

Piśmiennictwo

- [1] Glocker D.A., Ismat Shah S.: Handbook of thin film process technology. Bristol Philadelphia: IoP, 2002.
- [2] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Surface engineering in production Titanium biomaterials. Printing house of Warsaw University of Technology, Warszawa, 2004.
- [3] Hoche H., Allebrandt D., Bruns M., Riedel R., Fasel C.: Relationship of chemical and structural properties with the tribological behavior of sputtered SiCN films. Surface & Coatings Technology 202 (2008) 5567-5571.

References

- [4] Li D., Guruvenket S., Azzi M., Szpunar J.A., Klemberg-Sapieha J.E., Martinu L.: Corrosion and tribo-corrosion behavior of a-SiC_x:H, a-SiN_x:H and a-SiC_xN_y:H coatings on SS301 substrate. Surface & Coatings Technology 204 (2010) 1616-1622.
- [5] Konefał-Góral J., Małek A., Kluska S., Jonas S.: Modyfikacja powierzchni podłoży tytanowych warstwami węglazotku krzemu. Inżynieria Materiałowa 3 (2012) 185-188.

MINERALIZACJA ENZYMATYCZNA KOMPOZYTÓW BIOSZKŁO/GUMA GELLAN

MAGDALENA PILARZ¹, WOJCIECH PIWOWARCZYK¹,
GRZEGORZ KRAWCZYK¹, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA²,
TIMOTHY E.L. DOUGLAS³, ELŻBIETA PAMUŁA^{1*}

¹AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

²AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA SZKŁA I POWŁOK AMORFICZNYCH,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

³POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP,
GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GENT, BELGIUM

*MAILTO: EPAMULA@AGH.EDU.PL

Streszczenie

W przypadku wykorzystania hydrożeli w inżynierii tkanki kostnej wskazane jest takie ich zmodyfikowanie aby zawierały w swoim składzie składniki mineralne i/lub mogły ulegać samoistnej mineralizacji. W niniejszej pracy podjęto próbę wytworzenia kompozytów hydrożelowych z gumy gellan i różnej zawartości (0,75%, 1,5%, 3%) szkła bioaktywnego (BG) uzyskanego uprzednio metodą zol-żel. Kompozyty dodatkowo wzbogacono w enzym sprzyjający mineralizacji (fosfataza alkaliczna – ALP) oraz poddawano je inkubacji w roztworze glicerofosforanu wapnia (CaGP) przez czas 1, 3 i 7 dni. Oceniono właściwości mechaniczne kompozytów w próbie ściskania oraz dokonano pomiarów ich masy po wysuszeniu, które świadczyły o obecności BG oraz tworzeniu się fazy mineralnej. Morfologię próbek po wysuszeniu analizowano za pomocą mikroskopu stereoskopowego zaś ich mikrostrukturę za pomocą mikroskopu skaningowego elektronowego (SEM). Przeprowadzono też badania za pomocą mikroanalizy rentgenowskiej (EDS). Ba-

ENZYMATIC MINERALIZATION OF BIOGLASS/GELLAN GUM COMPOSITES

MAGDALENA PILARZ¹, WOJCIECH PIWOWARCZYK¹,
GRZEGORZ KRAWCZYK¹, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA²,
TIMOTHY E.L. DOUGLAS³, ELŻBIETA PAMUŁA^{1*}

¹AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

²AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF GLASS TECHNOLOGY AND AMORPHOUS COATINGS,
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

³POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP,
GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GENT, BELGIUM

*MAILTO: EPAMULA@AGH.EDU.PL

Abstract

When using hydrogels in bone tissue engineering it is desirable to modify them to include in their structure mineral particles and/or induce their spontaneous mineralization. In this study attempts to prepare gellan gum hydrogel/bioactive glass composites with various contents (0.75%, 1.5%, 3%) of sol-gel derived bioactive glass (BG) were undertaken. Composites were additionally enriched with an enzyme which promotes mineralization (alkaline phosphatase – ALP) and incubated in calcium glycerophosphate solution (CaGP) for 2, 4 and 7 days. Mechanical properties were evaluated on the basis of the results of compression tests and mass measurements of dried samples indicated the presence of BG and formation of mineral phases. Morphology and microstructure of dried samples were analyzed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy (SEM), respectively. Studies using X-ray microanalysis (EDS) were also performed. It was found that in composites without ALP mineralization did not occur or only to a very small

ania wykazały, że w kompozytach bez dodatku ALP mineralizacja nie zachodziła lub zachodziła w bardzo niewielkim stopniu. Obserwacje SEM i analiza EDS wykazały tworzenie się fosforanów wapnia w próbkach kompozytowych zawierających ALP po inkubacji w CaGP. Najkorzystniejsze właściwości mechaniczne wykazywały kompozyty wzbogacone w ALP i zawierające najmniej BG (0.75%) poddane 7-dniowej inkubacji w CaGP.

Słowa kluczowe: hydrożele, mineralizacja, ALP, inżynieria tkanki kostnej

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 85-88]

Wstęp

Guma gellan jest polisacharydem produkowanym przez bakterie *Sphingomonas paucimobilis* i znalazła już zastosowanie jako rusztowanie do regeneracji tkanki chrzęstnej [1]. Aby można ją było zastosować do odbudowy tkanki kostnej, bardzo pożądana jest jej mineralizacja [2]. Nasze wcześniejsze badania wykazują, że dodatek enzymu – fosfatazy alkalicznej (ALP) i późniejsza inkubacja w roztworze glicerofosforanu wapnia (CaGP) wywołują tworzenie wydzieli mineralnych (fosforanów wapnia) na powierzchni jak i w objętości próbek hydrożelowych [3]. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie czy dodatek bioaktywnego szkła otrzymanego metodą zol-żel wpływałby korzystnie na mineralizację enzymatyczną gumy gellan. Otrzymane kompozyty badano pod kątem stopnia mineralizacji, składu chemicznego wytworzonych minerałów oraz właściwości mechanicznych w próbie ściskania.

Materiały i metody

Próbki zostały przygotowane przez ogrzewanie roztworu GG (0.7%, GelzamTM CM, Sigma) przez 30 min w 90°C, a następnie po ochłodzeniu do 50°C dodano ALP (0.5 mg/ml, Sigma), CaCl₂ (0.03%) oraz bioszkło (0,75% 0.5% lub 3.0% masa/obj.) i mieszaninę odłano na szklaną szalkę Petriego. Do przygotowania próbek użyto bioaktywnego szkła otrzymanego metodą zol-żel o składzie molowym: 80%SiO₂-16%CaO-4%P₂O₅ i wielkości ziaren poniżej 5 μm. Następnie za pomocą stempla uzyskano cylindryczne próbki o średnicy 8 mm i grubości 5 mm. Mineralizację prowadzono poprzez inkubację próbek w roztworze 0.1 M CaGP (Aldrich) przez 2, 4 oraz 7 dni; roztwór zmieniano codziennie. Po zakończeniu mineralizacji próbki zostały wypłukane w wodzie Milli-Q (3x) a następnie w niej inkubowane przez 1 dzień w celu wypłukania pozostałości CaGP.

Pozostałość suchej masy była wyliczona jako (masa próbek po inkubacji i po suszeniu/masa próbek po inkubacji przed suszeniem)•100%. Własności mechaniczne próbek były badane za pomocą testu ściskania na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 (prędkość obciążania 2 mm/min, odkształcenie 50%). W celu obserwacji morfologii kompozytów wykonano zdjęcia przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (StereoDiscovery, Carl Zeiss, Niemcy) oraz skaningowego mikroskopu elektronowego (NOVA NANOSEM 200, FEI, USA) wyposażonego w przystawkę do mikroanalizy rentgenowskiej EDS (Link, USA).

Wyniki i dyskusja

Tworzenie się fazy mineralnej w materiałach wykazano pośrednio poprzez badania suchej masy oraz modułu Younga kompozytów GG/BG. Natomiast bezpośrednio efekt tego

degree. SEM observation and EDS analysis showed formation of calcium phosphate in samples containing ALP. The best mechanical properties were exhibited by composites enriched with ALP and with the lowest amount of BG (0.75%), incubated 7 days in CaGP.

Key words: hydrogels, mineralization, ALP, bone tissue engineering.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 85-88]

Introduction

Gellan gum is a polysaccharide produced by the bacteria *Sphingomonas paucimobilis* and has already been used as a scaffold for cartilage regeneration [1], but for bone tissue engineering applications its mineralization would be very advantageous [2]. Our previous studies have shown that the addition of the enzyme – alkaline phosphatase (ALP) and subsequent incubation in a solution of calcium glycerophosphate (CaGP) induce formation of mineral (calcium phosphate) on the surface and the bulk of hydrogel samples [3]. The aim of this study was to determine whether the addition of bioactive glass obtained previously by a sol-gel method affects the enzymatic mineralization of gellan gum positively. Composites were evaluated with respect to amount and nature of mineral formed, the chemical composition of minerals and the mechanical properties in compression tests.

Materials and methods

Samples were prepared by dissolving GG (0.7%, GelzamTM CM, Sigma) in Milli-Q water for 30 min at 90°C. After cooling it to 50°C ALP (0.5 mg / ml, Sigma), CaCl₂ (0.03%) and bioglass (BG) were added and the mixture was cast onto a glass Petri dish. For sample preparation BG obtained by sol-gel with composition: SiO₂ 80%-16%CaO-4%P₂O₅ and grain size below 5 μm was used. BG content was 0.75% 0.5% 3.0% (w/vol.). GG/BG hydrogel cylinders of diameter 8 mm and thickness 5 mm were prepared by cutting them out with a hole punch. Mineralization was performed by incubation of the samples in 0.1 M CaGP (Aldrich) for 2, 4 and 7 days; the solution was changed every day. After conclusion of mineralization, gels were rinsed three times in Milli-Q water and subsequently incubated in Milli-Q for 1 day with the aim of removing residual CaGP.

The dry mass percentage was calculated as: (weight after incubation and subsequent drying/weight after incubation before drying)•100. Mechanical properties of the samples were studied in compression tests on the universal testing machine Zwick 1435 (loading speed of 2 mm/min, strain 50%). Morphology of the composites was observed under a stereomicroscope (StereoDiscovery, Carl Zeiss) while microstructure was observed under a scanning electron microscope (NOVA NANOSEM 200, FEI, USA) equipped with an EDS microanalyzer (Link, USA).

Results and discussion

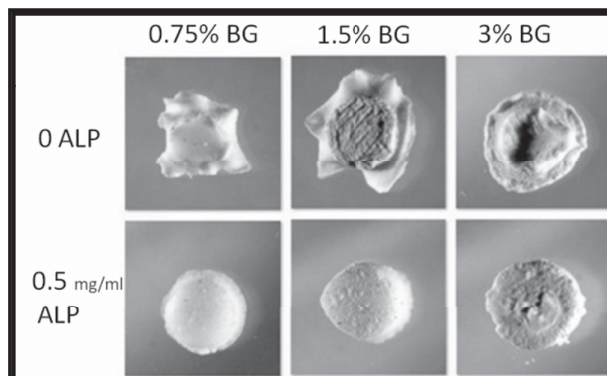
Formation of mineral phase was demonstrated directly by dry mass and Young's modulus measurements of GG/BG composites. The effect of this process was confirmed indirectly by microscopic observations and EDS microanalysis.

Analysis of dry mass percentage results for samples without ALP shows its higher values in the case of higher BG content, and that it does not change with incubation time in CaGP (FIG.1A; samples 0 ALP). In the case of the sample without BG, but containing only ALP, an increase of

procesu stwierdzono za pomocą badań mikroskopowych i mikroanalizy EDS.

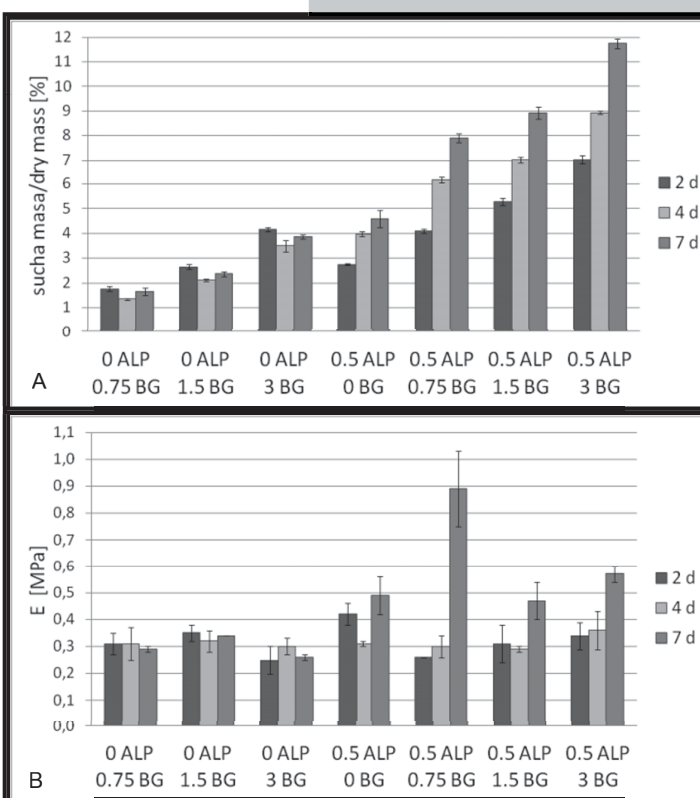
Analiza wyników suchej pozostałości w przypadku próbek kompozytowych nie zawierających ALP wykazuje jej większe wartości w przypadku większego udziału BG oraz to, że nie zmienia się ona w funkcji czasu inkubacji w CaGP (RYS.1A; próbki 0 ALP). W przypadku próbki nie zawierającej BG ale zawierającej tylko ALP występuje wzrost suchej pozostałości w funkcji czasu inkubacji, co jest spowodowane tworzeniem się fazy mineralnej (RYS.1A, próbka 0.5 ALP 0 BG). Natomiast dla trzech pozostałych zestawów próbek, tj. zawierających 0,5 ALP i różną zawartość BG, występuje istotny wzrost suchej pozostałości zarówno w funkcji czasu inkubacji jak i stężenia BG, co świadczy o tworzeniu się fazy mineralnej indukowanej przez obecność ALP.

Badania wytrzymałościowe wykazały, że obecność samego BG w żadnym z analizowanych stężeń jak i też czas inkubacji nie wpływają na moduł Younga próbek (RYS.1 B; próbki 0 ALP). Największy wzrost modułu Younga obserwuje się dla próbek zawierających ALP i 0,75% BG i inkubowanych przez 7 dni w CaGP. Może to być spowodowane lepszym i bardziej homogenicznym rozproszaniem cząstek BG w matrycy hydrożelowej, przez co również enzym jest rozprowadzony bardziej homogenicznie na granicach międzyfazowych. W konsekwencji grani-



RYS. 2. Morfologia próbek gumy gellan/bioszkło o różnej zawartości bioszkła (0,75%, 1,5%, 3%) bez ALP (0 ALP) i z zawartością 0,5 mg/ml ALP po inkubacji w CaGP przez 7 dni.

FIG. 2. Morphology of gellan gum/bioglass samples with various content of bioglass (0.75%, 1.5%, 3%) without ALP (0 ALP) and with 0.5 mg/ml ALP after incubation in CaGP for 7 days. Images from stereomicroscope. Size of images 5 mm x 5 mm.

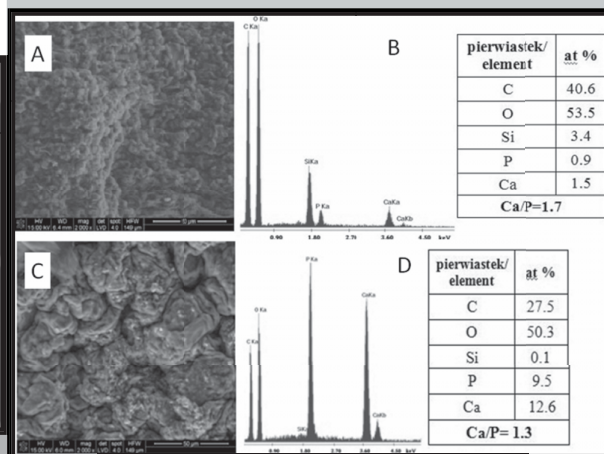


RYS. 1. Zmiany masy (A) i modułu Younga (B) próbek z gumy gellan o różnej zawartości bioszkła (0,75%, 1,5%, 3%) bez ALP (0 ALP) i z zawartością 0,5 mg/ml ALP (0.5 ALP) po inkubacji w CaGP przez 2, 4 i 7 dni.

FIG. 1. Mass changes (A) and Young's modulus (B) of gellan gum/bioglass samples with various contents of bioglass (0.75%, 1.5%, 3%) without ALP (0 ALP) and with ALP (0.5 ALP) after incubation in CaGP for 2, 4 and 7 days.

dry residue with time is noted, which is caused by formation of mineral phase (FIG.1A; sample 0.5 ALP 0 BG). For the three additional sets of samples, i.e. containing 0.5 ALP and different concentrations of BG, a significant increase of dry residue as a function of time and BG concentration occurred, which is proof of mineral formation induced by ALP.

Mechanical tests demonstrated that the presence of BG itself at all analyzed concentrations, and incubation times does not influence Young's modulus of the samples (FIG.1B; samples 0 ALP). The highest increase of modulus is observed for the samples containing 0.5 ALP and 0.75% BG and incubated for 7 days in CaGP. It is probably caused by better and more homogeneous distribution of BG particles in the hydrogel matrix, and as a result, the enzyme is more homogeneously distributed at the interface hydrogel



RYS. 3. Obrazy SEM (A, C) i analiza EDS (B, D) próbek z gumy gellan o zawartości 0,75% bioszkła bez ALP (A, B) oraz z zawartością 0,5 mg/ml ALP (C, D) po inkubacji w CaGP przez 7 dni.

FIG. 3. SEM pictures (A, C) and EDS analysis (B, D) of gellan gum/bioglass samples with bioglass content of 0.75% without ALP (A, B) and with 0.5 mg/ml ALP (C, D) after incubation in CaGP for 7 days.

ce międzyfazowe stanowią drogi szybszej dyfuzji dla jonów wapniowych i fosforanowych i wpływają korzystnie na indukcję mineralizacji. Hipoteza ta znajduje swoje potwierdzenie również w obserwacjach w mikroskopie stereoskopowym: tylko próbki zawierające ALP zachowują kształt wałców po wysuszeniu, natomiast te zawierające tylko BG są nieforemne (RYS.2). Obserwacje SEM i analiza EDX wskazują, że kompozyty GG/BG bez ALP są tylko mieszaniną GG i bio szkła. Świadczy o tym niska zawartość Ca (1,5%) i P (0,9%) i dość wysoka wartość Ca/P (RYS.3A). W przypadku próbki kompozytowej wzbogaconej w ALP obserwuje się kilkakrotny wzrost zawartości Ca (12,6%) i P (9,5%) a wartość Ca/P jest znacznie niższa. Świadczy to również o mineralizacji enzymatycznej GG, która jest wspomagana przez obecność BG.

W podsumowaniu można stwierdzić, że obecność niewielkiej ilości szkła bioaktywnego w matrycy hydrożelowej wzbogaconej w ALP wpływa korzystnie na parametry mechaniczne otrzymanego kompozytu oraz na zachowanie kształtu próbek po procesie mineralizacji. Uzyskane wyniki są obiecujące i wskazują, że opracowane materiały po przeprowadzeniu badań biologicznych będą mogły w przyszłości być rozważane jako rusztowania do leczenia ubytków tkanki kostnej.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane z prac statutowych Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie (Nr 11.11.160.256)

/ BG grain boundaries. Consequently, the interfaces act as paths of faster diffusion of calcium and phosphate ions and positively influence the mineralization induction. This hypothesis is also confirmed by the stereoscopic microscope observations: only samples containing ALP preserve their cylindrical shape after drying, whereas those containing only BG are irregular (FIG.2). SEM observations and EDS analysis show that the composites GG/BG without ALP are simply mixtures of GG and BG. This is evidenced by the low content of Ca (1.5%) and P (0.9%) and relatively high value of the Ca/P ratio (FIG.3A). In the case of composite samples enriched with ALP, a several fold increase of Ca (12.6%) and P (9.5%) is observed and the value of Ca/P is much lower. It is also proof of the process of enzymatic mineralization GG, which is supported by the presence of BG particles.

In summary it can be concluded that the presence of small amount of bioactive glass in the hydrogel matrix enriched with ALP positively affected mechanical properties and shape stability of the composite samples after mineralization process. The mineralized GG/BG composite materials developed may be in the future considered as scaffolds to treat bone tissue defects, after biological testing.

Acknowledgements

This study was supported from AGH University of Science and Technology statutory works (No 11.11.160.256)

Piśmiennictwo

[1] Oliveira, J.T., Martins, L., Picciochi, R., Malafaya, P.B., Sousa, R.A., Neves, N.M., Mano, J.F., Reis, R.L. Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications, *J Biomed Mater Res A*. 2010, 93(3), 852-63.
[2] Gkioni K, Leeuwenburgh SCG, Douglas TEL, Mikos AG, Jansen J. Mineralization of hydrogels for bone regeneration, *Tissue Eng Part B Rev*. 2010, 16(6), 577-585.

References

[3] Douglas TE, Gassling V, Declercq HA, Purcz N, Pamula E, Haugen HJ, Chasan S, de Mulder EL, Jansen JA, Leeuwenburgh SC. Enzymatically induced mineralization of platelet-rich fibrin. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2012, 100(5), 1335-46.