

BADANIE PROCESU DEGRADACJI KOMPOZYTÓW Z POLIMERÓW RESORBOWALNYCH W WARUNKACH IN VITRO

JAN CHŁOPEK*, ANNA MORAWSKA*, LUDWIKA UMAŃSKA*, CZESŁAWA PALUSZKIEWICZ**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI

*KATEDRA BIOMATERIAŁÓW

**KATEDRA CHEMII KRZEMIANÓW I ZWIĄZKÓW WIELKOCZĄSTECZKOWYCH

[*Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 132-136*]

Wstęp

Polimerowe materiały resorbowalne cieszą się w medycynie dużym zainteresowaniem ze względu na ich biogodność i możliwość stopniowego zastępowania implantu tkanką kostną. Jednak prawidłowe funkcjonowanie takiego implantu wymaga ścisłej kontroli procesu degradacji, jego kinetyki oraz uwalniania produktów rozkładu. Proces ten może ulegać zmianie w zależności od wprowadzanych dodatków modyfikujących [1, 2].

Ze względu na złożone uwarunkowania dotyczące zarówno właściwości mechanicznych jak i biologicznych, najlepszym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie materiałów kompozytowych. Zmieniając rodzaj fazy wzmacniającej oraz modelując jej rozkład i udział w kompozycie można uzyskać szeroki zakres właściwości mechanicznych i biologicznych [3, 4]. Przy zastosowaniu jako osnowy polimerów resorbowalnych istotne jest określenie relacji pomiędzy czasem jego resorpcji a czasem potrzebnym do regeneracji leczonej tkanki. Faza wzmacniająca oprócz podwyższenia wytrzymałości kompozytu w początkowym etapie implantacji, może pełnić rolę rusztowania dla nowotworzonej tkanki kostnej lub też stymulować jej wzrost. Taki materiał może być również nośnikiem leków [5]. W ten sposób możliwe jest otrzymanie kompozytowych materiałów wielofunkcyjnych [6, 7].

W pracy badano w warunkach in vitro zależność szybkości procesu degradacji materiałów: PGLA, PGLA + CF i PGLA + HAP od rodzaju wzmocnienia oraz od rodzaju środowiska. Po różnych czasach inkubacji próbek wykonano pomiary masy, analizę mikroskopową powierzchni (SEM), badania składu fazowego (FTIR) oraz pH roztworów.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono na próbkach w kształcie wałków, wykonanych z kompozytów o osnowie z kopolimeru laktydu z glikolidem (PGLA): 84% laktydu i 16% glikolidu, wyprodukowany w Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrzu, $M_n=85000$ Da, $M_w/M_n=2,1$. Jako fazy wzmacniającej użyto 15% wag. włókien węglowych (CF): FT 300B Torayka, $d=1,76$ g/cm³, $s_r=3,2$ GPa, $E=235$ GPa oraz 15% cząstek hydroksyapatytu pochodzenia naturalnego

THE "IN VITRO" STUDY OF DEGRADATION PROCESS IN COMPOSITES MADE OF RESORBABLE POLYMERS

JAN CHŁOPEK*, ANNA MORAWSKA*, LUDWIKA UMAŃSKA*, CZESŁAWA PALUSZKIEWICZ**

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW, POLAND

FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS

*DEPARTMENT OF BIOMATERIALS

**DEPARTMENT OF SILICATE CHEMISTRY AND MACROMOLECULAR COMPOUNDS

[*Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 132-136*]

Introduction

Polymer resorbable materials enjoy considerable interest in medicine due to their bio-compatibility as well as possibility of implant replacement by the bone tissue. However, the appropriate functioning of such implant requires strict control of degradation process, its kinetics as well as release of degradation products. This process may vary depending on the introduced modifying additives [1, 2].

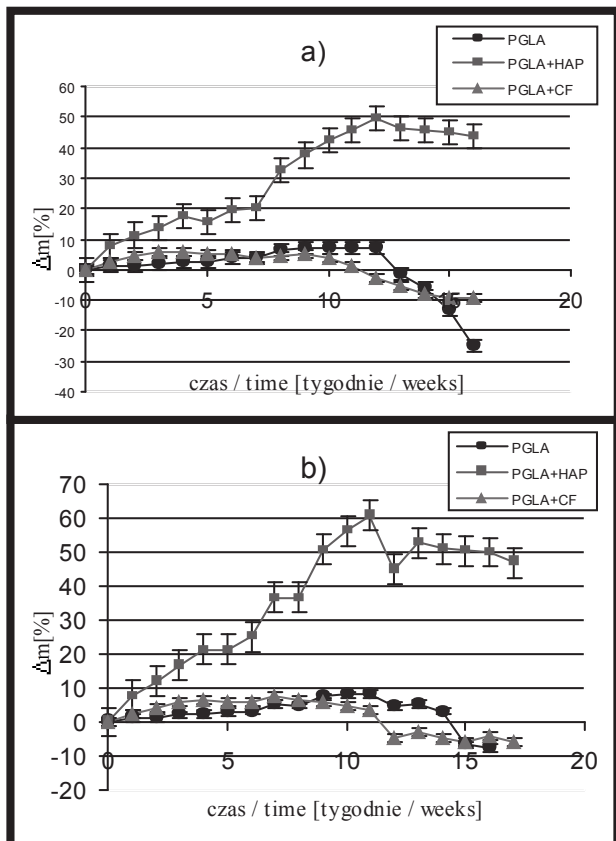
Considering complex implications relative to both mechanical and biological properties, the best solution seems to be the use of composite materials. Varying the type of reinforcing phase and designing its spatial distribution and content, broad range of mechanical and biological properties can be obtained [3, 4]. Using polymer resorbable matrices, it is important to define the relationship between the time of its resorption and the recovery time required for the cured tissue. Besides the function of increasing the composite's strength within the first stage of implantation, the reinforcing phase may fulfil the function of the scaffold for newly formed bone tissue, as well as stimulate its growth. Such material may serve also as medication carrier [5]. This way it is possible to obtain the multifunctional composite materials [6, 7].

In this work the relationships between the velocity of degradation, the type of reinforcement and the environment have been studied for the following materials: PGLA, PGLA+CF and PGLA+HAP.

After application of different incubation times, the samples were tested for mass and pH of solutions, also the microscopic surface analyses and phase analyses (FTIR) were performed.

Materials i methods

The tests were carried out on cylinder-shaped samples made of composites with 84% lactide/16% glycol co-polymer (PGLA), made by the Centre for Polymer Chemistry in Zabrze (Poland), with $M_n=85000$ Da, $M_w/M_n=2,1$. The reinforcing phase was made of 15 w/o of carbon fibres (CB): 300B Toraya, $d=1,76$ g/cm³, $s_r=3,2$ GPa, $E=235$ GPa, and 15w/o of natural origin (beef bone) hydroxyapatite (HAP) $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, $d=3.16$ g/cm³, specific surface $S_w=79,7$ m²/g [8]. The experiments were also carried out on sam-



RYS. 1. Zmiana masy próbek PGLA, PGLA + HAP i PGLA + CF w funkcji czasu inkubacji a) w SBF, b) w płynie Ringera.
FIG. 1. The variation of mass of the samples PGLA, PGLA + HAP and PGLA + CF as a function of time of incubation a) in SBF, b) in Ringer fluid.

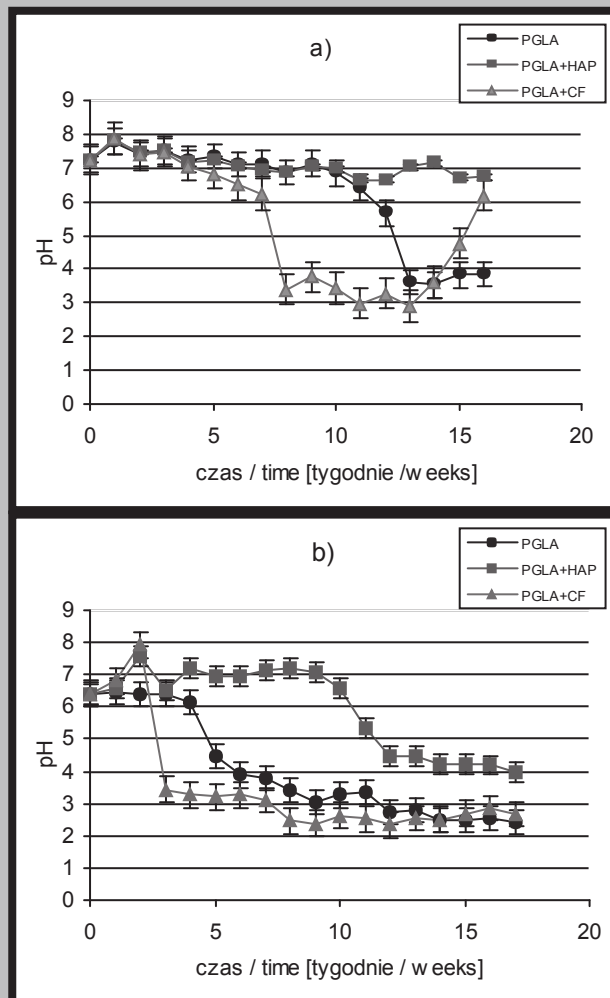
(kość wołowa) (HAP): $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, $d=3.16 \text{ g/cm}^3$, powierzchniowa właściwa $Sw = 79,7 \text{ m}^2/\text{g}$ [8]. Badania przeprowadzono również dla próbek z czystego PGLA. Walce wykonano metodą wtrysku w temperaturze 340°C .

Do symulacji środowiska biologicznego użyto płynu Ringera produkcji Baxter Terpol Sp. z o.o. o składzie $[\text{g/cm}^3]$: NaCl - 8.60, KCl - 0.30, CaCl - 0.48. Równolegle materiał inkubowano w płynie SBF (sztuczne osocze) o składzie jonowym $[\text{mmol/l}]$: Na^+ - 142.0, K^+ - 5.0, Ca^{2+} - 2.5, Mg^{2+} - 1.5, Cl - 148.8, HCO_3^- - 4.2, HPO_4^{2-} - 1.0, SO_4^{2-} - 0.5. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 16 tygodni. Co tydzień przed zmianą płynów wykonywano pomiary masy próbek oraz pH roztworów przy użyciu pH-metru CP-315 ELEMETRON.

Po 6 i 12 tygodniu przeprowadzono badania mikrostruktury przy pomocy mikroskopu scanningowego (SEM) Jeol JSM-5400 oraz badania składu fazowego metodą spektroskopii w podczerwieni (FTIR) techniką transmisyjną na spektrometrze fourierowskim firmy BIO-RAD FTS-60V.

Wyniki

RYSUNKI 1a i 1b przedstawiają zmianę masy próbek inkubowanych w płynie Ringera i w płynie SBF w funkcji czasu. Dla kompozytów PGLA+HAP masa próbek wzrasta w obu roztworach, co jest prawdopodobnie spowodowane podwyższoną adsorpcją płynów przez cząstki HAP. Masa próbek PGLA+CF spada po 9 tygodniu inkubacji zarówno w płynie Ringera jak i SBF, co świadczy o rozpoczęciu degradacji polimeru. Dla PGLA w obu przypadkach obserwujemy spadek masy po 12 tygodniu. Między 14 a 15 tygo-



RYS. 2. Zmiany pH płynów a) SBF, b) Ringera, w funkcji czasu inkubacji próbek PGLA, PGLA + HAP i PGLA + CF.
FIG. 2. Variations of fluid pH: SBF, b) Ringer, as a function of time of incubation of samples PGLA, PGLA+HAP and PGLA+CF.

ples made of pure PGLA. The cylinders were made by injection molding at 340°C .

The Ringer Fluid made by Baxter Terpol Sp. z o.o. (of composition $[\text{g/cm}^3]$: NaCl - 8.60, KCl - 0.30, CaCl - 0.48 simulated the biological environment. The material was simultaneously incubated in the SBF fluid (artificial serum), with the following ionic composition $[\text{mmol/l}]$: Na^+ - 142.0, K^+ - 5.0, Ca^{2+} - 2.5, Mg^{2+} - 1.5, Cl - 148.8, HCO_3^- - 4.2, HPO_4^{2-} - 1.0, SO_4^{2-} - 0.5. Samples were incubated at the temperature 37°C during 16 weeks.

The pH of solutions and the mass measurements were performed on a weekly basis using the pH-meter CP-315 ELEMETRON.

After the sixth and 12th week the microstructure was examined using scanning microscope (SEM) Jeol JSM-5400, and the phase composition was examined by transmission infrared spectroscopy (FTIR) using the Fourier Spectrometer BIO-RAD FTS-60V.

Results and discussion

FIGURES 1a and 1b show the variation of mass of samples immersed in Ringer and SBF fluids as a function of time. For PGLA + HAP composites the mass of samples

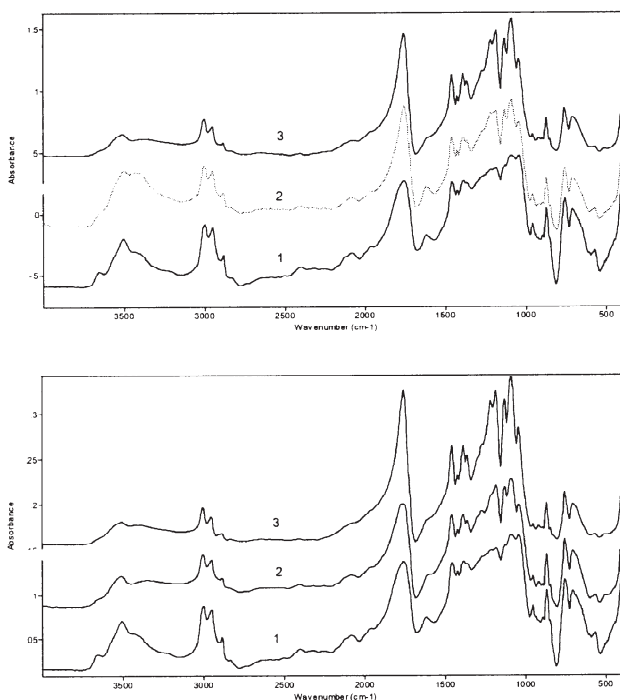
dniem spadek masy dla próbek PGLA i PGLA + CF wynosi ok. 8% w stosunku do masy wyjściowej, a w 16 tygodniu ubytek masy walców PGLA inkubowanych w płynie SBF wynosi już ponad 20%.

We wszystkich próbkach poddanych inkubacji obserwuje się w początkowym etapie adsorpcję płynu i pęcznienie próbek, co objawia się widocznym wzrostem masy.

Zmiany pH płynów fizjologicznych przedstawiają RYSUNKI 2a i 2b. PGLA inkubowany w SBF (RYS. 2a) zaczyna ulegać degradacji po 10 tygodniu, o czym świadczy spadek pH. Obecność włókien węglowych przyspiesza degradację, (5 tydzień inkubacji), co może być spowodowane lepszą penetracją płynu w polimerze po granicy faz włókno-osnowa. Po 13 tygodniu widoczny jest wzrost pH związany prawdopodobnie z odsłanianiem powierzchni włókien węglowych zawierających grupy funkcyjne o charakterze zasadowym lub osadzaniem a następnie rozpuszczaniem HAP na powierzchni włókien. W przypadku kompozytów PGLA + HAP nie zachodzą znaczące zmiany pH płynu SBF. Może być to związane z równoczesnym zachodzeniem procesu degradacji oraz wytrącania i rozpuszczania HAP.

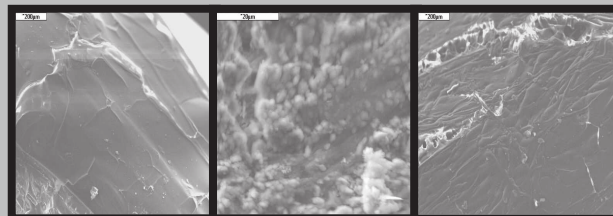
Początek degradacji PGLA inkubowanego w płynie Ringera rozpoczyna się już w 4 tygodniu (RYS.2b). Dla kompozytu PGLA+CF degradacja przebiega gwałtownie między 2 a 3 tygodniem, natomiast dla PGLA+HAP zmiana pH widoczna jest dopiero po 10 tygodniu inkubacji.

Morfologię powierzchni próbek PGLA, PGLA+HAP i PGLA+CF po 12 tygodniach inkubacji przedstawiają RYSUNKI 3a, b, c. Na zdjęciu powierzchni PGLA+HAP (RYS. 3b) widoczne są narośla kryształów HAP na podłożu kompozytowym, co potwierdza, że materiał ten po spełnieniu swojej funkcji mechanicznej, po procesie resorpcji osnowy może stanowić podłoże dla wzrostu tkanki kostnej. Brak wy-



RYS. 4. Widmo FTIR dla próbek PGLA inkubowanych a) w płynie Ringera b) w SBF, 1-PGLA, 2-PGLA po 6 tygodniach, 3- PGLA po 12 tygodniach.

FIG. 4. The FTIR spectra for samples PGLA incubated in a) Ringer fluid b) in SBF: 1-PGLA; 2-PGLA after 6 weeks; 3- PGLA after 12 weeks.



RYS. 3. Obrazy SEM powierzchni próbek po 12 tygodniach inkubacji w SBF: a) PGLA, b) PGLA+HAP, c) PGLA+CF.

FIG. 3. The SEM images of sample surfaces after 12 weeks of incubation in SBF: a) PGLA, b) PGLA+HAP, c) PGLA+CF.

increases in both solutions, which is probably due increased adsorption of liquids by the HAP particles. The mass of PGLA+CF samples decreases during week 9 of incubation in both, Ringer and SBF fluids, which indicates the commencement of polymer degradation. For PGLA in both cases the mass decrease can be observed after week 12 of incubation. The loss of mass for PGLA and PGLA+CF samples between weeks 14 and 15 amounts to 8% of initial mass, and the loss of mass of PGLA cylinders during week 16 of incubation in SBF fluid exceeds 20%.

In the case of all samples under incubation the adsorption of liquid and swelling of samples can be observed, which is indicated by a visible mass increase.

The pH changes of physiological fluids are shown on FIGURES 2a and 2b. The PGLA incubated in SBF (FIG. 2a) begins to undergo the degradation after the 10th week, what is confirmed by the decrease of fluid's pH value. The presence of carbon fibres accelerates the degradation process (week 5 of incubation), what may be caused by easier penetration of the fluid within fibre-matrix interface. After the week 13 the pH increase is visible, and this may be due to exposing of carbon fibre surfaces which contain functional groups of basic character. Another cause may be deposition and then dissolution of HAP on fibres surfaces. There are no significant pH changes of SBF fluid in the case of composites PGLA+HAP. This may be due to simultaneous occurrence of the processes of degradation and precipitation and dissolution of HAP.

The degradation of PGLA incubated in Ringer fluid begins already in week 4 (FIG. 2b). For PGLA+CF composite the degradation occurs intensively between the 2nd and 3rd week, while for PGLA+HAP the pH variation becomes visible only after the 10th week of incubation.

The surface morphologies of samples PGLA, PGLA+HAP and PGLA+CF after 12 weeks of incubation are seen in FIGURES 3a, b, c. The picture of PGLA+HAP (FIG.3b) shows the excrescence of HAP crystals on composite base, what confirms that this material, after fulfilling its mechanical function, and after resorption process of the matrix may become a good substrate for ingrowth of bone tissue. The lack of HAP releases on the surface of PGLA and PGLA+CF samples (FIG. 3a,c) confirms the lack of bioactive action of these substrates.

FIGURES 4,5 and 6 show spectral results obtained by infrared spectroscopy. The analysis of infrared spectra obtained for samples PGLA+HAP (FIG. 5) indicates the changes in intensity of bands within the range 2800-3000 cm^{-1} , corresponding to tensile oscillations of CH_3 and CH_2 as well as changes of bands 1050-1300 cm^{-1} corresponding to oscillations C-O. The decreasing intensity of bands related to oscillations CH_3 and CH_2 confirms polymer degradation, whereas increase of intensity of bands originating

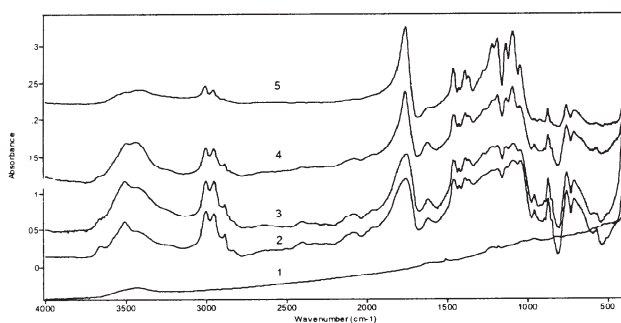
dzielen HAP na powierzchni próbek PGLA oraz PGLA+CF (RYS.3a,c) świadczy o braku bioaktywnego działania tych podłoży.

RYSUNKI 4, 5, 6 przedstawiają widma uzyskane metodą spektroskopii w podczerwieni. Analiza widm w podczerwieni uzyskana dla próbek PGLA+HAP (RYS. 5) wskazuje zmiany intensywności pasm w zakresie 2800-3000 cm^{-1} odpowiadających drganiom rozciągającym CH_3 i CH_2 jak i pasm 1050-1300 cm^{-1} odpowiadających drganiom C-O. Zmniejszająca się intensywność pasm związanych z drganiami CH_3 i CH_2 świadczy o degradacji polimeru, natomiast wzrost intensywności pasm pochodzących od drgań C-O sugeruje podwyższenie stopnia krystaliczności materiału. W środowisku płynu SBF proces degradacji przebiega wolniej, co przedstawia utrzymujące się pasmo z max. w ok. 3470 cm^{-1} odpowiadające drganiom O=H oraz mniejsze różnice w intensywności pasm związanych z grupami CH_3 i CH_2 . Podobne zmiany pasm są widoczne dla próbek PGLA i PGLA+CF (RYS. 4 i 6) co świadczy o analogicznych procesach.

Wnioski

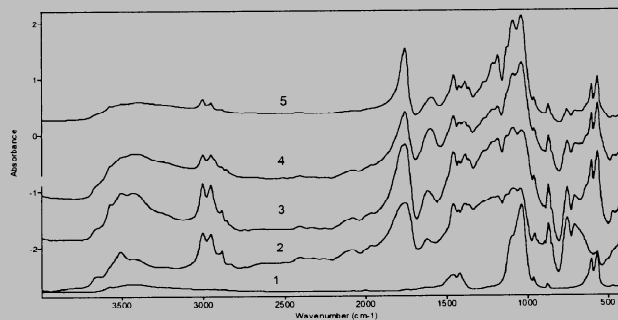
Płyn Ringera przyspiesza proces degradacji badanych materiałów, co świadczy o większej aktywności tego środowiska w stosunku do SBF. Może to być wynikiem mniejszej lepkości płynu Ringera i ułatwionej penetracji w strukturę polimeru i po granicach faz.

Dodatek włókien węglowych przyspiesza proces degradacji polimeru. Dla PGLA+HAP widoczna jest równowaga trzech procesów: resorpcji polimeru oraz wytrącania i rozpuszczania HAP. Wytrącaniu hydroksyapatytu sprzyja bioaktywne



RYS. 6. Widmo FTIR dla próbek PGLA+CF inkubowanych a) w płynie Ringera b) w SBF, 1-włókno węglowe, 2-PGLA, 3-PGLA+CF, 4-PGLA+CF po 6 tygodniach, 5-PGLA+CF po 12 tygodniach.

FIG. 6 . The FTIR spectra for samples PGLA+CF incubated in a) Ringer fluid b) SBF: 1-carbon fibre; 2-PGLA; 3-PGLA+CF; 4-PGLA+CF after 6 weeks; 5-PGLA+CF after 12 weeks.



RYS. 5. Widmo FTIR dla próbek PGLA+HAP inkubowanych a) w płynie Ringera b) w SBF, 1-proszek HAP, 2-PGLA, 3-PGLA+HAP, 4-PGLA+HAP po 6 tygodniach, 5- PGLA+HAP po 12 tygodniach.

FIG. 5. The FTIR spectra for samples PGLA+HAP incubated a) in Ringer fluid b) in SBF: 1- powder HAP; 2 - PGLA; 3 - PGLA+HAP; 4 - PGLA+HAP after 6 weeks; 5 - PGLA+HAP after 12 weeks.

in C-O oscillations suggests the increase of degree of crystallinity of the material. In SBF fluid environment the degradation process occurs with slower rate, what is illustrated by the band with max. around 3470 cm^{-1} corresponding to oscillations O=H, and smaller differences of intensity of bands related to groups CH_3 and CH_2 . Similarly, changes of bands can be observed for samples PGLA and PGLA+CF (FIGS. 4 and 6), which confirms the occurrence of similar processes.

Conclusions

The Ringer fluid accelerates the process of degradation of the examined materials, which confirms stronger activity of this environment as compared to SBF. This may be also due to lower viscosity of Ringer fluid facilitating penetration into polymer's structure and interphases.

Addition of carbon fibres accelerates the polymer degradation process. For PGLA+HAP the equilibrium of three processes can be noted: polymer resorption and HAP precipitation and dissolution. The presence of bioactive substrate and the Ca^{2+} i PO_4^{3-} ions in SBF are both conducive to HAP precipitation.

The results obtained in this work show the complex nature of the process of degradation of composites based on resorbable polymers. However, the factors indicated here and affecting the process may constitute the basis for elaboration of multifunctional implants, capable of carrying high

podłoże oraz obecność w SBF jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} . Uzyskane wyniki obrazują złożony charakter procesu degradacji kompozytów na bazie polimerów resorbowalnych. Jednak przedstawione w pracy czynniki wpływające na ten proces mogą stworzyć bazę dla opracowania wielofunkcyjnych implantów, zdolnych do przenoszenia podwyższonych naprężeń i do stymulacji wzrostu tkanki kostnej po resorpcji polimeru.

Piśmiennictwo

- [1] R.K. Kulkarni, S.G. Moore, A.F. Higyeli, F. Leonard: Biodegradable Poly(lactic amid) Polymers, *J. Biomed. Mater. Res.* 5, (1971).
 [2] J. Chłopek, E. Pamuła, M. Błażewicz, K. Makinen: Materiały kompozytowe z nowego biodegradowalnego kopolimeru glikolid-laktyd dla celów medycznych, *Inżynieria Biomateriałów*, rok 3 nr 12 (2000).
 [3] J. Chłopek: Kompozyty w medycynie, *Kompozyty* 1 (2001).
 [4] J. Chłopek, M. Błażewicz, B. Szaraniec: Kompozyty bioaktywne, *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, vol. 3, sup.1 (2001).
 [5] Z. Jedliński, M. Juzwa: Kontrolowane uwalnianie leków. Nowa strategia w chemioterapii, *Inżynieria Biomateriałów*, rok V, nr 22

References

- (2002).
 [6] W. Bonfield, M.D. Grynblas, A.E. Tully, J. Bowman, J. Abram: Hydroxyapatite reinforced polyethylene a mechanically compatible implant material for bone replacement, *Biomaterials* 2, (1981).
 [7] L. Lu, S. Peter, M. Lyman: In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams, *Biomaterials* 21, (2000).
 [8] K. Haberko, M. Bućko, M. Haberko, W. Mozgawa, A. Pyda, J. Zarębski: Hydroksyapatyt naturalny-preparatyka, właściwości, *Inżynieria Biomateriałów*, rok VI, nr 30-33 (2003).

PRZEMIESZCZENIA ODŁAMÓW KOSTNYCH JAKO CZYNNIK DETERMINUJĄCY ROZWÓJ REGENERATU KOSTNEGO

J. FILIPIAK, K. ŚCIGAŁA

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,
UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 136-138]

Wprowadzenie

Istotą leczenia złamań kości długich jest proces powstania i różnicowania się tkanek w miejscu, gdzie kość utraciła ciągłość fizyczną. W przypadku stabilizacji odłamów kostnych za pomocą zewnętrznych stabilizatorów istotny wpływ na przebieg procesu leczenia mają właściwości mechaniczne samego stabilizatora. Właściwości mechaniczne konstrukcji stabilizatora determinują zakres przemieszczeń odłamów leczonej kości i wynikający stąd stan odkształcenia regeneratu kostnego. Jest to swego rodzaju sygnał mechaniczny odbierany przez komórki tkanek, który jest zamieniany na odpowiedni sygnał chemiczny uruchamiający procesy różnicowania się tkanek.

Cel pracy

Celem prezentowanej pracy jest określenie rozkładu odkształceń i ciśnienia hydrostatycznego w regeneracie kostnym powstającym między odłamami wydłużanej kości w funkcji przemieszczeń odłamów kostnych.

DISPLACEMENT OF BONE FRAGMENTS AS A FACTOR DETERMINING BONE REGENERATE FORMATION

J. FILIPIAK, K. ŚCIGAŁA

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,
UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 136-138]

Introduction

The healing of a long bone fracture involves formation and differentiation of tissues in the area where there has been a break in bone continuity. If fragments of a broken bone are stabilised by means of external fixators, the healing process significantly depends on the mechanical properties of the fixator itself. The mechanical properties of the fixator construction determine the extent of displacement of the fragments of the treated bone and the resultant bone regenerate deformity. It is a kind of mechanical signal received by the tissue cells, which is changed into an appropriate chemical signal triggering processes of tissue differentiation.

Purpose of study

The study presented in this paper aimed to assess the distribution of strain and the hydrostatic pressure inside the regenerate formed between fragments of the elongated bone in relation to displacements of bone fragments. On the basis of histological examination of sheep and numerical simulations, Claes and Heigele (1998) proposed a