

WSTĘPNE BADANIA NAD DEGRADACJĄ WŁÓKIEN Z KOPOLIMERU GLIKOLIDU Z L-LAKTYDEM: ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH

JOANNA BUCZYŃSKA*, ELŻBIETA PAMUŁA*,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ*, TERESA MIKOŁAJCZYK**,
ANDRZEJ KURZAK**, PIOTR DOBRZYŃSKI***

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

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII I MARKETINGU TEKSTYLIÓW, KATEDRA WŁÓKIEN SZTUCZNYCH, UL. ŻEROMSKIEGO 116, 90-543 ŁÓDŹ

***CENTRUM CHEMII POLIMERÓW, POLSKA AKADEMIA NAUK, UL. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34/20, 41-819 ZABRZE

Streszczenie

Resorbowalne włókna z kopolimeru glikolidu z L-laktydem formowano metodą z roztworu na mokro. Za pomocą chromatografii żelowej (GPC) zbadano wpływ procesu formowania na zmianę masy cząsteczkowej tworzywa włókien. Mikrostrukturę włókien oceniono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Włókna poddano inkubacji w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) w temperaturze 37°C przez 25 tygodni. Właściwości mechaniczne włókien: wytrzymałość na rozciąganie, moduł Younga i odkształcenie zniszczenia zmierzono w funkcji czasu inkubacji *in vitro*. Badania wykazały, że otrzymane włókna charakteryzowały się stosunkowo słabymi właściwościami mechanicznymi i ulegały degradacji w ciągu 15 tygodni.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),81-84]

Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną wiedzy, której celem jest przywrócenie, podtrzymanie i poprawa funkcjonowania uszkodzonych tkanek, za pomocą substytutów zawierających komórki. Biomateriały odgrywają tutaj ważną rolę, ponieważ pełnią funkcję matryc dla wzrostu komórek, proliferacji i formowania tkanek w trójwymiarowe struktury. Do wytwarzania porowatych przestrzennych podłoży często stosuje się syntetyczne polimery biodegradowalne. Polilaktyny (PLLA, PDLA, PDLA), poliglikolid (PGA) i ich kopolimery (PGLA) są biogodne, bioresorbowalne; posiadają dobre właściwości mechaniczne oraz stosunkowo łatwo można je przetwarzać w przestrzenne porowate podłoża [1]. Najbardziej popularnymi metodami otrzymywania porowatych podłoży dla inżynierii tkankowej są: wyplukiwanie soli, separacja faz i spienianie gazem [2]. Niestety podłoża otrzymane tymi technikami cechuje izotropia właściwości. Z drugiej strony naturalne tkanki (np. ścięgna, kość, skóra) mają właściwości anizotropowe wynikające z obecności w nich białek fibrylarnych, takich jak: kolagen czy elastyna. Nowym podejściem w projektowaniu podłoży jest otrzymywanie porowatych struktur wykonanych z włókien resorbowalnych, które lepiej naśladują naturalne tkanki.

Jedną z technik otrzymywania włóknistych podłoży jest metoda elektroprzędzenia. Metoda ta pozwala na otrzymy-

PRELIMINARY STUDIES ON HYDROLYTIC DEGRADATION OF POLY(GLYCOLIDE-CO-L-LACTIDE) FIBERS: MECHANICAL PROPERTIES VARIATIONS

81
.....

JOANNA BUCZYŃSKA*, ELŻBIETA PAMUŁA*,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ*, TERESA MIKOŁAJCZYK**,
ANDRZEJ KURZAK**, PIOTR DOBRZYŃSKI***

*AGH-UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

**TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF TEXTILE ENGINEERING AND MARKETING, DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES, ŻEROMSKIEGO 116 STR, 90-543 LODZ POLAND

***CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, UL. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34/20, 41-819 ZABRZE, POLAND

Abstract

Resorbable poly(glycolide-co-L-lactide) fibers were spun from solution by the wet process. The influence of spinning process on the molecular mass changes of the fibre-forming polymer was evaluated by gel permeation chromatography (GPC). The surface of fibres was characterized by scanning electron microscopy (SEM). Fibres were incubated in phosphate buffered saline (PBS) at 37°C for 25 weeks. Mechanical properties of the fibers: tensile strength, Young's modulus and elongation at break were measured as a function of degradation time *in vitro*. The results show that the fibers have quite weak mechanical properties and degrade after 15 weeks *in vitro*.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),81-84]

Introduction

Tissue engineering is an interdisciplinary field, which aims at restoring, maintaining or improving damaged tissue function by using substitutes which include cells. Biomaterials play an important role in tissue engineering because they serve as matrices for cellular ingrowth, proliferation, and new tissue formation in three dimensions. To fabricate porous scaffolds synthetic biodegradable polymers are often used. Poly(lactides) (PLLA, PDLA, and PDLA), polyglycolide (PGA) and their copolymers (PGLA) are biocompatible, biodegradable; they have good mechanical properties and can be easily processed into three-dimensional structures [1]. The most common methods to produce porous scaffolds for tissue engineering applications are: porogen leaching, phase separation or gas foaming techniques [2]. Unfortunately, the scaffolds obtained by all these techniques have isotropic properties. On the other hand, natural tissues (eg. tendons, bone, skin) have often anisotropic properties, resulting from presence of fibrous proteins, such as collagen or elastin. A novel approach in scaffolds' designing is to produce porous structures made of resorbable fibers, which can better mimic natural tissues.

Fibrous scaffolds can be obtained by electrospinning. This technique enables production of fibrous scaffolds from PGLA and poly-ε-caprolactone. The diameter of resulting fibers is usually below 1 μm. [3-7]. Alternative methods used to produce fibrous resorbable materials are: melt spinning and

wanie włóknistych podłoży z PGLA oraz poli- ϵ -kapolaktanu. Średnica włókien otrzymanych tą techniką jest zwykle poniżej 1 μm [3-7]. Włókniste materiały resorbowalne można też formować ze stopu bądź z roztworu na mokro lub na sucho. W metodzie formowania z roztworu nie dochodzi do termicznej degradacji polimeru, z czym należy się liczyć w przypadku formowania ze stopu. Metoda formowania z roztworu pozwala na wytwarzanie włókien w szerokim zakresie składu chemicznego i masy cząsteczkowej [8]. Celem pracy było otrzymanie włókien z kopolimeru glikolidu z L-laktydem metodą z roztworu na mokro oraz ocena ich właściwości wytrzymałościowych, budowy powierzchni (za pomocą mikroskopu skaningowego) i kinetyki degradacji (na podstawie badań właściwości mechanicznych).

Materiały

Glikolid i L-laktyd (Purac, Holandia) były oczyszczane przed użyciem poprzez rekrytalizację z suchego octanu etylu, a następnie suszone w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej. Kopolimeryzację glikolidu z laktydem prowadzono w stopie w temperaturze 100°C z użyciem inicjatora $\text{Zr}(\text{acac})_4$ wykorzystując w celu odgazowania stopu konwencjonalną linię próżniową, zgodnie z metodą opisaną poprzednio [9]. Stosunek molowy inicjatora do monomerów wynosił $1,2 \times 10^{-3}$.

Włókna formowano metodą z roztworu na mokro. Roztwór polimeru sporządzono przez rozpuszczenie PGLA w N,N-dimetyloformamidzie (DMF). Stężenie roztworu wynosiło 20%. Stosowano przędzarkę wielkolaboratoryjną, której konstrukcja umożliwia stabilizację parametrów procesowych i ciągłą ich kontrolę. Używano dyszy przędzalniczej 240-otworowej o średnicy otworków 0,08 mm. Proces zestalania prowadzono w wodnej kąpeli zawierającej rozpuszczalnik (20-40%) w temperaturze 8-15°C. Proces rozciągania realizowano jednoetapowo w kąpeli plastyfikacyjnej o zawartości rozpuszczalnika wynoszącej około 15-30% w temperaturze 30-50°C. Po usunięciu rozpuszczalnika włókna suszono w warunkach izometrycznych w niskiej temperaturze.

Metody

Właściwości materiałów

Skład chemiczny badanego kopolimeru określono za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR (spektrometr firmy Varian Unity Inowa). Masy cząsteczkowe M_n i M_w kopolimeru i otrzymanych włókien wyznaczono stosując metodę chromatografii żelowej GPC za pomocą chromatografu Spectra Physics SP 8800.

Średnica włókien PGLA była mierzona na Lanametrze stosując okular z podziałką mikrometryczną, jako uśrednienie pomiarów 25 pojedynczych włókien.

Obserwacje mikrostruktury włókien przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego JSM 5400 JEOL przy powiększeniach odpowiednio 50, 500 i 1000 razy. Przed analizą próbki napyłono cienką warstwą węgla w celu nadania im właściwości przewodzących.

Badania degradacji

Badania degradacji prowadzono w roztworze NaCl (0.9%) buforowanym 24 mM Na_2HPO_4 i 16 mM KH_2PO_4 (PBS) o pH równym 7.0. Pęczek włókien pocięto na kawałki o długości około 8 cm umieszczono w pojemnikach, zalano 100 ml roztworu PBS i przetrzymywano w temperaturze 37°C. przez 25 tygodni. Co 2 tygodnie wyjmowano po 2 próbki, płukano trzy razy w ultra czystej wodzie (PureLab UHQ, Elga, Niemcy) i suszono w suszarce próżniowej w

solution spinning by wet or dry process. The method of spinning from the solution by the wet process avoids degradation of the polymer as in the case of the high temperature spinning from melt. The method of spinning from the solution permits to produce resorbable fibers over a wide range of the molecular weights and concentrations [8].

The aim of this study was to obtain fibers from copolymer of glycolide and L-lactide by the method of spinning from the solution by the wet process and to evaluate their mechanical properties, character of their surface (by scanning electron microscopy) and degradation kinetics (on the base of mechanical properties examination).

Materials

Glycolide and L-lactide (Purac, Holland) were purified by recrystallization from dry ethyl acetate in a vacuum dryer at a room temperature. Copolymerization of glycolide and lactide was performed in bulk with a $\text{Zr}(\text{acac})_4$ initiator at 100°C by a conventional method using a vacuum line for degassing and sealing of the ampoules according to the method described previously [9]. The molar ratio of the initiator and the monomers was 1.2×10^{-3} . The fibers were spun from the solution by the wet process. 20% polymer solution was prepared by dissolving of PGLA into N,N-dimethyl formamide (DMF). The laboratory spinning machine, whose construction made it possible to stabilise technological parameters at a required level under continuous control was used. Spinnerettes with 240 orifices of diameter of 0,08 mm were used. The solidification process was carried out in a bath containing an aqueous solution of the solvent (20-40%) at a temperature of about 8-15°C. The drawing process was performed in a single stage, in a plastic bath containing the solvent (15-30%) at an elevated temperature up to 30-50°C. Finally, solvent was rinsed off, and the resultant fibres were dried under the isometric conditions at a low temperature.

Methods

Properties of materials

The copolymer composition was determined by ^1H NMR measurements (Varian Unity Inowa spectrometer). The molecular mass M_n and M_w of copolymer before and after processing in the fibers were determined by gel permeation chromatography with the Physics SP 8800 chromatograph. The diameter of PGLA fibers was measured by Lanametr using eyepiece with a micrometer scale and it was obtained by averaging the diameter of 25 individual fibres.

The microstructure of fibers was studied by JSM 5400 scanning electron microscope (JEOL, Japan) at magnification 50, 500 and 1000 times respectively. Before analysis the samples were coated with a thin carbon layer in order to make them conductive.

Degradation study

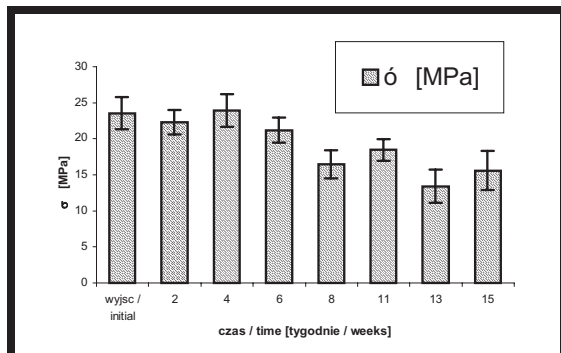
Degradation of fibers was performed in 0.9% sodium chloride solution buffered with 24mM Na_2HPO_4 and 16 mM KH_2PO_4 (PBS -solution) of pH=7.0 at 37°C. The bunches of fibers were cut into pieces of the length 8 cm and were incubated in 100ml of buffer in plastic vials for 25 weeks. The buffer was exchanged every week. After every 2 weeks two bunches were taken, washed three times in UHQ water (PureLab UHQ, Elga, Germany) and dried in a vacuum oven at 25°C for 24h. The buffer was exchanged every week. Mechanical properties of fibers: tensile strength, Young's modulus and elongation at break on 25 individual fibers from each experimental group were measured at room temperature by universal testing machine Zwick 1435 at crosshead

temperaturze 25°C. Roztwór buforowy wymieniano co tydzień.

Właściwości mechaniczne: wytrzymałość na rozciąganie, moduł Younga i odkształcenie przy zerwaniu pojedynczych włókien wyciągniętych z pęczka badano za pomocą uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Zwick 1435 stosując szybkość rozciągania 50 mm/min i wykonując pomiary dla 25 włókien z każdej serii pomiarowej. Długość próbki (włókna) była równa 25 mm, moduł Younga mierzony był w zakresie obciążeń od 0.002 N do 0.004 N.

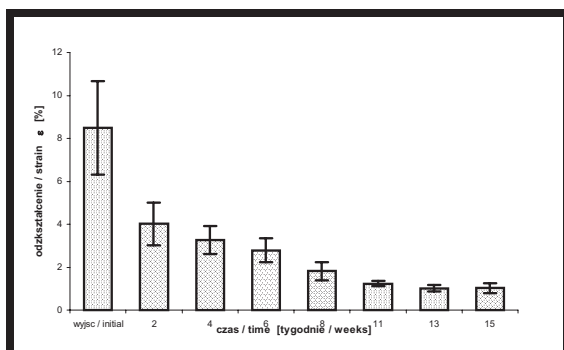
Wyniki i dyskusja

Właściwości kopolimeru i włókien

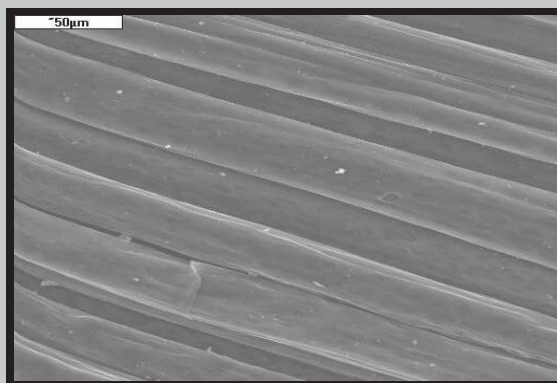


RYS. 2. Zależność wytrzymałości na włókien PGLA od czasu inkubacji w PBS.
FIG. 2. Variation of tensile strength of fibers as a function of incubation time in PBS.

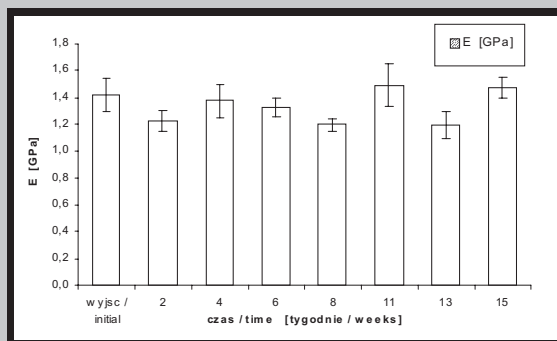
Analiza ¹H NMR wykazała, że stosunek molowy glikolidu do L-laktydu w kopolimerze wynosił 17:83. Badania chromatografii żelowej wykazały, że liczbowo średnia masa cząsteczkowa, *M_n*, kopolimeru wynosiła 85 000 D, a wagowo średnia masa cząsteczkowa była równa 161 500 D. Liczbowo średnia masa cząsteczkowa tworzywa otrzymanych włókien była równa 63 000 D, a wagowo średnia masa cząsteczkowa wynosiła 126 000 D. Stwierdzono, że operacje związane z procesem formowania włókien takie jak zestalanie w kąpeli (woda-DMF) oraz odpłukanie rozpuszczalnikiem spowodowały spadek masy cząsteczkowej tworzywa włókien o około 25%. Jest to związane z degradacją łańcuchów kopolimeru prawdopodobnie w wyniku hydrolizy.



RYS. 4. Zależność odkształcenia do zniszczenia włókien od czasu inkubacji w PBS.
FIG.4 . Variation of elongation at break of fibers as a function of incubation time in PBS.



RYS. 1. Obraz włókien z PGLA (SEM, 500x).
FIG. 1. Microphotograph of PGLA fibers (SEM, 500x).



RYS. 3. Zależność modułu Younga włókien od czasu inkubacji w PBS.
FIG. 3. Variation of Young's modulus of fibers as a function of incubation time in PBS.

speed of 50 mm/min. The length of the specimen was 25 mm. The Young's modulus was estimated in the range of loading between 0.002 N and 0.004 N.

Results and discussion

Properties of copolymer and fibers

A molar ratio of glycolide to L-lactide in the copolymer PGLA was 17:83, as determined ¹H NMR. Gel permeation chromatography showed that number average molecular mass, *M_n*, of copolymer was 85 000 D, and weight average molecular mass, *M_w*, was 161 500 D. The number average molecular mass, *M_n*, of fibers was 63 000 D, and weight average molecular mass, *M_w*, was 126 000 D. It has been found that the operations connected with the fiber formation process such as solidification in a water-DMF bath and solvent washing out caused the molecular weight of polymer to decrease by about 25%. This seems to be due to the degradation of copolymer chains by hydrolysis.

FIG.1. shows microstructure of PGLA fibers obtained by scanning electron microscope (SEM). The surface of fibers is smooth, and the diameter of fibers is about 30 μm. The diameter of fibres measured by the optical microscope is also 30±1 μm. The initial fibers are characterized by tensile strength of 23.5±2.2 MPa, Young's modulus of 1.4 ± 0.1 GPa and elongation at break of 8.5±2.2 %.

The fibres have quite weak mechanical properties, what makes them not suitable for reinforcing of the composites and preparation of load-bearing implants. However, poor mechanical properties do not exclude such fibres to be utilized as scaffolds for tissue engineering, where the most important criteria are biocompatibility, proper microstructure

RYS.1 przedstawia obraz włókien PGLA otrzymany za pomocą mikroskopu skaningowego SEM. Powierzchnia włókien jest gładka, a ich średnica wynosi około 30 μm . Średnica włókien mierzona za pomocą mikroskopu optycznego wynosiła również $30\pm 1 \mu\text{m}$. Włókna wyjściowe miały wytrzymałość na rozciąganie równą $23.5\pm 2.2 \text{ MPa}$, moduł Younga równy $1.4\pm 0.1 \text{ GPa}$ i odkształcenie zniszczenia równe $8.5\pm 2.2 \%$.

Włókna te mają słabe właściwości mechaniczne, dlatego nie nadają się do wzmacniania kompozytów i wytwarzania z nich implantów przenoszących duże obciążenia. Jednakże słabe właściwości mechaniczne nie wykluczają zastosowania tych włókien jako podłoża dla inżynierii tkankowej, gdzie najważniejsze są takie parametry jak biogodność, odpowiednia mikrostruktura i czas degradacji.

Badania degradacji

RYS.2,3 i 4 przedstawiają zależności wytrzymałości na rozciąganie, modułu Younga i odkształcenia przy zniszczeniu włókien w funkcji czasu inkubacji w PBS. Włókna przetrzymywano w PBS przez 25 tygodni, ale już po inkubacji przez 15 tygodni włókna stawały się słabe i kruche, że nie było możliwe przeprowadzenie badań mechanicznych. Wytrzymałość na rozciąganie i odkształcenie zniszczenia spadały w funkcji czasu inkubacji w PBS, podczas gdy moduł Younga nie ulegał wyraźnym zmianom. W funkcji czasu inkubacji w PBS włókna stawały się słabe i kruche ale nie zmieniała się ich średnica. To sugeruje, że tworzywo włókien ulegało degradacji w masie w wyniku reakcji hydrolizy.

Wnioski

1. Zastosowanie metody formowania z roztworu na mokro przy użyciu jako rozpuszczalnika DMF umożliwia uzyskanie włókien z kopolimeru glikolidu z L-laktydem. Z etapami procesu formowania włókien (zestalenie, usuwanie rozpuszczalnika) związane jest obniżenie masy cząsteczkowej tworzywa włókien do około 75% wartości początkowej kopolimeru po syntezie.
2. Inkubacja w czasie 15 tygodni w PBS powoduje utratę właściwości wytrzymałościowych z zachowaniem postaci włókien przez 25 tygodni.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w roku 2005 (projekt nr 082/T08/2002)

and adequate degradation profile.

Degradation study

FIGs.2, 3 and 4 present variations of tensile strength, Young's modulus and elongation at break of fibers as a function of incubation time in PBS. The fibres were incubated in PBS for 25 weeks, but after immersion time longer than 15 weeks, the fibres were so fragile, that it was impossible to perform mechanical tests. Tensile strength and elongation at break of fibers decrease during incubation in PBS, while Young's modulus remains constant. During incubation in PBS the fibres become weak and fragile but their diameter do not change. It suggest that the fibres degrade through hydrolysis in bulk.

Conclusions

1. The use of the wet process of fiber forming from solution using DMF as solvent makes it possible to obtain fibers from the copolymer of glycolide and L-lactide. The stages of fiber forming such as solidification and solvent removal bring about a decrease in the molecular weight of the fiber-forming polymer to about 75% of the initial value of the polymer after its synthesis.
2. The incubation for a period of 15 weeks in PBS results in the loss of mechanical properties, while the fibers maintain their form for 25 weeks.

Acknowledgement

This work was financed from the Polish Budget Funds for Scientific Research within the year 2005 (project No 082/T08/2002).

Piśmiennictwo

References

- [1] J.R. Fuchs, B.A. Nasser, J.P. Vacanti, Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction, *Ann Thorac Surg* 72 (2001) 577-91.
- [2] G. Mikos, J. S. Temenoff: "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering", *Biotechnology of Human Disorders* 3 (2000), 1-7
- [3] L. A. Smith, P. X. Ma "Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39 (2004), 125 - 131
- [4] X. Zong, S. Ran, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu "Control of structure, morphology and property in electrospun poly(glycolide-co-lactide) non-woven membranes via post-draw treatments", *Polymer* 44 (2003), 4959-4967
- [5] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, B. Chu "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes", *Polymer* 43 (2002), 4403-4412.
- [6] K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou "Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical application", *Biomaterials* 24 (2003), 4977- 4985
- [7] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna "Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering", *Biomaterials* 26 (2005), 2603-2610
- [8] S. Gogolewski, A. J. Pennings "Resorbable materials of poly(L-lactide). II. Fibers spun from solution of poly(L-lactide) in good solvents" *Journal of Applied Polymer Science* 28 (1983), 1045- 1061
- [9] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero "Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by $\text{Zr}(\text{acac})_4$ ", *Macromolecules* 34 (2001), 5090-5098.