

MODYFIKACJA WARSTWY WIERZCHNIEJ FOSFORANÓW WAPNIA POLIMERAMI BIODEGRADOWALNYMI

MAGDALENA SZUBERT^{1*}, KATARZYNA ADAMSKA¹,
ADAM VOELKEL¹, TOMASZ BUCHWALD², MIROSLAW SZYBOWICZ²

¹ POLITECHNIKA POZNAŃSKA, WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ,
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ,
PL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 5, 60-965 POZNAŃ, POLSKA

² POLITECHNIKA POZNAŃSKA, WYDZIAŁ FIZYKI TECHNICZNEJ,
KATEDRA SPEKTROSKOPII OPTYCZNEJ,
UL. NIESZAWSKA 13A, 60-965 POZNAŃ, POLSKA

*MAILTO: MM.SZUBERT@GMAIL.COM

Streszczenie

Celem pracy była modyfikacja warstwy wierzchniej biomateriałów ceramicznych należących do grupy fosforanów wapnia –hydroksyapatyt (HA) oraz β -fosforan trójwapniowy (β -TCP), a następnie określenie wybranych właściwości biologicznych otrzymanych materiałów. Jako modyfikatory zastosowano dwa polimery biodegradowalne: glikol poli(oksyetylenowy) (PEG) oraz poli(hydroksymaślan) (PHB).

Pomyślność procesu modyfikacji potwierdzono za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FT-IR; ATR) oraz spektroskopii Ramana. Biomateriały przed modyfikacją oraz po modyfikacji poddano testom określającym ich zdolność do degradacji oraz narastania hydroksyapatytu. Test degradacji przeprowadzono zanurzając materiały w roztworze buforowym tris-HCl przez okres czterech tygodni, w ciągu których dokonywano pomiaru masy w odstępach tygodniowych. W celu zbadania zdolności wzrostu hydroksyapatytu na powierzchni materiałów, próbki inkubowano w płynie symulującym osocze krwi (SBF) w temperaturze 37°C przez miesiąc. Zmiany zachodzące na powierzchni badanych materiałów rejestrowano w odstępach tygodniowych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) oraz spektroskopii w podczerwieni.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że szybkość procesu degradacji (obliczona na podstawie procentowego ubytku masy) biomateriałów modyfikowanych zwiększyła się w przypadku hydroksyapatytu zarówno modyfikowanego PEG jak i PHB, natomiast w przypadku β -TCP szybkość ta była na porównywalnym poziomie w porównaniu do materiału wyjściowego. Analiza obrazów wykonanych z wykorzystaniem SEM wykazała widoczne zmiany w morfologii powierzchni modyfikowanych materiałów. Zmiany te mogą świadczyć o właściwościach osteoindukcyjnych tych biomateriałów.

Słowa kluczowe: hydroksyapatyt, β -fosforan trójwapniowy, modyfikacja warstwy wierzchniej, glikol poli(oksyetylenowy), poli(hydroksymaślan, bioaktywność.

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 29-32]

Wprowadzenie

Ze względu na zdolność trwałego połączenia z żywą tkanką oraz zdolność do regeneracji kości [1,2], biomateriały ceramiczne, spośród wielu grup biomateriałów stosowanych w medycynie cieszą się dużym zainteresowaniem.

SURFACE MODIFICATION OF CALCIUM PHOSPHATES BY BIODEGRADABLE POLYMERS

MAGDALENA SZUBERT^{1*}, KATARZYNA ADAMSKA¹,
ADAM VOELKEL¹, TOMASZ BUCHWALD², MIROSLAW SZYBOWICZ²

¹ POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY,
INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND ENGINEERING
5 M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE SQ. 60-965 POZNAŃ, POLAND

² POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF TECHNICAL PHYSICS,
CHAIR OF OPTICAL SPECTROSCOPY
13A NIESZAWSKA STR., 60-965 POZNAŃ, POLAND

*MAILTO: MM.SZUBERT@GMAIL.COM

Abstract

The main aim of this study is surface modification of ceramic biomaterials, belong to calcium phosphates group- hydroxyapatite (HA) and β - tricalcium phosphate (β -TCP)- and furthermore selected biological properties of obtained materials is determined. Polyethylene glycol (PEG) and polyhydroxybutyrate (PHB) are used as modifiers.

The process of surface modification of biomaterials is confirmed by means of infrared spectroscopy (FT-IR; ATR) and Raman spectroscopy. In presented study the obtained powder materials are formed on pellets and incubated in SBF (simulated body fluids solution) at body temperature. Formation of apatite layer was evaluated by means of Scanning Electron Microscope (SEM). The degradation behavior was carried out at 37°C for up to 28 days at pH 7.4 using Tris-HCl solution, and is referred to as simulation solution testing. The samples were incubated for 7, 14, and 28 days for the both simulation solution testing, using triplicate samples.

The degradation testing of modified HA showed a higher weight loss compared with unmodified HA. In the case of β -TCP the degradation rate was in similar level before and after modification. SEM images of materials showed visible changes in all of biomaterials surfaces. This changes may suggest the ability to form HA and osteoinductive properties of materials.

Keywords: hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, surface modification, polyethylene glycol, polyhydroxybutyrate, bioactivity

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 29-32]

Introduction

Ceramic biomaterials are mainly based on bioceramics calcium phosphates like hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP). These materials, due to their biological properties and structural similarity to human bone, teeth and enamel, have many applications in medicine, especially in: orthopedics, dentistry, maxillo-facial and plastic surgery [1,2]. HA is found in various forms: powder, dens or porous material or component of composites. These composites are made up of HA and metallic or polymer material [3]. HA is also applied as drug carrier, adsorbent in protein column chromatography, catalyst and ion exchanger [5, 6].

The most important attributes of HA and β -TCP are biological properties, such as high biocompatibility and bioactivity [4]. Due to these features bioceramic materials are

Biomateriały ceramiczne to głównie bioceramika oparta na fosforanach wapnia, do których należą sześciortlenek fosforu (V) dwuwodorotlenek dziesięciowapnia, czyli hydroksyapatyt (HA) o wzorze sumarycznym $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ oraz dwuortofosforan (V) trójwapnia, czyli β -fosforan trójwapniowy (β -TCP) opisany wzorem $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [1,4-6,8]. Ze względu na swoje mineralogiczne podobieństwo do apatyty biologicznego, który stanowi podstawowy składnik kości i zębów materiały te charakteryzują się właściwościami materiałów implantacyjnych tzn. są biozgodne, bioaktywne oraz osteokonduktywne [7,9]. Niestety materiały te posiadają również wady a do największych z nich należy słaba wytrzymałość mechaniczna zarówno HA jak i β -TCP [1-3, 5-9]. Podstawową różnicą pomiędzy tymi dwoma materiałami jest to, że β -TCP jest degradowalny a co za tym idzie również resorbowalny w organizmie żywym, natomiast HA nie posiada tej zdolności, ponieważ jest degradowalny tylko w formie porowatej. Pomimo bardzo dobrej biozgodności oraz bioaktywności ceramika oparta na fosforanach wapnia znalazła dotychczas zastosowanie w substytucji ubytków kostnych w miejscach nie przenoszących znacznych obciążeń mechanicznych, zaś w miejscach obciążonych jedynie jako pokrycia na implantach metalicznych lub węglowych. Ze względu na niewystarczającą wytrzymałość mechaniczną oraz nieodpowiednią resorbowalność konieczna jest modyfikacja powierzchni tych materiałów, aby mogły być szerzej stosowane w nowoczesnej medycynie.

Materiały i metody

Modyfikacje przeprowadzono poprzez zastosowanie chemicznej metody szczepienia cząstek modyfikatora na powierzchni biomateriału. Jako modyfikatory zastosowano dwa polimery z grupy biodegradowalnych tj.: glikol poli(oksyetylenowy) - PEG ($M_n=1000$, Sigma-Aldrich) oraz poli(hydroksymaślan) - PHB (Sigma-Aldrich). Modyfikacja z użyciem PEG jako modyfikatora jest reakcją dwuetapową, w której jako czynnik sprzęgający zastosowano heksametyleno diizocyjanian. Natomiast cząstki PHB zostały przyłączone bezpośrednio do powierzchni biomateriału.

Proces modyfikacji na powierzchni biomateriałów został potwierdzony metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR), techniką ATR/FTIR - osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. Attenuated Total Reflectance, ATR) oraz spektroskopii Ramana.

Materiały proszkowe zostały sprasowane za pomocą tabletkarki umieszczonej pod prasą hydrauliczną o sile nacisku 4 MPa. Badanie zdolności do degradacji przeprowadzono zanurzając pastylki w roztworze buforowym tris-HCl, natomiast w celu obserwacji wzrostu warstwy apatytowej pastylki inkubowano w płynie symulującym osocze krwi (ang. Simulated Body Fluid, SBF) przygotowanym wg procedury opisanej przez Kokubo [7]. Inkubacje materiałów w roztworze tris-HCl oraz SBF przeprowadzono w temperaturze 37°C przez okres 30 dni. Podczas trwania testu zdolności narastania hydroksyapatytu na powierzchni biomateriałów co tydzień wymieniano SBF, aby zapewnić dopływ świeżych jonów. Materiały analizowano w odstępach tygodniowych, czyli po 7, 14, 21 oraz 28 dniach. Po upływie określonego czasu próbki były wyjmowane z roztworów, przemywane wodą destylowaną, suszone w temperaturze 60°C a następnie ważone. Każdy pomiar został wykonany trzykrotnie. Zmiany zachodzące na powierzchni materiałów obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.

considered as inert material in human body [1-4]. Moreover, HA and β -TCP are also resorbable in tissue. It is desired property in case of application in bone regeneration because applied material undergoes resorption and is replaced by new tissue [5-8,10]. Thus both types of ceramics are used in clinical practice for stimulation of bone ongrowth on cementless endo-prosthetic components [6,7]. However, weak mechanical properties (flexural strength and low fracture toughness) and inappropriate resorbability limit their use as individual biomaterials. For instance, it was shown, that HA resorbed too slowly in comparison to velocity of new cells restoration. This results in retained parts of HA after months and years after implantation and then bone regrowth is impaired. While, in case of β -TCP the resorbion too fast. Then biomaterial scaffold disappear before new bone ongrowth [9]. Moreover, the major disadvantage of HA and β -TCP is weak mechanical strength, brittleness and facility to rapture. These properties limit the application of HA and β -TCP in modern medicine as individual biomaterial. Therefore, the modification of their surface is necessary. Modification of biomaterials allows manipulation of their properties in the desired direction. Therefore, due to modification process, it is possible to obtain biomaterial of improved properties.

Materials and methods

In this study one of chemical modification methods name grafting is used. Two degradable polymers: polyethylene glycol ($M_n=1000$, Sigma-Aldrich) and polyhydroxybutyrate (Sigma-Aldrich) are used as a modifiers. In this method the connection between biomaterial and modifier could be direct or indirect. In the case of PHB the reaction belongs to indirect connection, but in case of PEG between HA and modifier, the coupling agent is necessary. As a coupling agent hexamethylene diisocyanate is used.

The modification process of HA and β -TCP surface is confirmed by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR, Vertex 70, Bruker), Attenuated Total Reflectance (ATR, Vertex 70) and Raman spectroscopy (Renishaw).

The bioactivity of obtained materials specimens was evaluated by examining the apatite formation on their surfaces in SBF. SBF was prepared according to the procedure described by Kokubo [7]. Nonsterilized, pellets with the size of 2 mm in thickness, 13 mm in diameter were then soaked in 30 mL of SBF at 37°C for 7, 14, 21, and 28 days with change the solution after each week during soaking time. After soaking, specimens were removed from the SBF solution, gently rinsed with deionized water, and dried at 60°C. Scanning electron microscopy (SEM, Evo) are used to monitor the morphology of apatite formed on the biomaterials surfaces. Degradation test is performed at pH 7.4 using Tris-HCl solution without solution replacement at 37°C. The samples are incubated for 7, 14, 21 and 28 days using triplicate samples.

Results and discussions

FIGURE 1 shows FT-IR spectra of unmodified HA, HA modified by PHB and also spectrum of modifier (PHB). All of the signals characteristic for groups of polyhydroxybutyrate were detected in the spectrum of modified material (FIG. 1 (2)). The most intense band was found for carbonyl group (C=O) at approximately 1600 cm^{-1} wavenumber. Furthermore, the twin peaks at 2934-2857 and also 1479-1462 cm^{-1} belong to the aliphatic hydrocarbons (CH_3 , CH_2 and CH) stretching and bending vibrations respectively. The band at 3500 cm^{-1} signal from the stretching vibrations characteristic

Wyniki i dyskusja

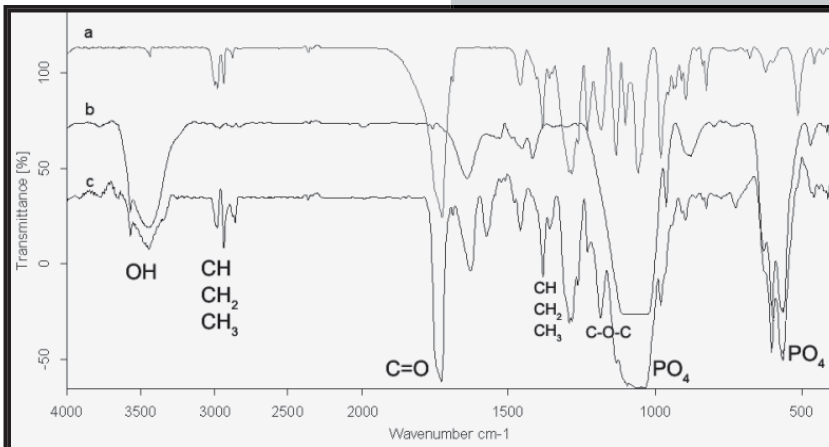
Na RYS. 1 przedstawiono widma FT-IR modyfikatora, czyli PHB (a), HA niemodyfikowanego (b) oraz HA modyfikowanego PHB (c) wraz z zaznaczonymi charakterystycznymi pasmami. Modyfikacja HA za pomocą PHB przebiegła pomyślnie, gdyż w widmie HA+PHB (RYS.1c) widoczne są pasma pochodzące zarówno od HA jak i od PHB.

RYSUNEK 2 przedstawia zdjęcia SEM hydroksyapatytu modyfikowanego PEG przed oraz po zanurzeniu w SBF. Najbardziej widoczne zmiany zachodzące na powierzchni materiału zaobserwowano po 21 dniach (RYS.2 (c)). Na podstawie obrazów SEM przypuszcza się że po 21 dniach rozpoczyna się proces wzrostu hydroksyapatytu, który jest kontynuowany, na co wskazuje RYS.2 (d). Zdolność do narastania hydroksyapatytu na powierzchni biomateriału świadczy o bioaktywności oraz właściwościach osteoindukcyjnych tych materiałów.

Wnioski

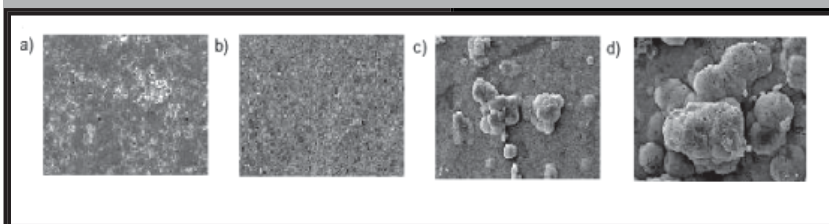
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

- Warstwa wierzchnia β -TCP oraz HA została zmodyfikowana przez dwa biodegradowalne modyfikatory (PEG oraz PHB). Świadczą o tym widma otrzymane metodami spektroskopowymi FT-IR, FT-IR/ATR oraz Ramana.
- Szybkość procesu degradacji, po modyfikacji HA wzrosła po zastosowaniu obu modyfikatorów, natomiast w przypadku β -TCP została na podobnym poziomie co przed modyfikacją.
- Zmiany zaobserwowane na zdjęciach SEM są widoczne dla wszystkich badanych materiałów.
- Najbardziej znaczące zmiany, mogące świadczyć o zdolności do wzrostu HA zaobserwowano na powierzchni HA modyfikowanego PEG oraz PHB.
- Widma wykonane po inkubacji materiałów w roztworze tris-HCl oraz SBF potwierdzają zmiany zachodzące na powierzchni biomateriałów.



RYS. 1. Widmo FT-IR PHB (a) HA niemodyfikowanego (b), oraz HA modyfikowanego PHB (c)

FIG. 1. FT-IR spectra of PHB (a), HA (b) and HA modified by PHB (c)



RYS. 2. Zdjęcia SEM HA modyfikowanego PEG przed zanurzeniem w SBF (a), po 14 dniach (b), po 21 dniach (c) oraz po 28 dniach (d). Wszystkie zdjęcia zostały wykonane w przybliżeniu 4000.

FIG. 2. SEM images of HA modified by PEG before (a) and after soaking in SBF for 14 (b), 21 (c) and 28 (d) days. All pictures were performed at magnification of 4000.

for hydroxyl groups of HA decreased after modification process.

FIG.2 shows the SEM images of HA modified by PEG pellets before (a) and after 14 (b), 21 (c) and 28 (d) days of incubation in SBF. The results show visible changes in surface morphology of pellets. The most significant changes are observed after incubation of pellets in SBF for 21 days. This change may suggest the formation of apatite layer on surface of HA PEG-grafted. These apatite layers can enhance the osteointegration and osteoconductivity. The formation of apatite layer on the surface of pellet goes through a sequence of chemical reactions like spontaneous precipitation, nucleation and growth of calcium phosphate occur when a material is incubated in SBF solution. It has

been suggested that surface chemistry plays an important role in this process and even the functional groups of materials have a large effect on the bone bonding property. The process of HA ongrowth under SBF conditions is regarded as a model of HA ongrowth in human body.

Conclusions

- The chemical modification of HA and β -TCP surface can be performed with the use of PHB and PEG as modifiers. The presence of groups from modifier on the biomaterials surface is confirmed by the means of FT-IR, ATR and Raman spectroscopy.
- The weight loss of HA modified by PEG and PHB is increased, however in the case of β -TCP the weight loss remained stable after modification.
- The changes on SEM images after incubation in SBF are observed on all biomaterials surface, but the most significant changes are observed on surface of HA modified by PEG and PHB
- Spectra obtained after soaking of materials in tris-HCl and SBF solutions also confirmed the changes on biomaterials surface

Praca finansowana przez Polskie Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant NN204 137638).

This paper was supported by N N204 137638 grant of Poland Ministry of Science and Higher Education, what is gratefully acknowledged.

Piśmiennictwo

- [1] B. Świczko-Żurek, Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2009.
- [2] Praca zbiorowa pod redakcją A. Skręta, Biomateriały, Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów, 2004.
- [3] S. Błażewicz, L. Stoch, Biomateriały tom 4, PAN, 2000.
- [4] A. Zima, Wpływ dodatków modyfikujących na właściwości hydroksyapatytowych wielofunkcyjnych tworzyw implantacyjnych przeznaczonych na nośniki leków, rozprawa doktorska AGH im. S. Staszica w Krakowie, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Kraków 2007.
- [5] J. B. Park, J. D. Bronzino, Biomaterials Principles and Applications, CRC Press, USA, 2002

References

- [6] D. Buddy Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons, Biomaterials Science, Academic Press, 2000
- [7] T. Kokubo, Bioceramic and their clinical application, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2008.
- [8] J. A. Burdick, R.L. Mauck, Biomaterials and Tissue Engineering Application, Springer-Verlag, Wien, 2011.
- [9] R.B. Heimann, Classic and Advanced Ceramics: From Fundamentals to Applications, Wiley-Vch Verlag, Weinheim, 2010.