oraz fotografie otrzymanych próbek.

TABELA 1. Schematy i fotografie otrzymanych kompozytów gradientowych

TABLE 1. Schematic diagrams and photographs of graded composites

	Schemat kompozytu gradientowego	Fotografia kompozytu
Kompozyt 1 (ATP)		
Kompozyt 2 (ATC)		
Kompozyt 3 (TCA)		

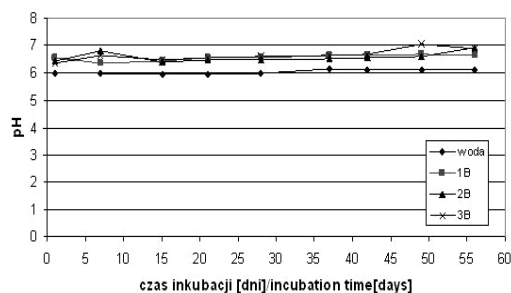
Degradację kompozytów gradientowych oceniano na podstawie zmian zachodzących podczas inkubacji w wodzie destylowanej (8 tygodni, temp. $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Co tydzień przeprowadzano pomiary pH (pH-metr firmy Elmetron typ CP-315) oraz przewodności medium imersyjnego (konduktometr firmy Elmetron typ CC-315), a także oznaczano zmiany masy kostek gradien-

towych. Po tygodniu i po 8 tygodniach inkubacji mierzono prędkość propagacji fali ultradźwiękowej przez próbki wzdłuż trzech prostopadłych kierunków (miernik ultradźwiękowy Ultrasonic 895). Po zakończeniu inkubacji przeprowadzono obserwacje mikroskopowe pod mikroskopem skaningowym (Jeol JSM-5400) oraz określono zmianę właściwości mechanicznych kostek gradientowych w próbie ściskania (uniwersalna maszyna wytrzymałościowa Zwick 7000 typ 1435).

WYNIKI I DYSKUSJA

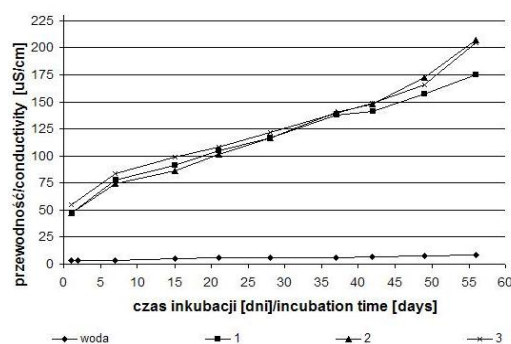
Na rysunku 2 przedstawiono wyniki pomiarów pH medium immersyjnego, w którym inkubowano próbki. Stężenie jonów wodorowych płynu pozostaje bez zmian przez cały okres inkubacji (pH 6,3÷6,8). W przypadku degradacji implantów polimerowych często obserwuje się zakwaszanie środowiska związane z resorpcją polimeru. Zjawisko to może wywoływać reakcje okołotankowe i zaburzać regenerację. Obecność w kompozycie faz modyfikujących (zwłaszcza cząstek TCP i alginianowych) ogranicza to niekorzystne zjawisko [6] i pozwala na zachowanie wyjściowego pH.

O postępującej degradacji kompozytów gradientowych mogą świadczyć natomiast zmiany przewodności medium immersyjnego (rys. 3) oraz zmiany mikrostruktury stwierdzone podczas obserwacji mikroskopowych.



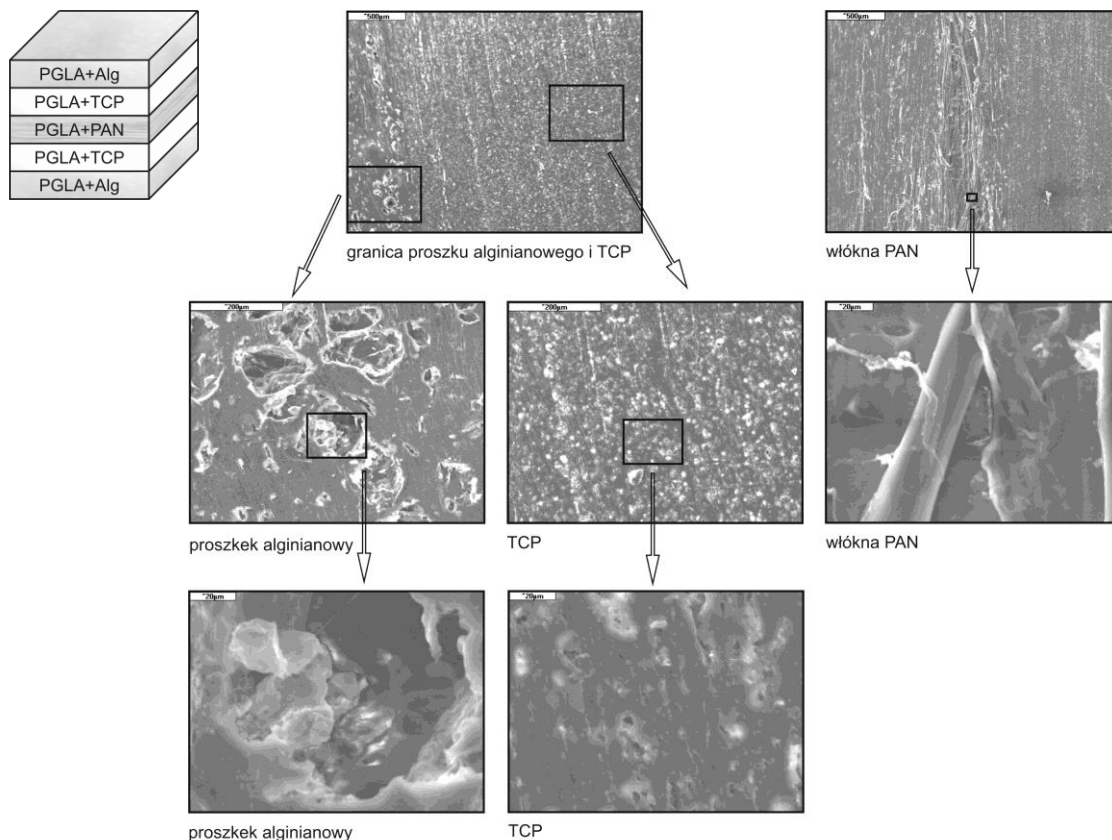
Rys. 2. Zmiany pH medium immersyjnego podczas inkubacji kompozytów gradientowych

Fig. 2. The pH of distilled water vs graded composites incubation time



Rys. 3. Zmiany przewodności medium immersyjnego podczas inkubacji kompozytów gradientowych

Fig. 3. Conductivity of distilled water vs graded composites incubation time



Rys. 4. Mikrofotografie SEM kompozytu gradientowego 1 (ATP) po 8-tygodniowej inkubacji

Fig. 4. SEM microphotographs of graded composite 1 (ATP) after 8 week incubation

Na rysunku 4 przedstawiono mikrofotografie kompozytu gradientowego 1 (ATP), na których trudno dostrzec wyraźne granice rozdziału pomiędzy kolejnymi składowymi warstwami kompozytowymi zawierającymi różne fazy modyfikujące. Zgodnie z założeniami w obszarze, gdzie osnowa polimerowa modyfikowana była cząstkami resorbowalnymi (TCP, Alg), powstaje materiał porowaty o zróżnicowanej zmieniającej się stopniowo porowatości rzędu $5\div 250\ \mu\text{m}$.

Wyniki uzyskane z pomiarów ultradźwiękowych potwierdzają stopniową degradację kompozytów gradientowych (tab. 2). Obserwowany we wszystkich przypadkach spadek prędkości fali ultradźwiękowej, zwłaszcza w kierunku równoległym do włókien, można wiązać z powstawaniem nieciągłości w mikrostrukturze kompozytów oraz z rozluźnieniem granic rozdziału faz.

TABELA 2. Prędkość propagacji fali ultradźwiękowej w kompozytach gradientowych przed i po inkubacji

TABLE 2. The velocity of ultrasonic wave in graded composites

Kompozyt	Kierunek pomiaru	Prędkość fali ultradźwiękowej przed inkubacją, m/s	Prędkość fali ultradźwiękowej po tygodniowej inkubacji, m/s	Prędkość fali ultradźwiękowej po 8-tyg. inkubacji, m/s
1	a	3437	2644	2029
	b	2799	2512	2012
	h	2827	2465	2068
2	a	12336	2430	1933
	b	2719	2433	1856
	h	2195	1389	1125
3	a	18837	11004	3419
	b	2416	2140	1822
	h	1758	1329	1102

a - kierunek równoległy do włókien, b - kierunek prostopadły do włókien, h - kierunek odpowiadający kierunkowi prasowania (kierunek gradientu)

Konsekwencją tego jest również spadek wytrzymałości kompozytów. W przypadku wyjściowych kostek nie udało się zmierzyć siły niszczącej podczas jednoosiowego ściskania ze względu na ograniczenia maszyny wytrzymałościowej (max obciążenie 5 kN). Wyznaczono jedynie odkształcenia przy siłach 1 i 3 kN w celu porównania tego parametru po badaniach *in vitro*. Tak dobrane wartości obciążeń odpowiadają wielkości sił działających na krążki międzykręgowe kręgosłupa (1 kN - pozycja stojąca wyprostowana, 3 kN - pozycja pochylona) [7].

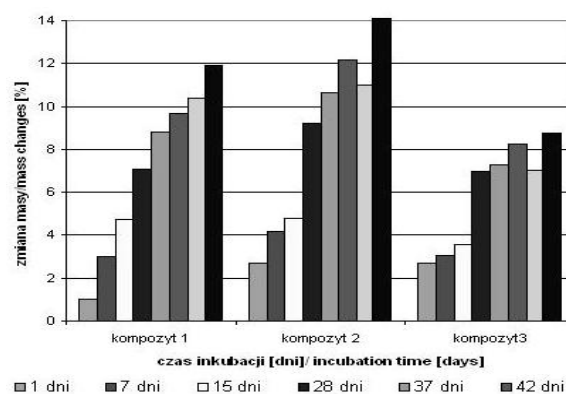
Po 8-tygodniowej inkubacji wytrzymałość kostek znacznie spadła i żaden z kompozytów gradientowych nie był w stanie przenieść obciążenia 3 kN, gdyż wcześniej uległ zniszczeniu. Natomiast porównując odkształcenia przy sile 1 kN, widoczne jest, iż po inkubacji są one znacznie większe niż pierwotnie (tab. 3).

TABELA 3. Zmiany właściwości mechanicznych kompozytów po 8-tygodniowej inkubacji

TABLE 3. Changes of mechanical properties of composites after 8 week incubation

Kompozyt	Przed inkubacją		Po inkubacji	
	odkształcenie przy sile 1 kN %	odkształcenie przy sile 3 kN %	odkształcenie przy sile 1 kN %	odkształcenie przy sile 3 kN %
1	4,7	10,6	10,3	uległ zniszczeniu
2	5,3	13,0	12,7	uległ zniszczeniu
3	6,6	12,1	13,0	uległ zniszczeniu

Podczas inkubacji w wodzie destylowanej następuje ciągły wzrost masy badanych kompozytów gradientowych, co jest związane z wbudowywaniem się wody i pęcznieniem polimeru (rys. 5).



Rys. 5. Zmiany masy kompozytów gradientowych podczas inkubacji

Fig. 5. Changes of graded composites mass during incubation

WNIOSKI

1. Kierując się gradientem modułu Younga obecnym w tkance kostnej, który decyduje o właściwościach mechanicznych i kierunkowym rozkładzie naprężeń, wykonano trzy różne kompozytowe układy gradientowe, przeznaczone na biomateriały dla chirurgii kostnej.
2. Badania *in vitro* wykazały degradację kompozytów powiązaną ze zmianą ich parametrów mechanicznych oraz mikrostruktury przy równoczesnym braku wpływu produktów degradacji na pH medium immersyjnego.
3. Spadek prędkości fali ultradźwiękowej, zwłaszcza w kierunku równoległym do włókien, świadczy o osłabieniu więzi na granicy rozdziału faz. Potwierdzają to obserwacje mikroskopowe kompozytów gradientowych, ukazując postęp degradacji zarówno resorbowalnych faz modyfikujących, jak i osnowy polimerowej. Najszybciej degradowały warstwy kompozytowe zbudowane z PGLA modyfikowanego proszkiem alginianowym.

4. Zależnie od rodzaju i rozmieszczenia faz modyfikujących w kompozycie możliwe jest zaprojektowanie materiałów wielofunkcyjnych, zapewniających odpowiednie właściwości mechaniczne, optymalny rozkład naprężeń na granicy kość-implant oraz dzięki wykorzystaniu bioaktywnych modyfikatorów stymulowanie wzrostu tkanki kostnej, a po ich resorpcji osiągnięcie odpowiedniej porowatości, umożliwiającej przerastanie materiału tkanką.

LITERATURA

- [1] Chłopek J., Szaraniec B., Michalska M. Bioactive graded composites, *Engineering of Biomaterials* 2006, 58-60, 94-97.
- [2] Huang M., Wang R., Thomson V., Rekow D., Sboyejo W.O., Bioinspired design of dental multiayers, *J. Mater. Sci.: Med.* 2007, 18, 57-66.
- [3] Guoa H., Khorb K.A., Boeya Y.C., Miao X., Laminated and functionally graded hydroxyapatite/yttria stabilized tetragonal zirconia composites fabricated by spark plasma sintering, *Biomaterials* 2003, 24, 667-675.
- [4] Chłopek J. i in., The influence of carbon fibres on the resorption time and mechanical properties of the lactide-glycolide co-polymer, *J. Biom. Sci.* 2007, 18, 1355-1368.
- [5] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M., Nowe możliwości syntezy i zastosowania w medycynie biodegradowalnych kopolimerów glikolidu nie zawierających cyny, *Inżynieria Biomateriałów* 2002, 23-25, 27-29.
- [6] Gadomska K., Stodolak E., Błażewicz M., Badania nad biogodnością kompozytów polimerowych: polilaktyd/włókna alginianowe, *Przegląd Lekarski* 2007, 64, 49-53.
- [7] Tylman D., Dziak A., *Traumatologia narządu ruchu*, PZWL, Warszawa 1995.