

Porózus, csontpótló poli(ϵ -kaprolakton) szerkezetek fejlesztése

Oláh László^{0,1,2} – Borbás Lajos² – Czigány Tibor¹

Kulcsszavak: felszívódó polimer, polikaprolakton, kalcium-karbonát, csontpótló

Keywords: biodegradable polymer, biocompatible, tissue engineering, poly-caprolactone, calcium carbonate

Summary

Development of porous poly(ϵ -caprolactone) (PCL) scaffolds for guided bone regeneration. In this work, highly porous PCL and inorganic material reinforced PCL scaffolds were prepared by solvent casting / particulate leaching technique. We performed compressive tests, estimation of the porosity and slat-leaching out time; moreover we investigated the surface morphology of the obtained scaffolds. We found that the pure PCL scaffolds could be utilized in maxillofacial surgery or in other non-load bearing application, till the CaCO_3 reinforced scaffolds could be applied as a generally used bone substitute.

Bevezetés

A szövetépítés (angolul: tissue engineering) napjainkban mind fontosabb helyet követel az orvos-, illetve az anyagtudomány területén. A szövetépítés célja, hogy laboratóriumi körülmények között emberi szöveteket hozzunk létre, vagy olyan vázat alkossunk mesterséges anyagokból, amely elősegíti az emberi szövetek regenerációját, olyan károsodások esetén, amelyet a szervezet, külső beavatkozás nélkül, helyreállítani nem képes. Ehhez valamilyen biokompatibilis anyagból, tipikusan felszívódó polimerből vagy kerámiából, olyan porózus szerkezetet állítunk elő, amelynek bomlástermékei nem okoznak szövet-irritációt, és funkciója betöltéséhez szükséges mechanikai tulajdonságokkal rendelkezik.

Orvosi célokra tipikusan poli(α -hidroxizsír-estereket), például a poli(tejsavat) és kompozitjait, valamint poli(ϵ -kaprolaktont) alkalmaznak. A poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) részben kristályos, lineáris, lebomló, alifás poliészter, amely az alifás észter kötés hidrolízisével bomlik le, mégpedig lassan – a lebomlási ideje mintegy 3 év –, és ezért a PCL hosszú élet-tartamú termékek (mint például csontpótló anyagok) gyártáshoz használható [1], azonban nyomószilárdsága és nyomómodulusa viszonylag kicsi (a tömb polimer nyomómodulusa: 0,4 GPa) [2, 3].

Számos eljárás létezik, amellyel porózus termékeket állíthatunk elő, például a szál-kötés, oldat-

öntéses / részecske kioldásos technika, gáz-fúvás, vagy fázis-szeperációs eljárás [4, 5, 6]. Hutmacher egyik cikkében [6] azt írta, hogy a sejtek benövését leginkább a 100 μm feletti porusok segítik elő, míg a kisebb porusok inkább csak az érképződést és a víz-, gáz- transzportot segítik elő. Ideális esetben a porusok többsége 100 μm feletti, de kisebb porusok is megtalálhatóak.

Problémaként merül fel a szövetépítésre alkalmas, porózus termékek gyártásakor, hogy az anyag nyomószilárdsága és nyomómodulusa a porozitás négyzetével fordítottan arányosan változik [7], így nehéz a megfelelő nyomószilárdságú és nyomómodulusú polimer terméket előállítani. A lebomló termékek alkalmazását tovább nehezíti, hogy a polimer bomlása során nagy mennyiségben savas bomlástermék szabadul fel, amely a szervezet normál pH értékét megváltoztatja, ezáltal szövetirritációt okozhat [6].

Az említett nehézségek áthidalására gyakran alkalmaznak inorganikus erősítőanyagot, például hidroxipatitot, amely erősíti a polimert, s emellett nagymértékben javítja az alapanyag biokompatibilitását is. Epple és társai [8] kimutatták, hogy a kalcium-karbonáttal töltött kompozit a szervezet 7-es pH értékét nem változtatja számottevően; míg tiszta polimer implantátum használata esetén a pH akár 3-ra is lecsökkenhet 25 napos időtartam alatt.

Cikkünk célja egy porózus anyag fejlesztése, amely megfelelő mechanikai tulajdonságokkal, lebomlási idővel és biokompatibilitással rendelkezik.

Anyagok és eljárások

Kísérleteinkhez Sigma-Aldrich poli(ϵ -kaprolakton)-ját használtuk, amelynek névleges molekulasúlya: $M_n = 80$ kDa. A polimert használat előtt vákuumban, 40 °C-on 1 napig szárítottuk.

A polimer mátrix erősítése érdekében a varsói, Institute of Glass and Ceramics inorganikus töltőanyagát: kalcit és aragonit kristályszerkezetű kalcium-karbonátot alkalmaztunk. A kalcit átlagos szemcseátmérője: 1 μm .

Ebben a munkában oldatöntéses – só-kioldásos technikát alkalmaztunk, hogy porózus próbatesteket állítsunk elő. A makroporusok kialakításához sókristályokat alkalmaztunk. A 20%-os acetone - PCL

⁰olah@pt.bme.hu

¹ Dr., tanszékvezető, BME Polimertechnika Tanszék

² Dr., BME Biomechanikai Kutatóközpont

oldatot sóval összekevertük, majd ezt a keveréket egy rozsdamentes acél szerszámba (15x15x10 mm) töltöttük; a szerszámot desztillált vízbe helyeztük, hogy elősegítsük a polimer kicsapódását. A polimer kiválását követően, megközelítőleg 12 óra után, a szilárd próbatetesteket desztillált vízbe merítettük és 14 napon keresztül keringetett fürdőben a sót kioldottuk, és az így előállított porózus polimer terméket vizsgáltuk. Mivel a fejlesztett termék az emberi szövetekkel kerül kapcsolatba, fontos, hogy a gyártás során bevitt só (nátrium-klorid (NaCl)) mennyiségét 100 százalékban eltávolítsuk, mert a szövetek között feldúsuló NaCl a sejtek elhalását eredményezheti.

A minták előállításához különböző frakciójú (<63 μm , 63-125 μm , 125-250 μm , 250-500 μm) sókristályokat használtunk. A só-kioldási vizsgálathoz a próbatesteket 50-50 tömegszázaléknyi (250-500 μm méretű) só és (20%-os acetón - PCL) oldat felhasználásával készítettük el. A mechanikai vizsgálatokhoz háromfajta próbatestet állítottunk elő: a) állandó, 33 tömegszázalék só-tartalmú, de különböző szemcse-átmérőjű sókristályok felhasználásával gyártott próbatesteket; b) állandó, 250-500 μm szemnagyságú só-frakciót különböző só-koncentrációban tartalmazó próbatesteket; és c) 25 tömegszázalék inorganikus erősítőanyag hozzáadásával gyártott próbatesteket. Minden próbatesthez 20 százalékos acetón - poli(ϵ -kapolakton) oldatot használtunk.

A só-kioldási időt vezetőképesség méréssel határoztuk meg. Felvettük a kalibrációs görbét, majd a próbatestet körül vevő desztillált víz vezetőképességét vizsgáltuk különböző időközönként.

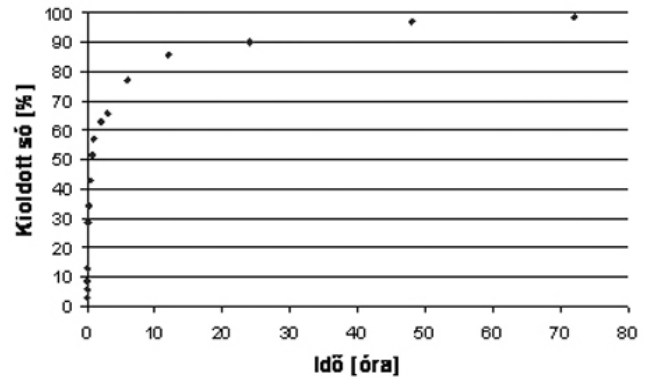
A porózus anyagok szerkezetét Canon EOS50 fényképezőgéppel szerelt Euromex márkájú optikai és JEOL 5500LV típusú pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, és hasonlítottuk össze.

A nyomóvizsgálatokat Zwick BZ2.5/TN1S univerzális szakítógépen, 100 N-os, illetve 1 kN-os erőmérőcellával végeztük el, majd az ISO604:2002 szabvány ajánlása alapján a nyomószilárdságot és a nyomómodulust számítottuk. A méréseket szobahőmérsékleten, 1 mm/perc keresztfejsébség mellett végeztük el.

Eredmények

Az 1. ábrán látható a só-kioldási kinetika; a kioldott só mennyiségét az idő függvényében ábrázoltuk, ahol a 100% az egy próbatestben megtalálható összes só mennyiségét jelenti. A próbatest só-tartalmát a só és az oldat mennyiségének arányából számoltuk, majd ehhez hasonlítottuk az eredményeket. Az első nap végére jó közelítéssel a teljes só mennyiségének 90 százaléka, míg a harmadik nap végére már több mint a 97 százaléka oldódott ki. Így az általunk alkalmazott 14 napos kioldási idő, az

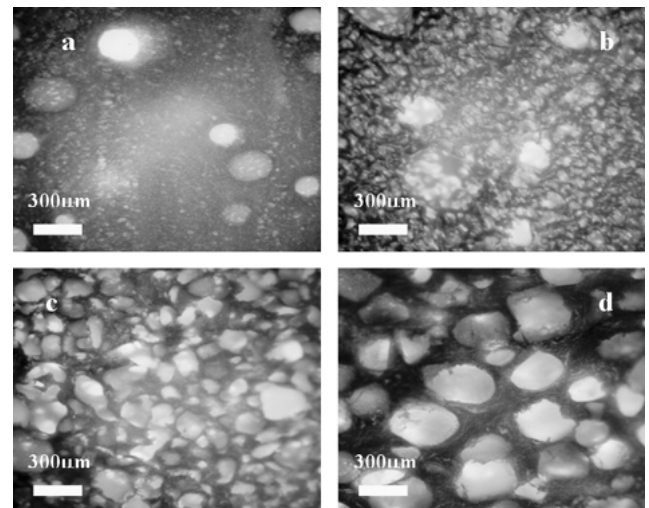
egymásba nyíló pórusok esetén, nagy valószínűséggel már só mentes próbatesteket eredményezett a mérésekhez.



1. ábra. Az előállításakor bevitt só kioldódott arányának változása

Figure 1: Leached out salt compared to the amount of salt in the initial mixture

A 2/a-d ábrák tartalmazzák a különböző szemcseátmérőjű minták optikai mikroszkópos felvételeit. Az optikai mikroszkópos felvételeken is jól látszik a szemcseméret hatása a mintákban kialakuló pórusméretekre; s az is, hogy a fázis-szeparációs eljárás során túlnyomó részben mikropórusok alakulnak ki. Ez a módszer, kis só-szemcseméret esetén, egy finom „habszerű” anyagot eredményez, azonban a 250-500 μm -es só-frakció esetén már a makropórusok dominálnak.

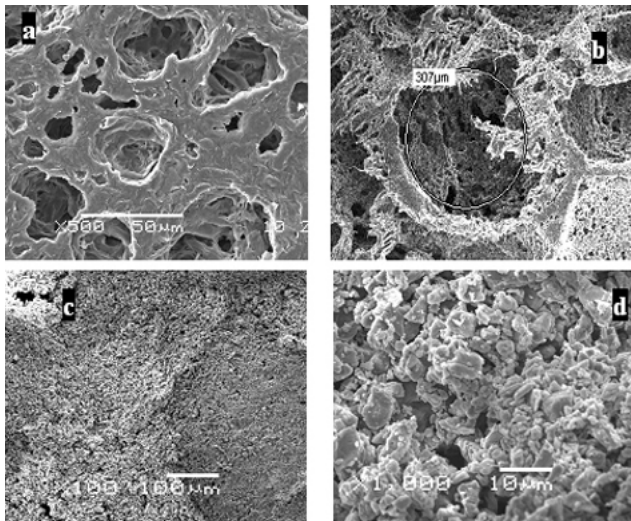


2. ábra. Különböző pórusméretű próbatestek optikai mikroszkópos felvételei

Figure 2: Optical microscopic pictures of the different pore-size scaffolds:

- a) 63 μm >; b) 63–125 μm ; c) 125–250 μm ;
d) 250–500 μm

A 3/a ábrán látható a fázis-szeperációs eljárással előállított anyag mikropórusos felépítése. Az ábrán megfigyelhető, hogy a pórusok mérete nem haladja meg az 50 µm-es értéket. Ezen pórusok közvetlenül nem segítik elő a sejtek benövését, de hasznosak a gáz-, víz-, tápanyagtranszport szempontjából, ezzel javítva a termék biokompatibilitást. A 3/b elektronmikroszkópos felvételt egy porózus polimer termékről készítettük, amelyet oldatöntéses – sókioldásos technikával állítottunk elő. A képen egyaránt megtalálhatóak a mikro- és makropórusok. A tipikusan <50 µm méretű mikropórusok a fázis-szeperációs eljárás következtében alakulnak ki. Ugyanilyen mikropórusok láthatóak a kalcittal töltött minta felvételén (3/c-d ábra) is. Jól látszik a felvételen, ahogy a polimer mátrix körbe ágyazza a töltőanyagot. Megfigyelhető, hogy az 1 µm-es kalcit szemcsék helyett nagyobb aggregátumok alakulnak ki a feldolgozás során; ami a mátrix és szemcsék közti jó kapcsolatot sugallja.



3. ábra. Porózus PCL minták szerkezete:

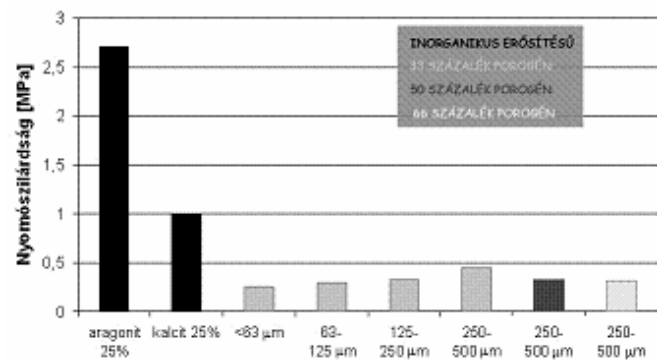
- a) mikropórusos PCL szerkezete;
- b) 250-500 µm só-frakcióval előállított, porózus PCL szerkezete;
- c) 25 tömegszázaléknyi kalcitot tartalmazó PCL szerkezete 100x-os és
- d) 1000x-es nagyításban.

Figure 3: Surface morphology of the porous PCL:

- a) micro-pore PCL;
- b) scaffold structure obtained with 250-500 µm salt-fraction;
- c) Structure of PCL and 25 percent (by weight) calcite samples at 100x zoom; and
- d) at 1000x zoom

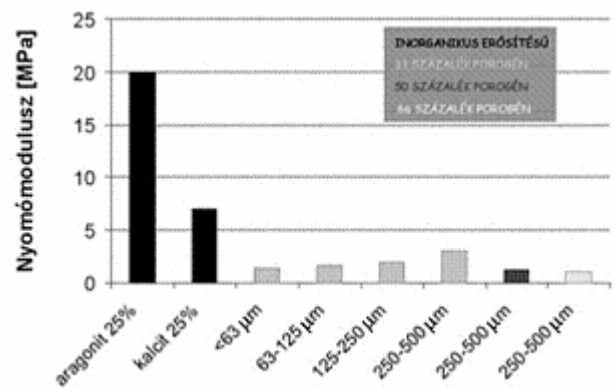
A felhasználás szempontjából az egyik legfontosabb jellemző, hogy az előállított anyag, termék rendelkezik-e a szükséges nyomószilárdsággal, nyomómodulussal. Ramakrishna egy cikkében [9] azt írta, hogy napi tevékenységünk során 4 MPa körüli terhelés léphet fel a szivacsos csontállományban, így nagyméretű csontpótló anyagok esetén ez a nyomószilárdság érték elérése lenne az ideális. A készített

minták nyomószilárdságát a 4. ábrán ábrázoltuk. Minden próbatesten, amelyet só-kioldásos technikával készítettünk, 0,5 MPa alatti nyomószilárdságot mérünk, amely érték kicsi, s így csak kis kiterjedésű csontpótló anyagként, vagy arc-sebészetben, vagy egyéb, nem teherhordó helyen, esetlegesen lágy-szövet építésekor jöhet szóba. Az erősített anyagok nyomószilárdsága már nagyobb: a kalcittöltésű PCL átlagos nyomószilárdsággal már 1 MPa, míg az aragonit töltésű kompozit nyomószilárdsága megközelíti a 3 MPa értéket. Ez a 3 MPa-os érték még mindig alacsonyabb, mint a napi aktivitás során fellépő 4 MPa-os terhelés, de már elfogadhatóan megközelíti azt, így már nagyobb kiterjedésű csontbetegségek is helyreállíthatók ezzel a kompozittal.



4. ábra. Az előállított porózus termékek nyomószilárdság értékei

Figure 4: Compressive strength of the obtained porous scaffolds



5. ábra. Az előállított porózus termékek nyomómodulus értékei

Figure 5: Compressive modulus of the obtained porous scaffolds

Látható az 5. ábrából, hogy a nyomómodulusok azonos tendencia szerint változnak, mint a nyomószilárdságok. A négy vizsgált só-frakció (ábrán világos szürke színnel) közül a 250-500 µm szemcseméretűvel kaptuk a legnagyobb, mintegy 3 MPa

értéket. Amennyiben a nyomómodulust a sótartalom függvényében vizsgáltuk (világos, sötét, világos szürke; az ábrán balról jobbra), akkor az eredmények azt mutatták, hogy a 33 tömegszázalékos (szintén 3 MPa) volt a legnagyobb, míg az 50 és 66%-os között számottevő eltérést nem tapasztaltunk, mindkét esetben 1 MPa körüli értéket kaptunk.

Viszont, a kompozit anyagok nyomómodulusa: 7 illetve 20 MPa, amely szignifikánsan eltér a porózus, polimer anyag nyomómodulusától. Fontos megjegyezni, hogy ezek a minták csak mikropórusokat tartalmaztak, ahogy azt a 3/c-d ábrákon megmutattuk, de a minta porozitása így is megközelítőleg 50 százalék volt.

Következtetések

A 4. és az 5. ábrából kitűnik, hogy a 33% sótartalmú mintasorozaton belül mind a nyomószilárdság, mind a nyomómodulus a só szem nagyságának növekedésével enyhén, de nem lineárisan nő, míg ugyanezek a tulajdonságok, az azonos (250-500 µm) szem nagyságú sóval készített mintákon mérve, a sótartalom növekedésével enyhén, de nem lineárisan csökkennek. Irodalmi adatok alapján [5] feltételezhető, hogy ez a nem egymásba nyíló pórusok képződésével és a nem kioldott só jelenlétével magyarázható.

Ám, mivel a legnagyobb szilárdsági érték sem elegendően nagy ahhoz, hogy a porózus PCL termék betöltse a neki szánt funkciót, ezért megvizsgáltuk az inorganikus anyaggal erősített polimer termékek tulajdonságait is. Azt találtuk, hogy mind a kalcit, mind az aragonit jelentősen javította az anyagok nyomószilárdságát és nyomómodulusát, így az első vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy ezen kompozit rendszerek már nagyméretű csontpótló anyagként is alkalmazhatóak lesznek.

Irodalom

- [1] D. Darwis, H. Mitomo, T. Enjoji, F. Yoshii, K. Makuuchi: Enzymatic degradation of radiation crosslinked poly(ϵ -caprolactone); *Polymer Degradation and Stability* **62** (1998) 259-265
- [2] J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinbergd, S. J. Hollister, S. Das: Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering; *Biomaterials* **26** (2005) 4817-4827
- [3] J. C. Middleton, A. J. Tipton: Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices; *Biomaterials* **21** (2000) 2335-2346
- [4] A. G. Mikos, J. S. Temenoff: Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering; *Electronic Journal of Biotechnology*, **3** (2000) 114-119
- [5] P. X. Ma: Scaffolds for tissue fabrication; *Materials today*, **5** (2004) 30-40
- [6] D. W. Hutmacher: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage; *Biomaterials* **21** (2000) 2529-2543
- [7] L. J. Gibson: Biomechanics of cellular solids; *Journal of Biomechanics* **38** (2005) 377-399
- [8] C. Schiller, C. Rasche, M. Wehmöller, F. Beckmann, H. Eufinger, M. Epple, S. Weihe: Geometrically structured implants for cranial reconstruction made of biodegradable polyesters and calcium phosphate/calcium carbonate; *Biomaterials* **25** (2004) 1239-1247
- [9] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K. W. Leong: Biomedical applications of polymer-composite materials: a review; *Composite Science and Technology* **61** (2001) 1189-1224