

SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA HYDROŻELOWYCH NANO- KOMPOZYTÓW CHITOZAN/ LAPONIT DLA INŻYNIERII TKANKI KOSTNEJ

KRZYSZTOF PAZDAN*, KINGA PIELICHOWSKA*, KAROL GRYŃ,
JAN CHŁOPEK

AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW
* E-MAIL: KPAZDAN@AGH.EDU.PL, KINGAPIE@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było uzyskanie nowego wielofunkcyjnego biomateriału do regeneracji tkanki kostnej, spełniającego wymagania stawiane przez nowe trendy w medycynie regeneracyjnej. Biorąc pod uwagę wymagania związane ze zgodnością biologiczną oraz minimalną szkodliwością implantu dla organizmu ludzkiego, z grupy dostępnych naturalnych i syntetycznych polimerów jako najbardziej obiecujący wybrany został chitozan. Chitozan jest coraz częściej używanym polimerem w zastosowaniach medycznych, takich jak: opatrunki, systemy dostarczania leku, system dostarczania genów, podłożą do regeneracji kości i tkanek miękkich, itp. Istotną zaletą chitozanu jest jego zdolność do tworzenia fazy hydrożelowej i ta właściwość jest wykorzystywana przez naukowców do uzyskiwania nowych biomateriałów. Obecnie hydrożele są używane w zastosowaniach sensorycznych wykorzystujących sygnały temperaturowe, pH, siły jonowej, jonowe czy przyłożonego zewnętrznego pola magnetycznego do wywołania oczekiwanej odpowiedzi. W niniejszej pracy został zastosowany syntetyczny nanokrzemian warstwowy pod nazwą handlową Laponite® XLS zamiast powszechnie stosowanych organicznych środków sieciujących często szkodliwych dla pacjenta. Uzyskane próbki zostały scharakteryzowane za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), dyfrakcji rentgenowskiej oraz testu nasiąkliwości. Do wstępnego określenia bioaktywności materiałów zastosowano test w warunkach *in vitro* zaproponowany przez Kokubo. Uzyskane dane podane ocenie i szczegółowej analizie daly pozytywne i obiecujące wyniki.

Słowa kluczowe: chitozan, Laponite®, rusztowanie, regeneracja tkanki kostnej

[Inżynieria Biomateriałów 126 (2014) 31-39]

Wstęp

W dzisiejszych czasach, kiedy wypadki i choroby są odpowiedzialne za niemal wszystkie uszkodzenia tkanki kostnej, zadaniem inżynierii materiałowej jest otrzymanie odpowiedniego biomateriału wspomagającego jej rekonstrukcję. Kość jest wielofazowym kompozytem składającym się z zewnętrznej fazy - zbitej tkanki kostnej, oraz wewnętrznej fazy - gąbczastej tkanki kostnej.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HYDROGEL CHITOSAN/LAPONITE NANOCOMPOSITES FOR BONE TISSUE ENGINEERING

KRZYSZTOF PAZDAN*, KINGA PIELICHOWSKA*, KAROL GRYŃ,
JAN CHŁOPEK

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND
* E-MAIL: KPAZDAN@AGH.EDU.PL, KINGAPIE@AGH.EDU.PL

Abstract

The aim of the study was to obtain novel multifunctional biomaterials for bone tissue regeneration fulfilling the requirements imposed by new trends in regenerative medicine. Taking into account that implant has to be biocompatible and less harmful to humans, from a group of available natural and synthetic polymers chitosan was chosen as one of the most promising biomaterials. Chitosan is more and more commonly used in medicine for wound dressings, drug delivery systems, gene delivery systems, scaffolds for bone and soft tissue regeneration etc. Important advantage of chitosan is its ability to create hydrogel phases and this property is used by scientists to obtain novel biomaterials. Nowadays hydrogels are commonly used in sensing applications using temperature, pH, ions, ionic strength or external magnetic field mechanisms to trigger the desired response. Having regarded patient care, synthetic nanoclay (trade name Laponite® XLS) was applied instead of commonly used organic cross-linkers. Obtained specimens were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction and water soaking test. The *in vitro* test proposed by Kokubo was performed to determine bioactivity of the materials. Obtained data were analyzed in detail and provided positive and promising information.

Keywords: chitosan, Laponite®, scaffold, bone tissue regeneration

[Engineering of Biomaterials 126 (2014) 31-39]

Introduction

Nowadays, when accidents and diseases are responsible for almost all bone tissue damages, materials engineering is going forward to accomplish requirements for bone replacement biomaterials. According to materials engineering bone is a multiphase composite combined form exterior compact osseous tissue and interior spongy osseous tissue. These biologically identical tissues are very different in their microstructure, which influences their functions. When compact tissue provides mechanical properties like stiffness and elasticity, spongy tissue, owing to its porous structure, ensures transport of biological fluids [1].

Te biologicznie identyczne tkanki bardzo różnią się budową mikrostrukturalną, co powoduje zróżnicowanie ich funkcji. Istota zbita zapewnia właściwości mechaniczne, takie jak sztywność i sprężystość, natomiast istota gąbczasta, dzięki porowatej strukturze, zapewnia możliwość transportu płynów biologicznych [1].

Materiały na podłożu dla regeneracji tkanki kostnej powinny być: bioaktywne i biozgodne, bioresorbowańne, nietoksyczne (zarówno sam materiał jak i produkty degradacji), łatwo formowalne i stosunkowo proste w otrzymywaniu [2]. Są to powody, dla których klasycznie stosowane materiały poddaje się modyfikacji w celu poprawienia ich bioaktywności, zwilżalności, wytrzymałości mechanicznej oraz stabilności termicznej i chemicznej [3,4]. Niektóre z biomateriałów wykazują część parametrów adekwatnych do planowanych zastosowań, co ułatwia ich modyfikację, a przykładem jest chitozan. Obecnie powszechnie stosowane hydrożele są trójwymiarowymi hydrofilowymi sieciami polimerowymi, których właściwości zależą od środowiska zewnętrznego. Najbardziej popularnymi i poszukiwanymi przez badaczy materiałami są te, które reagują zmianą objętości w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, takie jak pH, temperatura, siła jonowa i pole elektryczne lub magnetyczne [5].

Chitozan jest polisacharydem pochodzenia naturalnego uzyskiwanym poprzez alkaliczną deacetylację proszku chityny otrzymany ze skorupek bezkręgowców (np. krewetek). Chitozan o wysokiej czystości można także otrzymać w wyniku hodowli specyficznych gatunków grzybów [6]. Kohn i in. w swojej pracy przedstawili najczęściej używane biodegradowalne polimery stosowane do produkcji materiałów dla potrzeb inżynierii tkankowej, a wśród nich chitozan, który posiada zestaw niezbędnych właściwości wymaganych dla przyszłych zastosowań w tej dziedzinie [7]. Według Malette i in. implanty na bazie chitozanu są dobrze tolerowane i nieantygenowe w porównaniu z materiałami z modnego obecnie kwasu hialuronowego [8]. Dodatkowo można z niego w prosty sposób tworzyć porowate hydrożele i hydrożelowe nanokompozyty. Nowe struktury hydrożelowe można uzyskać na kilka różnych sposobów, m.in. poprzez zamknięcie biomolekuł, jako systemy dostarczania leków, genów czy układy teranostyczne. Do chitozanowej matrycy oraz jego kompozytów wprowadza się liczne środki terapeutyczne, na przykład: antybiotyki, leki przeciwnowotworowe, przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne, steroidy, białka, aminokwasy, związki przeciwczukrzycowe i diuretyki [9,10].

Główymi zaletami chitozanu wyróżniającymi go w grupie potencjalnych materiałów na rusztowania są: nietoksyczność, nieimmunogenność, brak rakotwórczości produktów degradacji, biokompatybilność, bioaktywność, bioresorbowańność oraz biodegradowalność [11]. Właściwości te czynią chitozan potencjalnym kandydatem na nowoczesne hydrożelowe systemy dostarczania leków. Według Buengera i in. chitozan łatwo tworzy struktury hydrożelowe oraz posiada zdolność magazynowania biocząsteczek poprzez wiele mechanizmów, w tym sieciowanie chemiczne, sieciowanie jonowe i jonowe kompleksowanie [12]. Możliwe zmiany struktury chitozanu przez modyfikację chemiczną również okazują się użyteczne w kwestii magazynowania biologicznie aktywnych cząsteczek przez strukturę polimeru i kontroli profilu ich uwalniania. Istnieje kilka typowych metod modyfikacji, takich jak: kopolimeryzacja, szczepienie, chemiczne i jonowe sieciowanie, tworzenie polielektrolitowych kompleksów, itp. [13]. Badania wykazały, że chitozan może promować proliferację komórek i osteogenezę, ale tylko w przypadku stosowania kompozytów umiarkowanie pęczniujących. Zbyt wysoka zdolność magazynowania wody nie jest zalecana [10]. Istnieje zatem wiele bardzo korzystnych właściwości chitozanu, które mogą być przydatne dla przyszłych zastosowań.

Materials for scaffolds for bone tissue regeneration have to be bioactive, biocompatible, bioresorbable, non-toxic (material and products of degradation), easily formable, easily processable [2]. The main reason why classically used materials are modified are the needs to improve their bioactivity, wettability, mechanical strength and thermal or chemical properties [3,4]. Currently commonly used hydrogels are hydrophilic three-dimension polymer networks, which react to the signals from surrounding environment. The most popular and prospective for researchers are these undergoing a volume change in response to external stimuli such as pH, temperature, ionic strength, electric and magnetic field [5].

Chitosan is a natural-based polysaccharide obtained by alkaline deacetylation of chitin powder received from invertebrates (e.g. shrimps). High purity chitosan can be also obtained from fungus culture [6]. Kohn *et al.* presented the most commonly used biodegradable polymers in tissue-engineered products. Among them, chitosan has a set of required properties for future applications [7]. Advantages of chitosan as biomedical implant for bone tissue regeneration are indisputable. According to Malette *et al.* chitosan implants are well-tolerated and non-antigenic as compared to fashionable hyaluronic acid materials [8]. It can easily create porous hydrogels and hydrogel based nanocomposites. However novel hydrogel structures can be obtained through several ways of entrapment of biomolecules for different applications, e.g. drug delivery, gene delivery and theranostics. In chitosan-based matrix and composites numerous therapeutic agents have been incorporated, such as: anticancer, antibiotics, antithrombotic, anti-inflammatory, steroids, proteins, amino acids, antidiabetic and diuretics [9,10].

Main advantages of chitosan as potential scaffold materials are non-toxicity, non-immunogenicity, non-carcinogenicity of degradation products, biocompatibility, bioactivity, bioresorbability and biodegradability [11]. These properties make it a future candidate for novel hydrogel drug delivery systems. According to Buenger *et al.* chitosan easily forms hydrogel particles and entraps biomolecules through a number of mechanisms, including chemical crosslinking, ionic crosslinking, and ionic complexation [12]. A possible alternative for chitosan is its chemical modification found useful for the association of bioactive molecules and then controlling their release profile. There are a few universal methods of modification such as copolymerization, grafting, chemical and ionic crosslinking, polyelectrolyte complexation, etc [13]. Previous studies demonstrated that chitosan could promote cell proliferation and osteogenesis but only in the case of moderate swelling materials. Too high ability of water entrapment is not recommended [10]. There are multiple advantageous properties of chitosan that can be useful for future applications.

Cross-linking is the most common way for improvement of hydrogel properties. In the case of chitosan Tapan Kumar Giri *et al.* listed substances used as crosslinkers such as glutaraldehyde, oxalic acid, formaldehyde, glyoxal and genipine [14]. These are organics which mostly are harmful or poisonous. Therefore Laponite® was chosen as harmless to humans.

Laponite® is a plate-like synthetic clay hectorite-type belonging to a family of phyllosilicates type 2:1. Its structure represent empirical formula: $\text{Na}^{0.7+}[\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3}\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{0.7-}$. The plates of Laponite® are of 25 nm in length and 0.92 nm in thickness [15]. Laponite® has multiple strong advantages like large surface area, anionic surface charges and exchangeable sodium cations in hydrated interlayers.

Sieciowanie jest najczęstszym sposobem poprawy właściwości fazy hydrożelowej. W przypadku chitozanu Tapan Giri Kumar i in. jako najczęściej stosowane środki sieciujące wyszczególnili takie substancje jak: aldehyd glutarowy, kwas szczawiowy, formaldehyd, glioksal i genipin [14]. Są to substancje organiczne, które w większości są szkodliwe lub toksyczne dla organizmu ludzkiego. Dlatego w niniejszej pracy jako środek sieciujący wybrano nieszkodliwy dla organizmu ludzkiego Laponite®.

Laponite® jest syntetycznym krzemianem warstwowy typu hektortytu o budowie płytowej należącej do rodziny krzemianów warstwowych typu 2:1. Jego strukturę opisuje wzór empiryczny: $\text{Na}^{0.7+}[\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3}\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{0.7-}$. Płytki Laponitu® mają 25 nm długości i 0,92 nm grubości [15]. Laponite® ma wiele zalet, takich jak: duża powierzchnia właściwa, ujemny ładunek powierzchniowy i wymienne kationy sodu w uwodnionych warstwach międzypakietowych. Obecność kationów sodu powoduje lepsze właściwości adsorpcyjne dla leków o budowie kationowej. Ponadto jego eksfoliowane cząstki mogą działać jako wielofunkcyjne środki sieciujące tworząc wiązanie między łańcuchami polimeru a cząsteczkami dając w konsekwencji trójwymiarową sieć [16]. Zastosowanie Laponitu® jako środka sieciującego zamiast klasycznie używanych substancji organicznych, wydaje się korzystne ze względu na jego nietoksyczne właściwości dla żywych komórek oraz całego organizmu [17]. Użyty syntetyczny krzemian warstwowy charakteryzuje się identyczną budową, lecz lepszymi właściwościami sorpcyjnymi niż montmorylonit. Jako syntetyczny związek wykazuje on bardzo niską zawartość metali ciężkich. Ponadto Laponit® pod względem składu chemicznego i produktów rozpuszczania wykazuje pewne podobieństwo do bioaktywnych szkieł, jak również wykazuje zdolność do tworzenia bioaktywnych nanokompozytów PEO/Laponit® [18,19]. Poprzez analogię do innego podobnego krzemianu warstwowego (montmorylonitu), z którego można otrzymać bioaktywne kompozyty chitozanu [20] można spodziewać się, że wprowadzenie Laponitu® do chitozanu również pozwoli na poprawę bioaktywności otrzymywanych materiałów.

W niniejszej pracy przedstawiono badania nad nowymi hydrożelowymi nanokompozytami na bazie chitozanu dla inżynierii tkanki kostnej, które zostały uzyskane przez sieciowanie chitozanu przy użyciu Laponitu®.

Materiały i metody

Przygotowanie kompozytów

Chitozan (MCS) otrzymany z pancerzyków krewetek o średniej masie cząsteczkowej 600.000 - 800.000 i stopniu deacetylowania 75-85% oraz tripolifosforan sodu (TPP) o wzorze empirycznym $\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$ wyprodukowała firma Acros Organics. Do rozpuszczania chitozanu użyto kwasu octowego (CH_3COOH) produkcji POCH SA (Polska). Wybrany typ Laponite® XLS dostępny na rynku został dostarczony przez Rockwood Additives Ltd (UK).

Wszystkie syntezy przeprowadzono w tych samych warunkach temperatury pokojowej w atmosferze powietrza. Odważone ilości Laponitu® XLS zdyspergowano w 2% (% wag.) wodnym roztworze kwasu octowego i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego przez czas zalecany przez producenta [15] (w przypadku Laponite® XLS około 1 godziny). Następnie, ostrożnie dodano odpowiednie ilości chitozanu i mieszano przez następną godzinę w celu rozpuszczenia polimeru. Wszystkie próbki hydrożelu charakteryzowały się tą samą zawartością chitozanu (MCS) - 2,5% (% wag.) i różną zawartością Laponite® (XLS) - TABELA 1.

Presence of sodium cations causes better adsorption properties for cationic drug molecules. Moreover, the exfoliated particles may act as multifunctional cross-linkers in the nano-composite hydrogel formation and the polymer chains were anchored to the particles and entangled to form a network [16]. Use of Laponite® as a cross-linker is an appropriate approach instead of classically used organics, due to its non-toxic properties for living cells and whole organism [17]. Additionally Laponite® exhibits some similarity to bioactive glasses, in terms of chemical composition and dissolution products and it demonstrates the ability of creating bioactive PEO/Laponite® nanocomposites [18,19]. Used synthetic clay has got the same structure type but better sorption properties than montmorillonite. As a synthetic compound it shows low heavy metal content. Referring to another bioactive clay commonly used for obtaining biocomposites -montmorillonite [20], it might be expected that introduction of Laponite® to chitosan matrix will improve bioactivity of the resulting material.

In this work the results on novel nanocomposites based on chitosan hydrogels for bone tissue that have been obtained by chitosan crosslinking using Laponite® are reported.

Materials and Methods

Preparation of composites

Chitosan (MCS) from shrimp shells (medium molecular weight: 600,000 – 800,000, deacetylation degree between 75% and 85%) and sodium tripolyphosphate (TPP) with empirical formula $\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$ were purchased from Acros Organics. Acetic acid (CH_3COOH) used to dissolve chitosan was purchased from POCh (Poland). Laponite® was supplied by Rockwood Additives Ltd (UK).

All reactions were performed in the same room conditions and air atmosphere. Weighed amounts of Laponite® XLS were dispersed in 2% (wt%) acetic acid aqua solution and mixed with magnetic stirrer during time specified by producer [15]. In the case of Laponite® XLS it was about 1 h. Next, weighed amount of chitosan was gently added and stirred another hour to dissolve the polymer. All samples had the same content 2.5% of chitosan (MCS) and different content of Laponite® (XLS) – TABLE 1.

TABELA 1. Opis próbek.
TABLE 1. Samples' description.

Próbka Sample	Zawartość chitozanu i Laponitu® w hydrożelu Content of chitosan and Laponite® in hydrogel
M25X2	2.5% MCS/2.0% XLS
M25X5	2.5% MCS/5.0% XLS
M25X75	2.5% MCS/7.5% XLS
M25X10	2.5% MCS/10.0% XLS
M25X125	2.5% MCS/12.5% XLS

Kompozyt w postaci sfer został wytrącony w 5% roztworze przeciwionów tripolifosforanowych w celu osiągnięcia jonowego żelowania fazy chitozanowej. Po wytrąceniu sfery kompozytowe przemyto wodą destylowaną, suszono na powietrzu oraz pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50°C.

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Pomiary FTIR przeprowadzano w pastylkach KBr z użyciem urządzenia Bruker Vertex 70V w temperaturze pokojowej, w zakresie 4000 - 400 cm⁻¹ i rozdzielczości 2 cm⁻¹.

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Pomiary przeprowadzono za pomocą skaningowego kalorymetru różnicowego Mettler Toledo DSC1 z oprogramowaniem STAR®. Program temperaturowy składał się z następujących etapów: chłodzenie od 25 do -50°C z szybkością 10°/min, wymrażanie w temperaturze -50°C przez 5 min i ogrzewanie od -50 do 230°C z szybkością 10°/min. Pomiar odbywał się w atmosferze azotu przy przepływie gazu 30 ml/min.

Test nasiąkliwości

Nasiąkliwość oznaczano jako stosunek masy wody pochłoniętej przez próbkę suchą do masy próbki suchej. Zbliżone ilości wybranych kompozytów ważyono przy użyciu wagi analitycznej, a następnie inkubowano w wodzie destylowanej w temperaturze pokojowej przez 2 dni i ważyono w określonych przedziałach czasu w celu określenia procentowego wzrostu masy kompozytu by wyznaczyć stopień absorpcji wody.

Bioaktywność in vitro – wstępna ocena

Próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 tygodnie w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) o stężeniu jonów zbliżonym do ludzkiego osocza krwi według metody Kokubo [21]. Podczas inkubacji w SBF nukleacja apatytu na powierzchni materiału uważana jest jako wstępna ocena aktywności biologicznej materiału, a wykonuje się ją przed testem *in vivo* w celu zmniejszenia liczby eksperymentów przeprowadzanych na zwierzętach. Roztwór SBF wymieniano co 3-4 dni (dwa razy w tygodniu). Po zakończeniu inkubacji, próbki wysuszono na powietrzu oraz w warunkach próżniowych i obserwowało za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego FEI Nova Nano SEM 200 zintegrowanego z systemem analizy EDS (EDAX Company), aby sprawdzić obecność kryształów apatytu powstałych podczas inkubacji. Wszystkie próbki zostały napełnione warstwą węgla przed obserwacją SEM.

Dyfrakcja rentgenowska (XRD)

Pomiary przeprowadzano przy użyciu dyfraktometru proszkowego Philips X'Pert Pro X-ray wyposażonego w dwukołowy goniometr z geometrią Bragg-Brentano. Źródłem promieniowania była lampa rentgenowska o liniowym ognisku i anodzie miedziowej ($K_{\alpha 1} = 1,54054 \text{ \AA}$).

Wyniki i dyskusja

Jak podaje Mucha [22], dla chitozanu wyszczególniamy pasma referencyjne zależne i niezależne od stopnia acetylacji i deacetylowania. Dla badanych materiałów na RYS. 1 charakterystyczne pasma dla fazy chitozanowej to drgania rozciągające —C=O przy 1663 i 1626 cm⁻¹ oraz drgania zginające w płaszczyźnie —NH przy 1561 cm⁻¹. Natomiast pasma odniesienia występują dla drgań rozciągających —OH przy 3448 cm⁻¹, —CH przy 2877 cm⁻¹ oraz drganiami rozciągającymi —C—O przy 1159, 1074 i 1025 cm⁻¹ [22].

The composite beads were precipitated from 5% solution of tripolyphosphate counter-ions to achieve ionic gelation chitosan phase. After precipitation they were washed in distilled water, air and vacuum dried at 50°C.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR measurements were carried out with KBr pellet method using Bruker Vertex 70v at room temperature in the range of 4000 – 400 cm⁻¹ and resolution 2 cm⁻¹.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The measurements were performed using the Mettler Toledo DSC1 differential scanning calorimeter with STAR® System. Temperature program consisted following steps: cooling from 25 to -50°C with rate 10°/min, freezing at -50°C for 5 min and heating from -50 to 230°C with rate 10°/min as a main measurement.

Foregoing program was performed at nitrogen atmosphere with flow rate 30 ml/min for all samples in aluminum sealed pans. Obtained data have been evaluated in STAR® Software v.12 evaluation module.

Water soaking test

Water soaking was determined as the ratio of mass of absorbed water by dry sample to the mass of dry sample. Comparable mass of selected composites were weighed using an analytical scale and then incubated in distilled water at room temperature for 2 days and weighed to determine a percentage increase in composite weight what showed the degree of water uptake.

In vitro bioactivity – preliminary evaluation

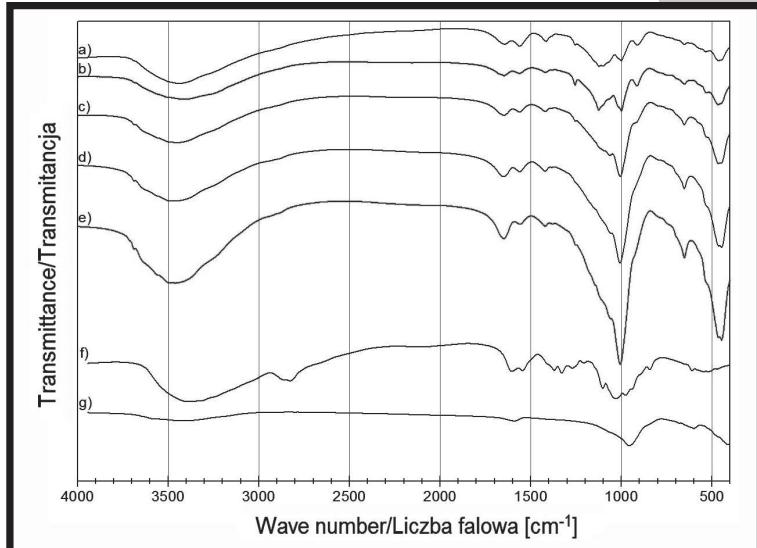
Samples were incubated at 37°C for 4 weeks in Simulated Body Fluid (SBF) followed by Kokubo method with ion concentrations close to those of human blood plasma [21]. During SBF incubation apatite generation on material surface is a preliminary assessment of bioactivity carried out before *in vivo* test and therefore it reduces the number of experiments carried out with animals. SBF solution was exchanged every 3-4 days (twice a week) during incubation. Having finished the incubation, specimens were air and vacuum dried and observed using a scanning electron microscope FEI Nova Nano SEM 200 integrated with an EDS Analysis System (EDAX Company) in order to visualize apatite crystals created during incubation. All samples were coated with a thin layer of carbon before SEM observation.

X-ray diffraction (XRD)

The measurements were performed using Philips X'Pert Pro X-ray two-wheel goniometer powder diffractometer with Bragg-Brentano geometry. The radiation source was a linear focused X-ray tube and copper anode ($K_{\alpha 1} = 1.54054 \text{ \AA}$).

Results and Discussions

Mucha reported [22] that reference bands for chitosan are relative and non-relative from acetylation and deacetylation degree. For investigated materials characteristic bands for chitosan phase — C=O stretching vibrations at 1663 and 1626 cm⁻¹ and — NH bending vibration in a plane at 1561 cm⁻¹ can be observed (FIG. 1). Reference bands are —OH stretching vibration at 3448 cm⁻¹, —CH stretching vibration at 2877 cm⁻¹ and —C—O stretching at 1159, 1074 and 1025 cm⁻¹ [22].



RYS. 1. Widma IR dla chitozanu i kompozytów chitozan/Laponit®: a) M25X2, b) M25X5, c) M25X75, d) M25X10, e) M25X125, f) MCS oraz g) Laponit®.

FIG. 1. IR spectrum of chitosan and chitosan/Laponite® composites: a) M25X2, b) M25X5, c) M25X75, d) M25X10, e) M25X125, f) MCS and g) Laponite®.

W celu pełnego scharakteryzowania otrzymanych materiałów zarejestrowano również widmo czystego chitozanu (RYS. 1f). Główne pasma występujące w widmie chitozanu (MCS) wynikają z występowania drgań rozciągających grupy OH w zakresie 3600 do 3000 cm⁻¹ i wiązania C—H w grupie —CH₂ (2890 cm⁻¹) oraz —CH₃ (2820 cm⁻¹).

Według oceny niektórych naukowców, zakres 1630–1560 cm⁻¹ jest związany z występowaniem drgań wiązania karbonylowego (C=O) grupy amidowej CONHR (amid II-rzędowy przy 1660 cm⁻¹) oraz drgań w płaszczyźnie grupy aminowej NH₂ przy 1560 cm⁻¹. Wraz ze wzrostem stopnia deacetylowania polimeru powstają nowe pasma przy 1597 cm⁻¹, które mogą wpływać na szerokość pasma od aminy pierwszorzędowej przy 1561 cm⁻¹ [22]. Na RYS. 1 i w TABELI 2 widoczne jest przesunięcie dla kilku pasm.

Dla drgań zginających grupy C=O zwiększenie ilości Laponitu® powoduje delikatne przesunięcie pasma w kierunku większej liczby falowej. Położenie pasm drgań grup —NH i Si—O nie ulega zmianie. W przypadku próbki f) pasmo przy 1030 cm⁻¹ jest organiem pochodząącym od grupy C—O w pierścieniu, grup COC oraz CH₂OH [23]. Przesunięcie pasma drgań grupy karbonylowej C=O może być związane z utworzeniem wiązania wodorowego pomiędzy sprotonowaną grupą NH₂ w grupie bocznej łańcucha polimeru z ujemnie naładowaną powierzchnią pakietową płyt Laponitu®. Wydaje się to bardzo prawdopodobne szczególnie ze względu na znaczną wartość przesunięcia pasma (ok. 40 cm⁻¹). Dla wszystkich pasm ich przemieszczenie względem pasm czystego chitozanu i kompozytów są wynikiem zmian stałych siłowych wiązań, co jest następstwem powstawania wiązań w procesie sieciowania. Organia zginające grupy metylenowej i metylowej występują odpowiednio także przy 1380 cm⁻¹ i 1430 cm⁻¹, (RYS. 1f), ale dla kompozytu nie są już obserwowane. Pasmo położone w pobliżu 1140 cm⁻¹ jest związane z organiami asymetrycznymi grupy C—O w mostku tlenowym powstały w wyniku deacetylowania chityny. Pasma te wraz ze zwiększeniem zawartości Laponitu® nakładają się tworząc jedno intensywne pasmo. Jest to spowodowane przez dominującą rolę drgań mostka tlenowego grupy C—O w strukturze Laponitu® [16].

TABELA 2. Liczby falowe charakterystycznych pasm dla chitozanu i kompozytów chitozan/Laponit®.

TABLE 2. Characteristics of absorption bands for chitosan and chitosan/Laponite® composites.

Próbka Sample	C=O [cm ⁻¹]	—NH [cm ⁻¹]	—Si—O [cm ⁻¹]
M25X2	1645	1561	1001
M25X5	1647	1562	1000
M25X75	1648	1562	1007
M25X10	1649	1561	1008
M25X125	1649	1561	1006
MCS	1605	1546	1030

In order to fully characterize the obtained materials, a spectrum of pure chitosan was also recorded (FIG. 1f). The main bands appearing in the spectrum of chitosan (MCS) is due to stretching vibrations of OH group in the range 3600 to 3000 cm⁻¹ and C—H bond in —CH₂ (2890 cm⁻¹) and —CH₃ (2820 cm⁻¹) groups.

According to other researchers findings, the range of 1630–1560 cm⁻¹ was related to the vibrations of carbonyl bonds (C=O) of amide group CONHR (secondary amide at 1660 cm⁻¹) and to the in-plane vibrations of amine group NH₂ at 1560 cm⁻¹. With the increase of polymer deacetylation degree additional bands were formed at 1597 cm⁻¹, which may influence the primary amine band at 1561 cm⁻¹ [22]. There are also visible bands shift for few groups – TABLE 2.

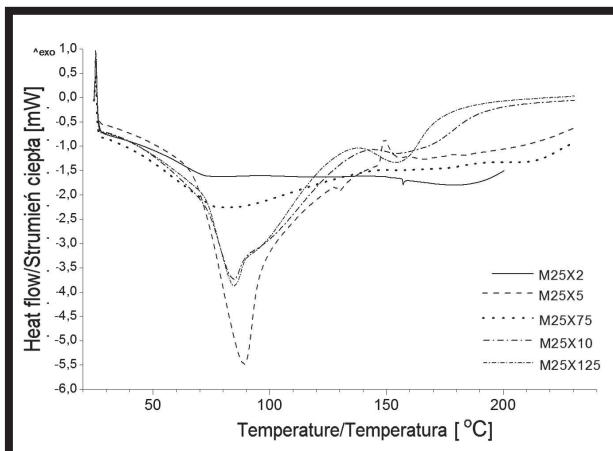
For C=O vibration band by increasing amount of Laponite® there is gentle shift of band towards higher wave numbers. Locations for —NH and —Si—O vibration bands do not show such shift. In the case of specimen f) band at 1030 cm⁻¹ originates from vibration of CO in the ring, COC and CH₂OH [23]. Shift of the carbonyl group C=O vibration band may be linked to form a hydrogen bond between the protonated pendant polymer chain group NH₂ with the negatively charged surface of Laponite® plate packs. Especially, due to the high value of the band-shift (approx. 40 cm⁻¹), it seems very likely. For all foregoing bands their shift between basic chitosan and composites samples bands location are resulted from change force constant of bonds, which is a consequence of formation of the bond in cross-linking process. Control over this process is crucial for optimal mechanical properties of materials.

Bending vibrations of methylene and methyl groups were also visible at 1380 cm⁻¹ and 1430 cm⁻¹, respectively (FIG. 1f), but in composites specimens these band disappear. The band located near 1140 cm⁻¹ is related to asymmetric vibrations of CO in oxygen bridge resulting from deacetylation of chitin. With increasing amount of Laponite® the bands overlap and create one strong band. This is caused by dominant role of vibration of CO in oxygen bridge in Laponite® structure [16].

Wydajna zależność procesu sorpcji wody od stopnia deacetylowania polimeru, w skutek pęcznienia a następnie procesu suszenia, prowadzi prawdopodobnie do powstawania różnic w strukturze chitozanu zależnie od stopnia zagęszczenia, co kolejno prowadzi do różnic między wartościami literaturowymi i eksperymentalnymi w lokalizacji pasm charakterystycznych dla grup występujących w strukturze chitozanu [22]. Grupy amidowe mogą mieć różne położenie, przez co materiał może zaadsorbować więcej cząsteczek wody, które mogą mieć wpływ na położenie pasm w widmie. Ponadto im niższy stopień deacetylowania chitozanu tym niższy stopień krystaliczności i stopień upakowania [22].

Sakurai i in. [24] oraz Zeng i in. [25] podają, że termiczna degradacja chitozanu rozpoczyna się w temperaturze około 250°C, co pozwoliło zdefiniować końcową temperaturę pomiaru DSC do 230°C. Wyznaczenie temperatury zeszklenia (T_g) chitozanu lub kompozytów chitozanu jest kwestią problematyczną. Dane literaturowe wskazują T_g w szerokim zakresie 120 do 205°C. Ocena jest trudna, ponieważ chitozan jest hydrofilowym polimerem naturalnym posiadającym niejednorodne właściwości, takie jak stopień krystaliczności, stopień deacetylowania czy średni ciężar cząsteczkowy. Jego właściwości mogą również zależeć od metody otrzymywania oraz procesu przygotowania próbki do badań [22].

Na RYS. 2 widoczny jest znaczący efekt endotermiczny o minimum piku w temperaturze 85–88°C dla wszystkich próbek. Po wykonaniu dodatkowych pomiarów stwierdzono, że jest to skutek odparowania wody uwięzionej pomiędzy pakietami Laponitu®, pomimo długiego i starannego procesu suszenia. Potwierdzeniem jest badanie DSC (RYS. 3) oraz pomiary metodą dyfrakcji rentgenowskiej w funkcji temperatury (RYS. 4). Do wyjściowego proszku Laponite® XLS wykonano 3 przebiegi pomiarów DSC. Na krzywej pierwszego przebiegu widoczny jest jeden znaczący pik o charakterze endotermicznym w temperaturze 87°C, podczas gdy w drugim i trzecim przebiegu efekt ten nie jest już obserwowany. Aby potwierdzić założenie, że pik jest wynikiem odparowania wody, przeprowadzono badanie dyfrakcji rentgenowskiej w funkcji temperatury.



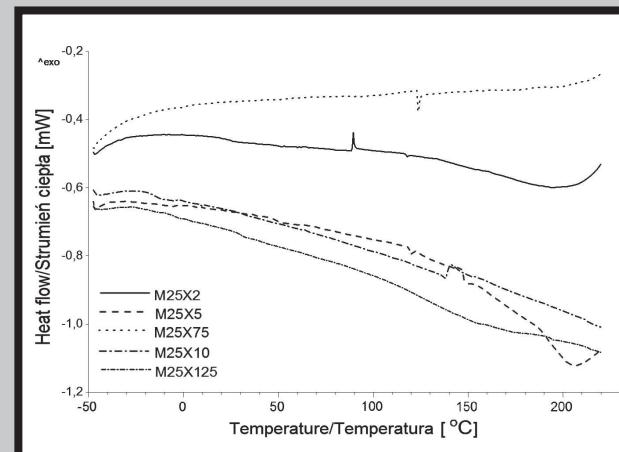
RYS. 2. Krzywe DSC otrzymanych kompozytów chitozan/Laponit®.

FIG. 2. DSC curves for chitosan/Laponite® composites.

The explicit dependence of the water sorption processes on degree of deacetylation of the polymer, leading to swelling of the sample, and then drying process probably result in the differences in the structure of the chitosan dependent on the degree of compaction: this leads to differences between literature and experimental location of bands characteristic for groups occurring in chitosan structure [22]. Amide groups may have different location thus material may absorb more water molecules which may affect the position of the bands in the spectrum. Also the degree of crystallinity of the polymer shows this dependence: lower deacetylation degree of chitosan results in lower crystallinity and packing degree [22].

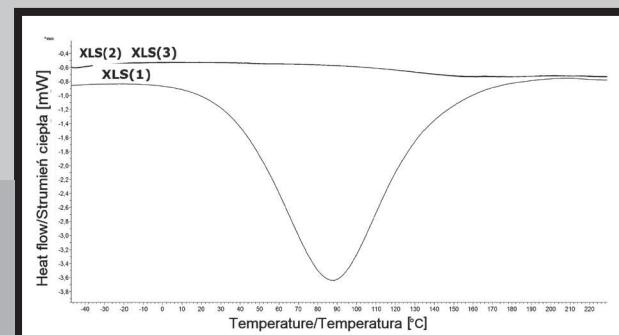
Sakurai et al. [24] and Zeng et al. [25] reported that the thermal degradation of chitosan begins at about 250°C, therefore DSC measurement program temperature was carried out to 230°C. The value of the glass transition temperature (T_g) of chitosan or chitosan composites is a problematic issue. Literature data indicate T_g at wide range from 120 up to 205°C. Evaluation is difficult, because chitosan is a natural hydrophilic polymer having varying properties such as degree of crystallinity, degree of deacetylation or the molecular weight. Its properties can also depend on the origin of the extraction method and sample preparation [22].

In FIG. 2 there are visible significant endothermal peaks at about 85–88°C for all the samples. After careful investigation and performed extra measurements, it was found that this was the effect of water evaporation entrapped between Laponite® layers. Water was still entrapped there, despite long and careful process of drying, including vacuum drying, as confirmed by DSC (FIG. 3) and X-ray diffraction measurements (FIG. 4). For basic XLS Laponite® powder 3 runs of DSC measurements were made. For the first run there is one significant endothermal peak at 87°C, but in the second and the third run there is none. To confirm that this is water evaporation peak, X-ray diffraction as a function of temperature were performed.



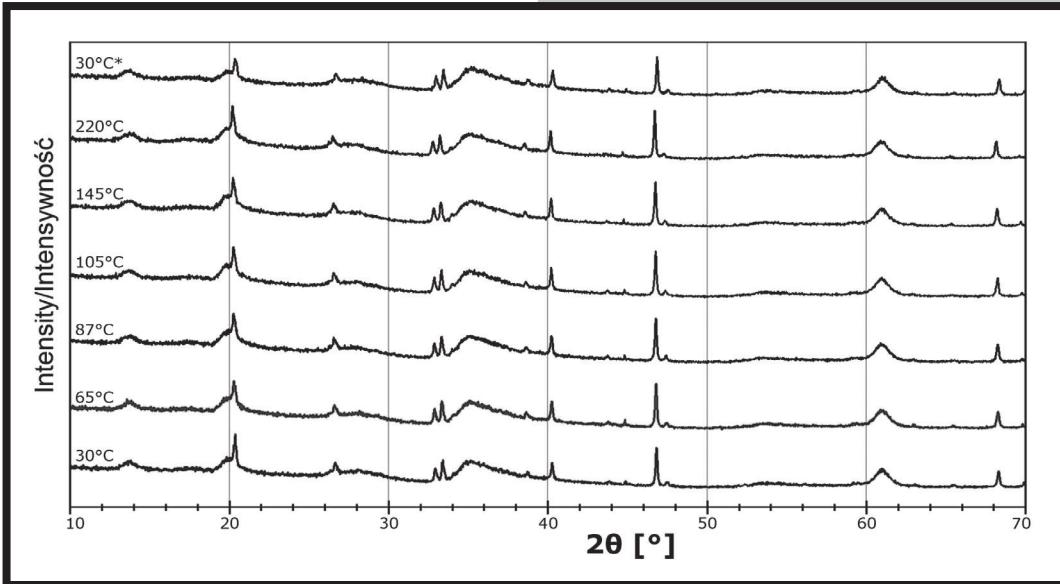
RYS. 3. Krzywe DSC Laponitu® XLS.

FIG. 3. DSC thermograms of Laponite® XLS.



RYS. 4. Dyfraktogramy Laponitu® XLS w funkcji temperatury.

FIG. 4. Laponite® XLS XRD diffractograms in function of temperature.



RYS. 5. Krzywe DSC otrzymanych kompozytów - drugi przebieg ogrzewania.
FIG. 5. DSC curves for chitosan/Laponite® composites - second run.

Na RYS. 4 można zaobserwować, że kolejne dyfraktofory wykonyane w wybranych temperaturach są podobne, co świadczy o tym, że nie zachodzi przemiana polimorficzna - endotermiczne piki w temperaturach 85-88°C pochodzą zatem od odparowania wody międzypakietowej Laponitu®. Dla otrzymanych kompozytów temperaturę zeszklenia można wyznaczyć na podstawie drugiego przebiegu ogrzewania tylko dla jednej z próbek – M25X125 (RYS. 5).

Wyniki badań nasiąkliwości (RYS. 6) wykazały odpowiednią nasiąkliwość badanych próbek. Wartość nasiąkliwości wzrasta wraz ze wzrostem ilości Laponitu® w strukturze kompozytu do 104%. Według badań biomateriały bazujące na chitosanie wykazujące umiarkowaną zdolność pęcznienia, do 150%, wykazują lepsze właściwości bioaktywne, zwłaszcza lepszą proliferację komórek kostnych, niż próbki o większej zdolności pęcznienia [10].

Wstępna ocena aktywności biologicznej *in vitro* została prze prowadzona w celu określenia zdolności materiału

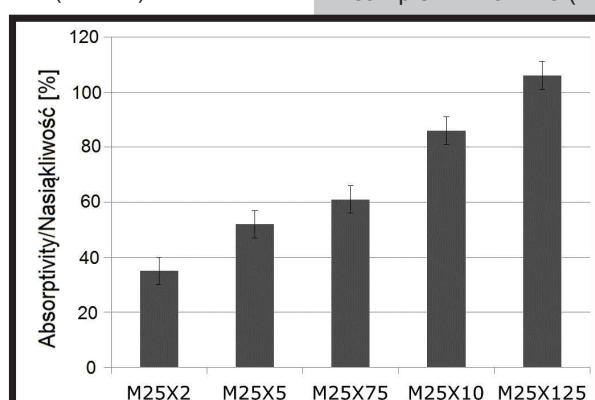
do specyficznej reakcji na styku powierzchni implantu z tkanką [21]. Obserwacji mikroskopowych SEM dokonano na próbkach przechowywanych przez 5 tygodni w SBF, pochwyśszaniu i napełnieniu węglem. Wszystkie próbki wykazały aktywność biologiczną przejawiającą się obecnością kryształów apatytu na powierzchni badanych próbek. Jak wykazała analiza EDX powierzchnia próbek pokryta była przez kryształy apatytu (RYS. 7, a1 i b1). Widoczne były również obszary bez lub z niewielką ilością fazy apatytu (RYS. 7, a2 i b2). Jest to najprawdopodobniej spowodowane obecnością płyt Laponitu® blisko powierzchni – działając one jak centra nukleacji dla kryształów apatytu zwiększać bioaktywność kompozytów chitoznowych podobnie jak w przypadku kompozytów chitozan/monmorylonit [20].

In FIG. 4 diffractograms performed at selected temperatures are similar suggesting that there is none polymorphic transformation – endothermic peak at 85-88°C in composites DSC curves originates from evaporation interlamellar water forming part of Laponite® structure. For the composites glass transition temperature can be determined on the basis of the second run for the only one sample – M25X125 (FIG. 5).

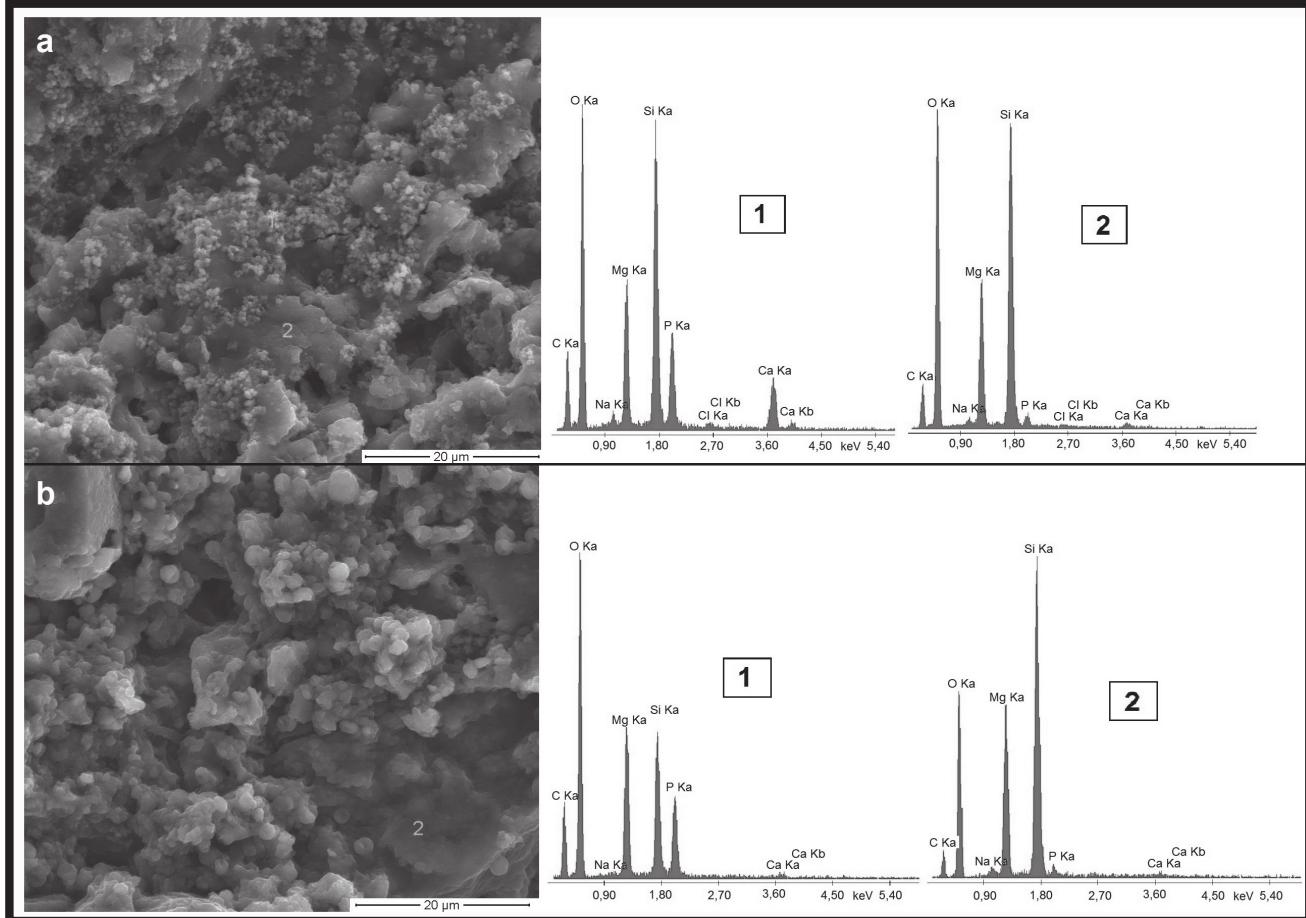
Results of water soaking test (FIG. 6) showed adequate properties of tested specimens. Soaking capacity increasing with increased amount of Laponite® in composite structure up to 104%. According to literature data chitosan materials exhibiting moderate soaking capacity, up to 150%, show better bioactive properties, especially proliferation of bone cells, than samples with higher soaking capacity [10].

Preliminary evaluation of the *in vitro* bioactivity has to define material ability to specific response at the surface of implant in contact with tissue [21]. Five week incubation in SBF samples

of obtained materials were ended by air and vacuum drying of specimens and subsequently after carbon coating the surfaces were observed using scanning electron microscope. All samples showed bioactivity as shown by apatite crystals formed and growth. As confirmed by EDX analysis on the surfaces of specimens the areas covered by apatite crystals were visible (FIG. 7 a1 and b1) and also there were areas of composites without apatite layer (FIG. 7 a2 and b2). It is presumably caused by the presence of Laponite® plates near the surface – they act as nucleation centers for apatite crystals thus improving bioactivity of chitosan composites similar like in chitosan/montmorillonite composites [20]. Also there is no significant visible difference in the case of amount of apatite crystals on the surface of the composites.



RYS. 6. Wyniki testu nasiąkliwości.
FIG. 6. Water soaking test data.



RYS. 7. Mikrofotografie SEM z analizą EDX po inkubacji w SBF dla: a) M25X75 i b) M25X125.

FIG. 7. SEM microphotographs with EDX analysis after SBF incubation for: a) M25X75 and b) M25X125.

Podsumowanie

Celem badań była optymalizacja sposobu otrzymywania bioaktywnego układu biopolimer/krzemian warstwowy, jako nanokompozytu opartego na chitozanie i syntetycznym krzemianie warstwowym przez reakcję sieciowania z użyciem trójpolifosforanu sodowego, jako czynnika żelującego. Badania FTIR potwierdziły proces sieciowania między grupami bocznymi łańcuchów chitozanu i zdyspergowanych płytka Laponitu® XLS. Zastosowanie nieorganicznego środka sieciującego wyeliminowało konieczność użycia powszechnie stosowanych substancji organicznych, które są szkodliwe dla żywych organizmów. Laponite® umożliwia również przeprowadzanie powtarzalnych syntezy z uwagi na jego syntetyczne pochodzenie, które zapewnia jego stały skład - jest to konieczne w procesie otrzymywania biomateriałów do zastosowań medycznych. Otrzymane kompozyty wykazywały właściwości bioaktywne potwierdzone wynikami badań metodą Kokubo oraz charakteryzowały się nasiąkliwością odpowiednią do adhezji i wzrostu komórek kostnych.

Optymalizacja struktury materiału przez sieciowanie i chemiczną modyfikację fazy hydrożelowej może być najlepszym sposobem na uzyskanie obiecujących inteligentnych materiałów dla inżynierii tkanki kostnej.

Podziękowania

Badania finansowane w ramach badań statutowych 11.11.160.616 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH w Krakowie.

Conclusions

The aim of this study was to optimize a method of receiving a bioactive system biopolymer/layered silicate nanocomposite based on chitosan and a synthetic clay by a cross-linking reaction using sodium tripolyphosphate as the gel factor. The resultant composites exhibited bioactive properties confirmed by Kokubo method and optimal water soaking ability for cell adherence and growth. FTIR study confirmed cross-linking interaction between pendant groups of chitosan chains and dispersed exfoliated Laponite® XLS plates. Inorganic cross-linker eliminated commonly used organics which are damaging for living organism. Laponite® enables to perform reproducible syntheses owing to its synthetic origin which assures fixed composition – it is necessary in the case of materials for medical application.

Optimization of material structure by cross-linking and chemical modification of hydrogel phase can be the best way to obtain prospective smart materials for bone tissue engineering.

Acknowledgements

Research funded under statutory researches 11.11.160.616 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology.

References

Piśmiennictwo

- [1] Sabu T., Kuruvilla J., Malhotra S. K., Goda K., Sreekala M. S.: Polymer Composites:Nanocomposites (Volume 2), Weinheim 2013
- [2] Muller Werner E.G., Wang X., Schroder Heinz C.: Inorganic Polyphosphates:Biologically Active Biopolymers for Biomedical Applications(Chapter 10), Heidelberg 2013
- [3] Shan-hui Hsu, Yu-Bin Chang, Ching-Lin Tsai, Keng-Yen Fu, Shu-Hua Wang, Hsiang-Jung Tseng: Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85 (2011) 198-206.
- [4] Pielichowska K., Błażewicz S.: Bioactive polymer/hydroxyapatite (nano)composites for bone tissue regeneration. *Advances in Polymer Science* 232 (2010) 97-207.
- [5] Miaomiao Liu, Haijia Su, Tianwei Tan: Synthesis and properties of thermo- and pH-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)/polyaspartic acid IPN hydrogels. *Carbohydrates Polymers* 87(2012) 2425-2431.
- [6] Nwe, N. & Stevens, W. F.: Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology Letters* 24 (2002) 131-134.
- [7] Pachence J. M., Bohrer M. P., Kohn J.: Biodegradable Polymers (Chapter 23), Principles of tissue engineering (Third Edition) (2007) 323-339.
- [8] Malette, W., Quigley, M., and Adicks, E.: Chitosan effect in vascular surgery, tissue culture and tissue regeneration, Plenum Press, New York (1986) 435-442.
- [9] Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E.: Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981-1014.
- [10] Ta H.T., Dass C.R., Dunstan D.E.: Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 126 (2008) 205-216.
- [11] Ravichandran R., Sundarrajan S., Venugopal J.R., Mukherjee S., Ramakrishna S.: Advances in Polymeric Systems for Tissue Engineering and Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience* 12 (2012) 286-311.
- [12] Buenger D., Topuz F., Groll J.: Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 1678-1719.
- [13] Hennink W.E., van Nostrum C.F.: Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 223-236.

- [14] Giri T.K., Thakur A., Alexander A., Ajazuddin, Badwaik H., Tripathi D.K.: Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2(5) (2012) 439-449.
- [15] <http://www.byk.com/>; 22-05-2014.
- [16] Ruzicka B., Zaccarelli E.: A fresh look at the Laponite phase diagram. *Soft Matter* 7 (2011) 1268-1286.
- [17] Yang H., Hua S., Wenbo Wang W., Wang A.: Composite Hydrogel Beads Based on Chitosan and Laponite: Preparation, Swelling, and Drug Release Behaviour. *Iranian Polymer Journal* 20/6 (2011) 479-490.
- [18] Gaharwar A.K., Schexnailder P.J., Kline B.P., Schmidt G.: Assessment of using Laponite® cross-linked poly(ethylene oxide) for controlled cell adhesion and mineralization. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 568-577.
- [19] Ghadiri M., Chrzanowski W., Lee W.H., Fathi A., Dehghani F., Rohanizadeh R.: Physico-chemical, mechanical and cytotoxicity characterizations of Laponite®/alginate nanocomposite. *Applied Clay Science* 85 (2013) 64-73.
- [20] Palusziewicz C., Stodolak-Zych E., Kwaitek W., Jeleń P.: Bioactivity of a Chitosan based Nanocomposite. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering* 10 (2011) 95-106.
- [21] Kokubo T., Takadama H.: How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials* 27 (2006) 2907-2915.
- [22] Mucha M.: Chitozan: wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych, WNT, Warszawa 2010.
- [23] Peng Li, Nam Hoon Kim, David Hui, Kyong Yop Rhee, Joong Hee Lee,: Improved mechanical and swelling behavior of the composite hydrogels prepared by ionic monomer and acid-activated Laponite, *Applied Clay Science* 46 (2009) 414-417.
- [24] Sakurai K., Maegawa T., Takahashi T.: Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(*N*-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* 41 (2000) 7051-7056.
- [25] Wen Zeng, Jinghui Huang, Xueyu Hu, Wei Xiao, Mengyao Rong, Zhi Yuan, Zhuojing Luo: Ionically cross-linked chitosan microspheres for controlled release of bioactive nerve growth factor. *International Journal of Pharmaceutics* 421 (2011) 283-290.