

Wpływ procesu degradacji na właściwości fizykomechaniczne kompozytów PCL/HA

Dr inż. Agnieszka Antosik, mgr inż. Anna Woźniak, mgr inż. Adrian Najmrodzki, mgr Paulina Tymowicz-Grzyb, dr inż. Piotr Szterner, dr Agata Kurzyk, dr inż. Monika Biernat

Grupa Badawcza Biomateriały, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych

Słowa kluczowe

polikaprolakton, hydroksyapatyt, kompozyty PCL/HA, degradacja, implanty

Keywords

polycaprolactone, hydroxyapatite, PCL/HA composites, degradation, implants

Streszczenie

Kompozyty na bazie polikaprolaktonu z dodatkiem wypełniacza w postaci włókien hydroksyapatytowych są jednym z potencjalnych materiałów do zastosowań inżynierii tkankowej. Materiały te odznaczają się nie tylko odpowiednią porowatością i wytrzymałością mechaniczną, lecz także bioaktywnością, biokompatybilnością i bioresorbowalnością. Z punktu widzenia możliwości aplikacyjnych danego materiału niezwykle istotną jest kontrola procesu degradacji kompozytu w czasie, tak aby rusztowanie mogło zapewnić stabilność mechaniczną do momentu odbudowy ubytku.

W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu procesu degradacji na właściwości fizykomechaniczne opracowanych porowatych kompozytów na bazie polikaprolaktonu (PCL) z dodatkiem zsyntezowanych włókien hydroksyapatytu (HA) o zróżnicowanej morfologii. Szczególną uwagę zwrócono na wpływ zsyntezowanego proszku na zmianę właściwości fizykomechanicznych kompozytów w procesie degradacji. Próbki do badań otrzymano metodą liofilizacji. Proces degradacji badano poprzez pomiar ubytku masy, zmiany mikrostruktury, powierzchni właściwej, gęstości i wytrzymałości na ściskanie w czasie. Pomiary prowadzono po 3, 6 i 12 tygodniach inkubacji w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS). Wyniki badań wykazały, że proces degradacji badanych kompozytów jest bardzo wolny, a dodatek zsyntezowanego HA nieznacznie go przyspiesza. Ubytek masy kompozytu po 12 tygodniach inkubacji w PBS wyniósł zaledwie 0,47%. Procesowi degradacji towarzyszy spadek gęstości i wzrost powierzchni właściwej materiału w czasie. Porównanie wytrzymałości opracowanych kompozytów PCL/HA przed i po 12 tygodniach inkubacji w PBS, pozwala wnioskować, że dodatek zsyntezowanego hydroksyapatytu wpływa na wzrost wytrzymałości kompozytów w czasie (nawet do 20%).

Summary

The effect of the degradation process on the physicomechanical properties of the PCL/HA composites

Polycaprolactone-based composites with filler in the form of hydroxyapatite fibers are one of the potential materials for tissue engineering applications. These materials are characterized not only by adequate porosity and mechanical strength, but also by bioactivity, biocompatibility and bioresorbability. From the point of view of the applicability of a given material, it is extremely important to control the degradation process of the composite over time, so that the scaffold can provide mechanical stability until the defect is restored.

The paper presents the results of the study of the effect of the degradation process on the physicomechanical properties of the developed porous composites based on polycaprolactone (PCL) with the addition of synthesized hydroxyapatite (HA) fibers of different morphologies. In the study, special attention was paid to the effect of the synthesized powder on the change of physicomechanical properties of the composites during the degradation process. Samples for the study were obtained by freeze-drying method. The degradation process was studied by measuring weight loss, changes in microstructure, specific surface area, density and compressive strength over time. Measurements were conducted after 3, 6 and 12 weeks of incubation in PBS (phosphate-buffered saline).

The results showed that the addition of synthesized HA slightly accelerates the degradation process of PCL/HA composites. Nevertheless, the degradation process is very slow. The weight loss of the composite after 12 weeks of incubation in PBS was only 0.47%. The degradation process is accompanied by a decrease in density and an increase in the specific surface area of the material over time. A comparison of the strength of the developed PCL/HA composites before and after 12 weeks of incubation in PBS, allows us to conclude that the addition of synthesized hydroxyapatite affects the increase in the strength of the composites over time (up to 20%).

1. Wprowadzenie

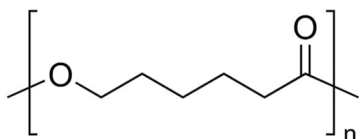
Od kilku dekad prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie alternatywnych materiałów, które mogłyby być stosowane jako substytut kości^{1,2}. Materiały do regeneracji tkanki kostnej powinny ułatwiać adhezję, różnicowanie i proliferację komórek, kierować tworzeniem tkanek i narządów, promując przeżycie i integrację z tkanką rodzimą oraz rozkładać się, gdy nie są już potrzebne. Dlatego zwykle oczekuje się, że rusztowania będą biokompatybilne, porowate, bioaktywne, biodegradowalne i o podobnych właściwościach mechanicznych jak tkanka

zastępowana³. Jednym z szeroko badanych materiałów w ostatnich latach, które mogłyby spełnić te wymagania, są polimery biodegradowalne, w tym polikaprolakton (PCL).

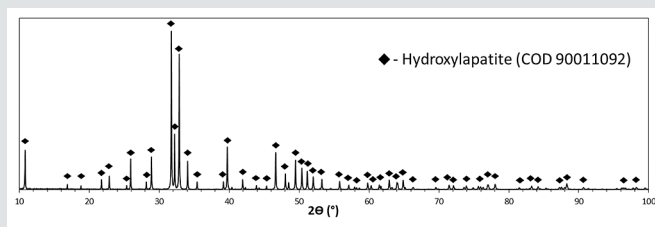
Polikaprolakton to semikrystaliczny, liniowy, resorbowalny, alifatyczny poliester o dobrych właściwościach mechanicznych, ogólnie uważany za nietoksyczny polimer kompatybilny z tkankami. Podlega biodegradacji w ciągu ok. 2 lat w wyniku hydrolizy wiązań estrowych. Produkt degradacji, kwas kapronowy, jest metabolizowany lub eliminowany przez bezpośrednie wydzielanie z nerek⁴. Długi czas degradacji przeciwdziała gromadzeniu produktów degradacji

w organizmie, co ogranicza występowanie stanów zapalnych. Czysty PCL ma ograniczone powinowactwo do komórek, stosunkowo niską sztywność i hydrofobowy charakter⁵. Dlatego zazwyczaj jest on łączony z bioaktywnymi cząstkami nieorganicznymi, takimi jak hydroksyapatyt (HA), który ma skład chemiczny zbliżony do mineralnego składnika kości^{6,7}. Liczne badania wykazały, że kompozyty PCL/HA mają większą osteoindukcyjność i osteokonduktywność niż czysty PCL^{8,9}. Połączenie unikatowych właściwości fizykochemicznych polikaprolaktonu z właściwościami hydroksyapatytu sprawia, że kompozyty PCL/HA są interesującym materiałem do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej, w szczególności wykorzystywanych przy wszczepianiu długoterminowych implantów, co wynika z długiego czasu degradacji tego typu materiałów.

Wpływ degradacji na właściwości kompozytów PCL/HA omawiany jest w literaturze naukowej stosunkowo rzadko^{10,11,12}. W wielu artykułach badano degradację PCL, m.in. w odniesieniu do takich aspektów, jak rola struktury, formy polimeru, temperatury, pH, krystaliczności, aktywności enzymatycznej i chłonności wody⁸. Podczas degradacji mogą ulec zmianie niektóre właściwości polimeru, co wpłynie również na właściwości kompozytów z jego udziałem. Z powyższych względów w niniejszej pracy omówiono wpływ procesu degradacji na zmianę właściwości fizykochemicznych opracowanych kompozytów PCL/HA poprzez zbadanie ubytku masy, mikrostruktury, powierzchni właściwej, gęstości oraz ich właściwości mechanicznych. Badania prowadzono po 3, 6 i 12 tygodniach.



Rys. 1. Wzór strukturalny polikaprolaktonu



Rys. 2. Dyfraktogram otrzymanego hydroksyapatytu



Rys. 3. Zdjęcia SEM otrzymanego hydroksyapatytu (5000 x)

2. Materiały i metodyka badań

2.1. Materiały

Jako polimer zastosowano polikaprolakton (PCL) o ciężarze cząsteczkowym $M_n = 80\,000$ i gęstości $1,145\text{ g/cm}^3$ firmy Sigma-Aldrich. Wzór strukturalny polikaprolaktonu przedstawiono na rys.1. Hydroksyapatyt otrzymano metodą jednorodnego strącania za pomocą mocznika, gdzie jako substraty zastosowano diwodoro fosforan sodu, tetrahydrat azotanu wapnia i heksahydrat azotanu cynku. Analiza składu fazowego XRD potwierdziła obecność hydroksyapatytu jako jedynej fazy (rys. 2). Włókna w postaci whiskersów miały długość $5\text{--}20\ \mu\text{m}$ i szerokość $0,5\text{--}3\ \mu\text{m}$ (rys. 3). Gęstość piknometryczna oraz wielkość powierzchni właściwej zsyntezowanego proszku wynosiły odpowiednio $2,68\text{ g/cm}^3$ i $5,45\text{ m}^2/\text{g}$.

2.2. Przygotowanie próbek do badań

Próbki do badań w postaci walców o wymiarach $10 \times 10\text{ mm}$ otrzymano w procesie termicznie indukowanej separacji faz. W ramach badań przygotowano próbki na bazie polikaprolaktonu (PCL) oraz polikaprolaktonu z dodatkiem zsyntezowanych włókien hydroksyapatytu (PCL/HA).

W celu przygotowania próbek w pierwszej kolejności polikaprolakton o stężeniu 25% wag. rozpuszczano w 1,4-dioksanie. Następnie, w przypadku materiałów kompozytowych, dodawano dodatkowo włókna hydroksyapatytu w ilości 10% wag. w stosunku do masy polikaprolaktonu i mieszano do całkowitego ujednorodnienia masy. Gotowe dyspersje przelewano do cylindrycznych form z PTFE, zamrażano ($T = -20^\circ\text{C}$, $t = 18\text{ godz.}$) i przeprowadzano ich liofilizację, a następnie uzyskane porowate rusztowania przemywano kilkakrotnie i powtórnie suszono. Otrzymane próbki PCL i PCL/HA przed i po procesie degradacji charakteryzowano za pomocą analizy SEM, BET, gęstości piknometrycznej oraz wytrzymałości na ściskanie.

2.3. Prowadzenie procesu degradacji

Badaniom degradacji hydrolytycznej poddawano próbki uprzednio wysterylizowane radiacyjnie poprzez wykorzystanie wiązki wysokoenergetycznych elektronów. Zadana dawka promieniowania wynosiła 28 kGy , prędkość transportera $0,393\text{ m/min}$, natomiast prąd zadany $\text{--}600\text{ mA}$. Próbki kompozytów przed procesem degradacji ważono na wadze analitycznej (10 szt.), a następnie umieszczano je w szczelnym pojemniku o pojemności 50 ml i zalewano $0,1\text{ M}$ roztworem azydru sodu (Warchem) w PBS (Life Technologies) (NaN_3 dodawano, aby zapobiec rozwojowi mikroorganizmów). Próbki inkubowano w cieplarni BF 115 firmy Binder przez 12 tygodni w temperaturze fizjologicznej (ok. 37°C). Raz w tygodniu roztwór PBS wymieniano. Próbki po okresie inkubacji (3, 6 i 12 tygodniach) pobierano, a następnie płukano w wodzie dejonizowanej i liofilizowano celem ich wysuszenia. Wyszuszone kompozyty ponownie ważono i poddawano dalszej analizie.

2.4. Pomiar ubytku masy

Ubytek masy próbki po procesie inkubacji wyznaczono ze wzoru:

$$U_m = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

gdzie:

U_m – ubytek masy [%],

m_0 – masa przed inkubacją [g],

m_1 – masa po okresie inkubacji [g].

Do badań zastosowano 10 próbek z każdej serii.

2.5. Analiza SEM

Analizę SEM wykonano w celu obserwacji zmiany mikrostruktury otrzymanych próbek przed i po procesie degradacji. Badania prowadzono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego z emisją polową firmy FEI, model Nova NanoSEM 200. Próbki badano w warunkach wysokiej próżni przy napięciu wzbudzającym 10 kV , z zastosowaniem detektora ETD, po wcześniejszym napyleniu próbek warstwą złota.

2.6. Badania gęstości piknometrycznej

Pomiar gęstości materiałów przed i po procesie degradacji wykonano przy pomocy piknomiety helowego AccuPyc 1340 firmy Micromeritics. Pomiar polegał na wyznaczeniu objętości badanej próbki o znanej masie, a następnie wyznaczono gęstość badanego materiału korzystając ze wzoru:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (2)$$

gdzie:

ρ – gęstość próbki [g/cm^3],

m – masa próbki [g],

V – objętość próbki [cm^3].

2.7. Badania powierzchni właściwej

Oznaczenie wielkości powierzchni właściwej BET próbki wykonano za pomocą analizatora Gemini VII (2390t) firmy Micromeritics. Badanie obejmowało wyznaczenie 9 punktów izotermy adsorpcji i desorpcji azotu w zakresie ciśnień od 0,05 do 0,25 p/p° , gdzie p jest ciśnieniem w czasie pomiaru, a p° jest ciśnieniem pary nasyconej w temperaturze pomiaru.

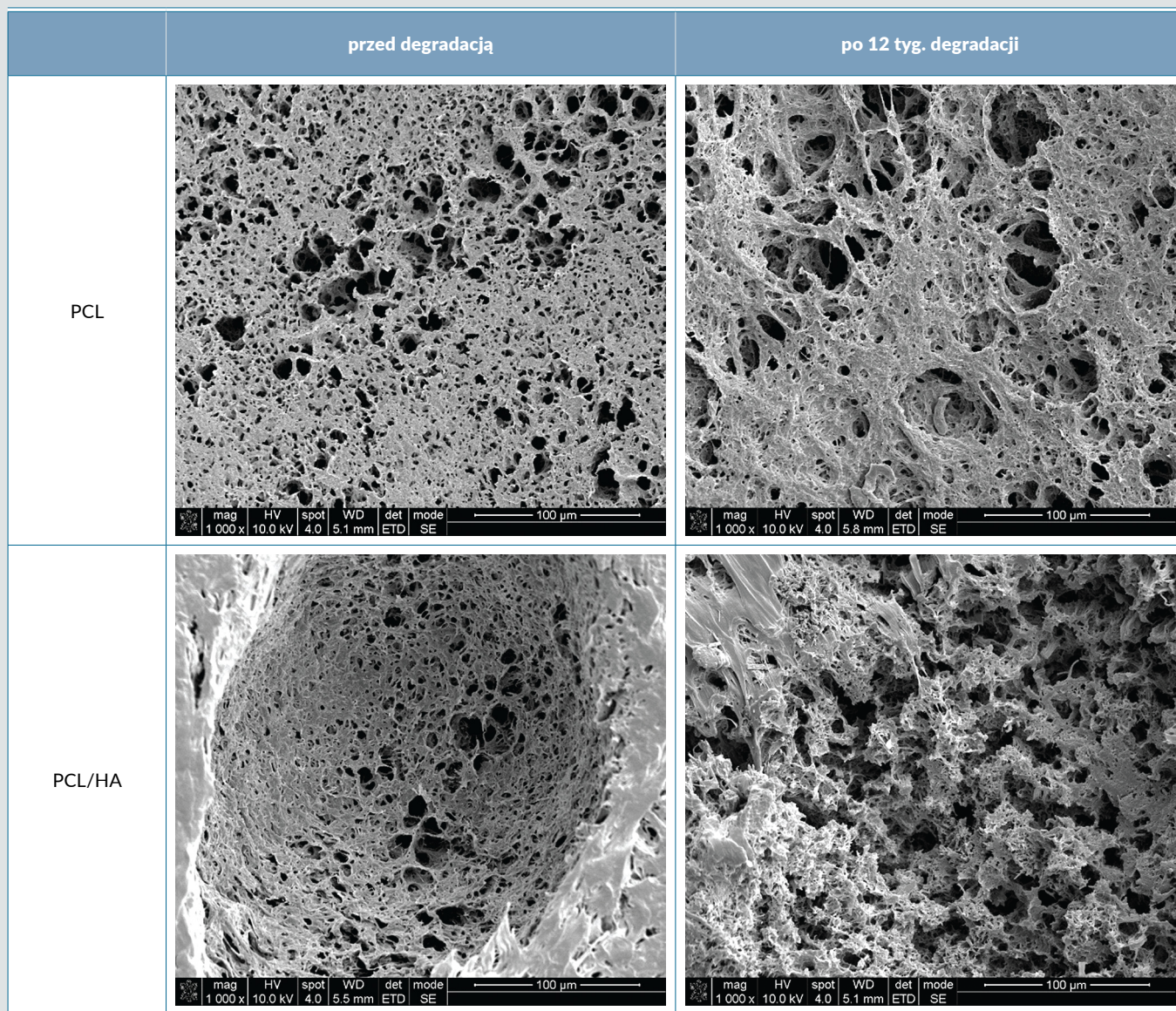
2.8. Badania wytrzymałości na ściskanie

Badania wytrzymałości na ściskanie prowadzono na maszynie wytrzymałościowej ProLine 5kN firmy Zwick Roell. Badania wytrzymałości prowadzono do 50% odkształcenia próbki. Za każdym razem pomiar prowadzono dla 5 próbek z danej serii.

3. Wyniki badań i omówienie

3.1. Badanie ubytku masy

Na rys. 4 przedstawiono wyniki badań ubytku masy otrzymanych materiałów po 3, 6 i 12 tygodniach przetrzymywania w roztworze PBS. W przypadku próbek opartych na czystym polikaprolaktonie proces degradacji do 6 tygodni postępował nieco szybciej, natomiast później znacznie zwolnił. Różnica między ubytkiem masy początkowej i masy po 6 tygodniach wynosiła 0,34%, natomiast między 6 a 12 tygodniem już tylko 0,01%. Całkowity ubytek masy próbek PCL po 12 tygodniach wynosił zaledwie 0,35%, co wynika z długiego czasu rozkładu PCL (ok. 2 lata)⁴. Wpływ na to mają właściwości hydrofobowe polikaprolaktonu, które w znaczny sposób spowalniają proces degradacji⁵. Mniejszy ubytek masy w przypadku materiałów kompozytowych na początku procesu degradacji (< 6 tygodni) wynika prawdopodobnie z mniejszego udziału



Tab. 1. Zdjęcia SEM PCL i PCL/HA przed i po 12 tyg. degradacji

polimeru w stosunku do próbek z samego PCL. Dodatek wypełniacza powoduje, że procentowo mniejsza część próbki ulega degradacji. Po 12 tygodniach natomiast ubytek masy w przypadku próbek PCL/HA był większy od próbek dla samego PCL i wyniósł już 0,47%. Według danych literaturowych dodatek wypełniacza wpływa na przyspieszenie procesu degradacji kompozytów PCL/HA⁶, która rozpoczyna się właśnie na granicy dwóch faz: organicznej polimerowej z nieorganiczną – wypełniaczem. To przyspieszenie procesu degradacji w przypadku rozpatrywanych materiałów jest po upływie 6 tygodni na tyle duże, że przewyższa efekt dodatku wypełniacza.

3.2. Obserwacja mikrostruktury przed i po procesie degradacji

W tab. 1 przedstawiono zdjęcia mikrostruktury otrzymanych próbek przed i po 12 tygodniach inkubacji w PBS. Próbki przed procesem degradacji miały zbliżoną mikrostrukturę. Na wykonanych zdjęciach SEM widoczne są losowo rozmieszczone pory zarówno małych, jak i dużych rozmiarów. Proces degradacji wpłynął na znaczną zmianę mikrostruktury obu materiałów. W przypadku próbek PCL po 12 tygodniach przetrzymywania w roztworze PBS widoczny był spadek liczby mniejszych porów kosztem porów o dużych rozmiarach. W przypadku próbek z dodatkiem hydroksyapatytu, również można było dostrzec znaczne zwiększenie się porowatości kompozytu, jednak proces ten zachodził bardziej równomiernie. Dodatkowo, degradacja polimeru przyczyniła się do odsłonięcia cząstek hydroksyapatytu, przez co ścianki kompozytu po procesie degradacji odznaczały się znacznie większą nieregularnością kształtu niż w przypadku próbek opartych wyłącznie na PCL.

3.3. Wyniki badań gęstości

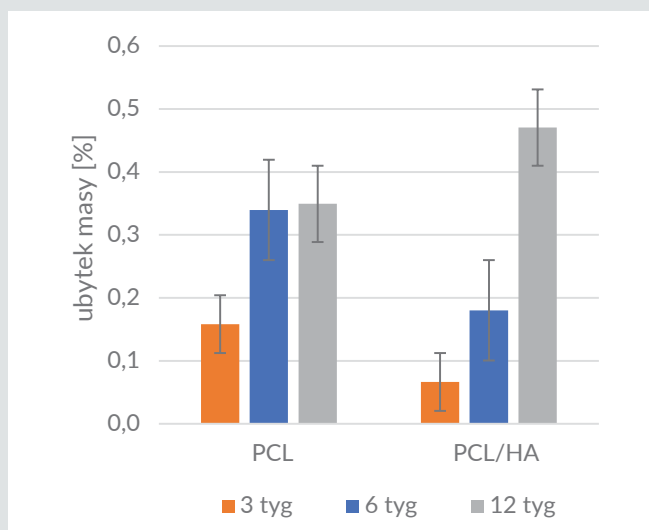
Wyniki badań gęstości otrzymanych próbek przed i po 12 tygodniach inkubacji w PBS przedstawiono na rys. 5. Przed procesem degradacji materiały kompozytowe odznaczały się większą gęstością niż próbki oparte na samym polikaprolaktonie. Jest to wynik wprowadzenia wypełniacza w postaci włókien hydroksyapatytowych, co skutkuje wzrostem gęstości materiału. Inkubacja próbek w przez 12 tygodni w PBS wpłynęła na spadek gęstości otrzymanych materiałów w czasie. Różnica gęstości przed i po procesie degradacji w przypadku kompozytów była większa niż w przypadku próbek PCL. Prawdopodobnie wynika to z większego ubytku masy w czasie degradacji danych materiałów, w porównaniu do próbek opartych wyłącznie na polikaprolaktonie. Przyczynia się to do wzrostu ich porowatości, a tym samym spadku gęstości danych materiałów w czasie.

3.4. Wyniki badań powierzchni właściwej

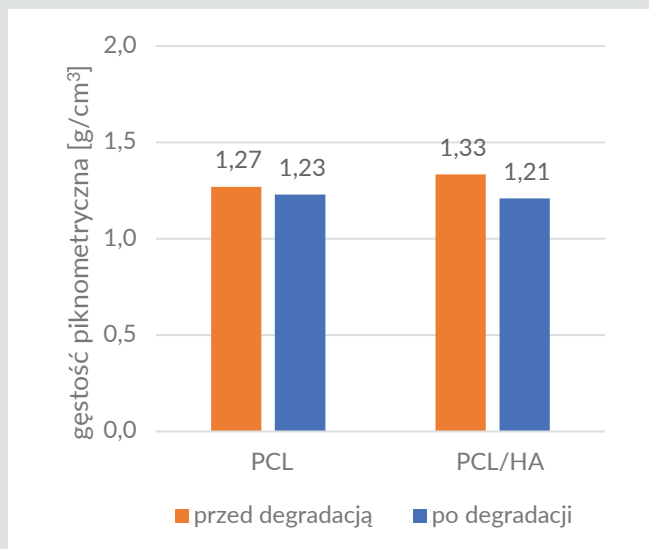
Na rys. 6 przedstawiono wyniki badań powierzchni właściwej otrzymanych materiałów przed i po 12 tyg. degradacji. Analiza badań wykazała korzystny wpływ dodatku hydroksyapatytu na wzrost powierzchni właściwej kompozytów z ich udziałem. Większe rozwinięcie powierzchni oznacza większą powierzchnię wymiany z otoczeniem, co może tłumaczyć wzrost szybkości procesu degradacji kompozytów z jego udziałem w stosunku do próbek opartych wyłącznie na polikaprolaktonie. Obserwowany wzrost powierzchni właściwej próbek po procesie degradacji może być efektem wzrostu porowatości danych materiałów w czasie.

3.5. Wyniki badań wytrzymałości na ściskanie

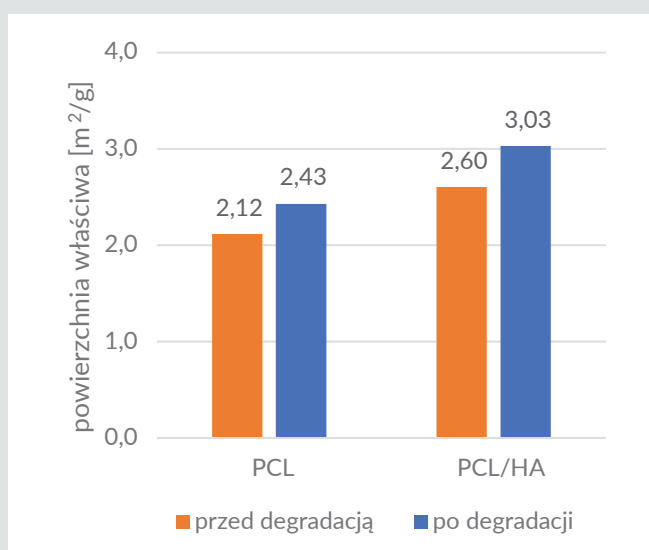
W ostatnim kroku przeanalizowano wpływ procesu degradacji na zmianę wytrzymałości mechanicznej otrzymanych próbek w czasie (rys. 7). Porównując wyniki badań wytrzymałości PCL i PCL/HA przed procesem degradacji zaobserwowano, że dodatek hydroksyapatytu wpływa na obniżenie wytrzymałości na ściskanie otrzymanych kompozytów nawet do 50%. Inkubowanie próbek na bazie PCL przez 12 tyg. w roztworze PBS spowodowało obniżenie ich wytrzymałości o ok. 20%. Dodatek wypełniacza w postaci włókien hydroksyapatytowych przyczynił się natomiast do wzrostu wytrzymałości otrzymanych kompozytów w czasie. Po 12 tygodniach inkubacji próbek w PBS wartości wytrzymałości na ściskanie PCL i PCL/HA były porównywalne.



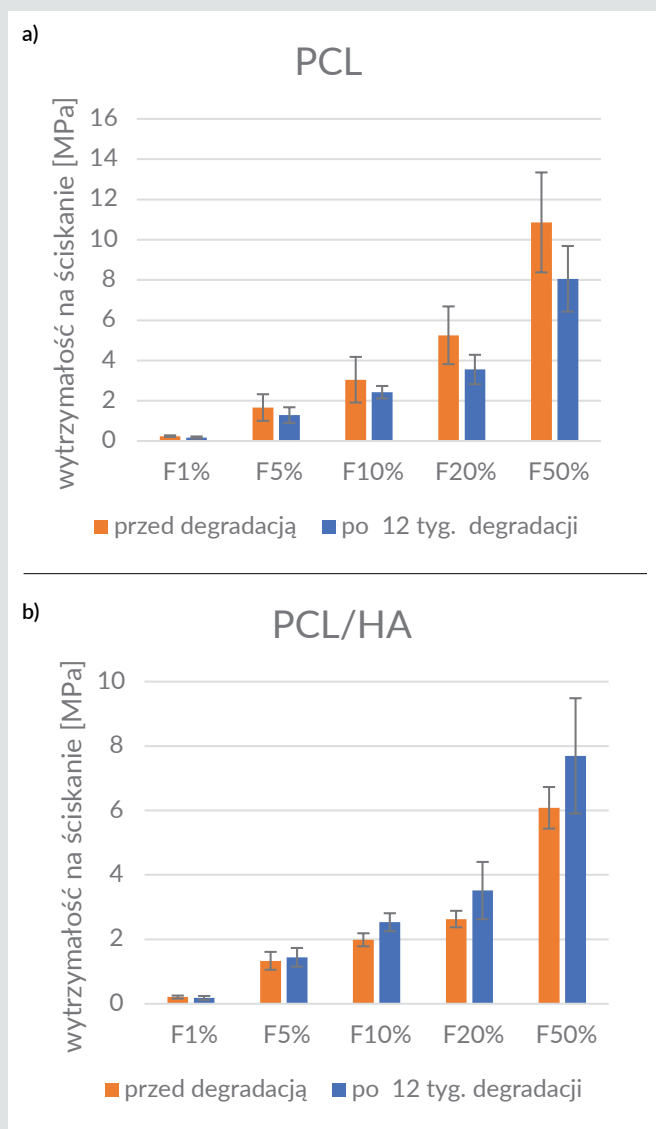
Rys. 4. Ubytek masy kompozytów po 3, 6 i 12 tygodniach inkubacji w PBS



Rys. 5. Gęstość piknometryczna próbek PCL i PCL/HA przed i po 12 tyg. degradacji



Rys. 6. Powierzchnia właściwa kompozytów przed i po 12 tyg. degradacji



Rys. 7. Wytrzymałość na ściskanie a) PCL i b) HA/PCL przed i po 12 tyg. inkubacji w PBS

4. Wnioski

W artykule przeanalizowano wpływ procesu degradacji na zmianę właściwości fizykomechanicznych opracowanych kompozytów PCL/HA w czasie. Szczególny nacisk położono na określenie wpływu zsyntezowanego hydroksyapatytu na zmianę właściwości fizykomechanicznych opracowanych materiałów kompozytowych przed i po procesie degradacji.

Wyniki badań wykazały, że głównym składnikiem odpowiedzialnym za nadanie wytrzymałości mechanicznej opracowanym kompozytom jest polikaprolakton charakteryzujący się długim czasem rozkładu. Dodatek zsyntezowanego hydroksyapatytu, poprzez wzrost rozwinięcia powierzchni, wpływa na przyspieszenie procesu degradacji kompozytów PCL/HA.

Proces degradacji powoduje znaczne osłabienie wytrzymałości na ściskanie próbek na bazie polikaprolaktonu. Dodatek zsyntezowanych włókien hydroksyapatytu o zróżnicowanej morfologii przyczynia się do wzrostu wytrzymałości kompozytów PCL/HA w czasie.

Zachowanie przez długi czas wysokiej wytrzymałości mechanicznej podczas procesu degradacji opracowanego kompozytu PCL/HA pozwala wnioskować, że jest on interesującym materiałem do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej, w szczególności do implantów długoterminowych.

Finansowanie

Projekt „Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego” (POIR.04.04.00-00-16D7/18) jest realizowany w ramach programu TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, finansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego. ■

- M. G. Raucci, et al., *Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration*, *Acta Biomaterialia*, 6 (2010), pp. 4090–4099.
- M. Ward, *Mechanical and structural performance of melt-processable bioresorbable engineering nanocomposites*, Univ. Nottingham 2018.
- E. Diaz, et al., *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials, Biopolymer Scaffolds: Manufacture*, Taylor & Francis 2014.
- D.K. Kweon, et al., *Preparation of watersoluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator*, *Biomaterials*, 24, (2003), pp. 1595–1601.
- W. Weiler, et al., *Enhancement of the mechanical properties of polylactides by solid-state extrusion: I. Poly(D-lactide)*, *Biomaterials*, 17 (1996), pp 529–535.
- J. An, et al., *Solvent-free fabrication of three dimensionally aligned polycaprolactone microfibers for engineering of anisotropic tissues*, *Biomedical Microdevices*, 14 (2012), pp. 863–872.
- S. Liu, et al., *Fabrication of polycaprolactone nanofibrous scaffolds by facile phase separation approach*, *Materials Science and Engineering C*, 44 (2014), pp. 201–208.
- K. C. Ang, et al., *Compressive properties and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation*, *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*, 80 (2007), pp. 655–660.
- F. E. Wiria, et al., *Poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering*, *Acta Biomaterialia*, 3 (2007), pp. 1–12.
- J. Pena, et al., *Long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids*, *Polymer Degradation and Stability*, 91 (2006), pp. 1424–1432.
- E. Díaz, et al., *In Vitro Degradation of Poly(caprolactone)/nHA Composites*, *Journal of Nanomaterials*, 2014 (2014), pp. 1–8.
- Y. Wang, et al., *Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro*, *Polymer Degradation and Stability*, 95 (2010), pp. 207–213.

Dr inż. Agnieszka Antosik

Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych



Zdjęcie: archiwum autora

Absolwentka Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, główny specjalista w ICiMB. Od sierpnia 2020 członek zespołu TEAM-NET Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w projekcie „Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego”. Zajmuje się opracowywaniem i badaniem materiałów do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego.

agnieszka.antosik@icimb.lukasiewicz.gov.pl

anna.wozniak@icimb.lukasiewicz.gov.pl
adrian.najmrodzki@icimb.lukasiewicz.gov.pl
paulina.tymowicz-grzyb@icimb.lukasiewicz.gov.pl
piotr.szternier@icimb.lukasiewicz.gov.pl
agata.kurzyk@icimb.lukasiewicz.gov.pl
monika.biernat@icimb.lukasiewicz.gov.pl