

MARTYNA KUCHARSKA
BEATA BUTRUK
TOMASZ CIACH

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Otrzymywanie implantów kostnych techniką spieniania

Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną, która przystosowała zasady rządzące inżynierią i naukami biologicznymi w celu wytworzenia biologicznych struktur mogących odbudować, utrzymać lub poprawić funkcje tkanek. [1,2] Ogólna strategia inżynierii tkankowej polega na hodowli komórek ludzkich pobranych od pacjenta, w warunkach *in vitro* na specjalnych przestrzennych matrycach (rusztowaniach), które zaimplantowane *in vivo* stanowią podstawę do regeneracji uszkodzonej tkanki. Terapia z wykorzystaniem biomateriałów ma być rozwiązaniem dla złamań kości czy komplikacji na skutek resekcji nowotworów lub torbieli. Rusztowania dla inżynierii tkankowej powinny być wykonane z biogodnych i biodegradowalnych materiałów o porowatej architekturze, które mają pełnić rolę sztucznej substancji międzykomórkowej, zapewniając odpowiednie środowisko dla rozwijających się komórek. Powstała w ten sposób strukturę materiałowo-komórkową wszczepia się w miejsce ubytku kości. W miarę upływu czasu matryce ulegają powolnej degradacji i resorpcji przez organizm a nowo uformowana tkanka jest strukturalnie i funkcjonalnie identyczna jak tkanka zdrowa [1, 2].

Materiały i metodyka badań

Do produkcji porowatych biomateriałów-implantów zastosowano technikę spieniania. Według literatury, przy otrzymywaniu materiałów o porowatej architekturze stosuje się najczęściej zewnętrzne źródła gazu. W prezentowanej pracy wykorzystano jednak nowe rozwiązanie polegające na wydzielaniu dwutlenku węgla *in situ* w roztworze w wyniku reakcji chemicznej. Matryce otrzymuje się z 5% w/v roztworu chitozanu (*Fluka*) w 4% v/v kwasie octowym (*Chempur*) [3]. Wartości te dobrano doświadczalnie. Rozpuszczanie polimeru prowadzono na gorąco w łaźni wodnej w warunkach ciągłego mieszania. Ostudzony do temperatury pokojowej roztwór rozlewano do plastikowych pojemniczków o objętości 100 ml, a następnie dodawano β -ortofosforan trójwapnia (β -TCP) (*Fluka*) lub/i kolagen (*Wytwórnia Naturalnych Białek Proteina*). β -TCP dodawano w ilości 15, 20, 30, 40 i 50% w/v, a kolagen w ilości 5 i 10% v/v. Po dokładnym wymieszaniu do roztworu polimeru dodawano wodorowęglan sodu (POCh), odpowiedzialny za wydzielenie gazu w reakcji:



Wodorowęglan dodawano w postaci proszku bezpośrednio do roztworu chitozanu w ilości dwukrotnie większej do ilości stechiometrycznej. Po dodaniu wszystkich składników i spie-

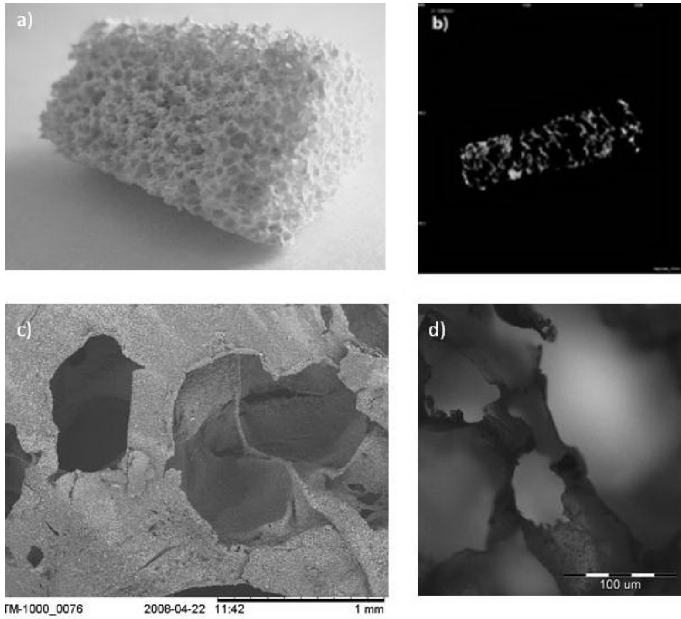
nieniu, próbki zamrażano w temperaturze około -20°C na około 24 h. Dzięki wprowadzonemu procesowi mrożenia krystalizująca w materiale woda nadała sztywność, a po wysuszeniu pozostałe po niej wolne przestrzenie zapewniły dodatkowo obecność mikroporów w matrycach. Końcowym etapem jest suszenie. Zastosowano dwie metody suszenia – w cieplarni (*Wamed*, C-30) w temperaturze 37°C , przez ok. 4–5 h lub w eksykatorze próżniowym przez około 7 dni.

Otrzymane opisaną techniką biomateriały poddano szeregu badań mających na celu charakteryzację własności fizycznych, chemicznych oraz biologicznych [3, 4]. Ocenę morfologii dokonano technikami mikroskopowymi (mikroskop optyczny, elektronowy SEM). Porowatość materiałów wyznaczono metodą ważenia hydrostatycznego (*Mettler Toledo, Excellence Plus XP*) w oparciu o prawo Archimedesusa. W warunkach symulujących fizjologiczne (bufor PBS, lizozym 0,5 mg/ml, temperatura $T = 37^\circ\text{C}$) w obecności lizozymu zbadano degradację otrzymanych materiałów. Próbki poddano także testom wytrzymałościowym (prasa MTS Q/Test 10 – *Wydział Inżynierii Materiałowej PW*). Z otrzymanych wartości wykreślono charakterystykę ściskania, czyli naprężenie w funkcji odkształcenia, a następnie wyznaczono moduł *Younga*. Toksyczność biomateriałów względem otaczających komórek i tkanek jest najważniejszym parametrem decydującym o ich przydatności do zastosowań implantacyjnych. W celu oceny toksyczności oraz wpływu badanych próbek na morfologię oraz przeżywalność komórek, wykonano testy *in vitro*. Test polegał na hodowli komórek linii MG-63 w środowisku wytworzonych matryc. Komórki MG-63 to linia ludzkich osteoblastów wyprawdzonych od 14-letniej pacjentki cierpiącej na nowotwór. Na podstawie badań wyznaczono przeżywalność komórek na biomateriałach.

Wyniki

Biomateriały otrzymane powyżej opisaną techniką wykazują porowatość bliską 90%. Ze względu na zastosowany dodatek ceramiki (β -TCP) widać istotny wpływ fosforanów na kształtowanie i rozmiary porów. Przy niższych jego zawartościach pory mają charakter nieregularny, powstają nikorzystne duże pory o średnicy kilkunastu milimetrów. Wraz ze zwiększającą się zawartością TCP architektura porów jest bardziej uporządkowana, a ich rozmiary większe. Optymalna pod względem morfologicznym materiałów zawartość TCP wynosi 40 i 50%. Rozmiary porów wynoszą od 50 do 500 μm . Obecność porów w całym materiale potwierdziły badania z wykorzystaniem mikrotomografu rentgenowskiego.

Badania degradacji materiałów wskazały, że w 20 dniu eksperymentów największy ubytek masy obserwowano dla mate-



Rys. 1. Porowaty implant (a); obserwacja porowatości: zdjęcie z mikrotomografu (b), analiza SEM (c), mikroskop optyczny (d)

riałów z najniższą zawartością ceramiki – pozostała sucha masa wynosiła około 40%, natomiast dla materiałów o najwyższym stężeniu TCP odnotowano pozostałą suchą masę na poziomie 80%. Zawartość kolagenu także wpływa na degradację biomateriałów, ale w tym przypadku wzrastająca jego ilość

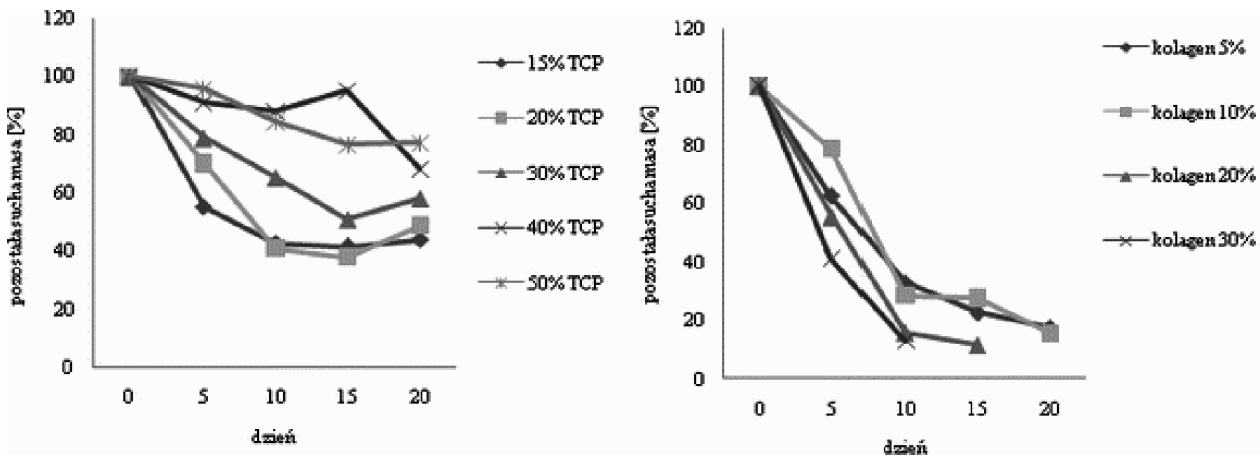
skutkuje szybszym przebiegiem procesu. Dla próbki zawierającej 30% kolagenu pozostała masa już w 10 dniu była niższa niż 20%. Materiały o najniższej zawartości białka degradowały później.

Testy mechaniczne wykazały, że zastosowanie dodatku ceramiki jest zasadne. Wraz ze zwiększającą się jej ilością w biomateriale próbki zyskały sztywność i twardość, co znalazło odzwierciedlenie w wyznaczonych na podstawie pomiarów wartościach modułu *Younga*. Jednocześnie dla próbek zawierających 50% TCP i 5 lub 10% kolagenu obserwowano spadek modułu odkształcalności ze względu na rosnącą elastyczność materiałów.

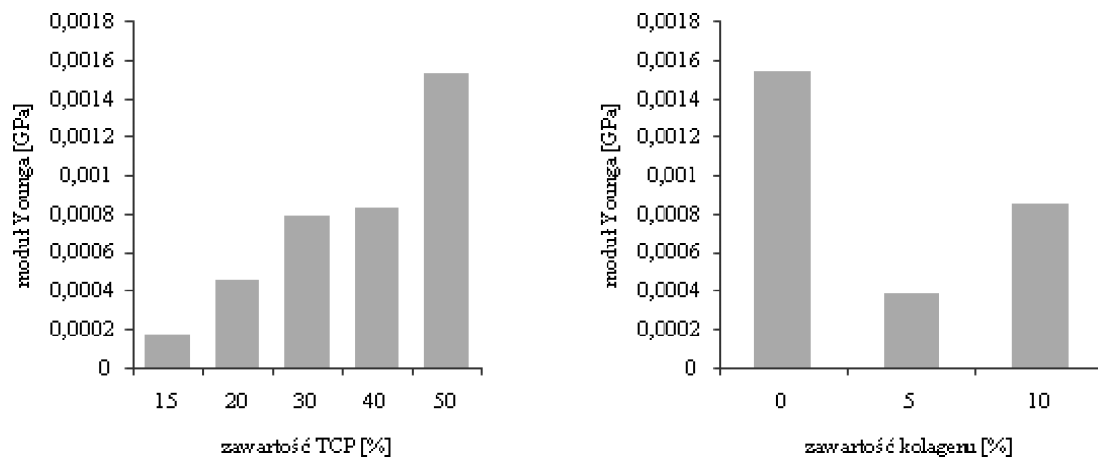
Wstępne badania toksykologiczne *in vitro* prowadzone na komórkach wykazały prawidłowy wzrost komórek. Zarówno obserwacje przyżyciowe morfologii, jak i badania ich przeżywalności w stosunku do prób kontrolnych bez biomateriału pozwalają optymistycznie oceniać przydatność matryc w użytku implantacyjnym. Najlepsze wyniki uzyskano dla próbek z najmniejszą ilością ceramiki (15%), ze wzrostem jej stężenia przeżywalność jest znacznie maleje. Najprawdopodobniej jest to efekt ograniczonego dostępu komórek do chitozanu, który uważany jest za dobry materiał adhezyjny ze względu na oddziaływania elektrostatyczne polimer-błona komórkowa.

Podsumowanie

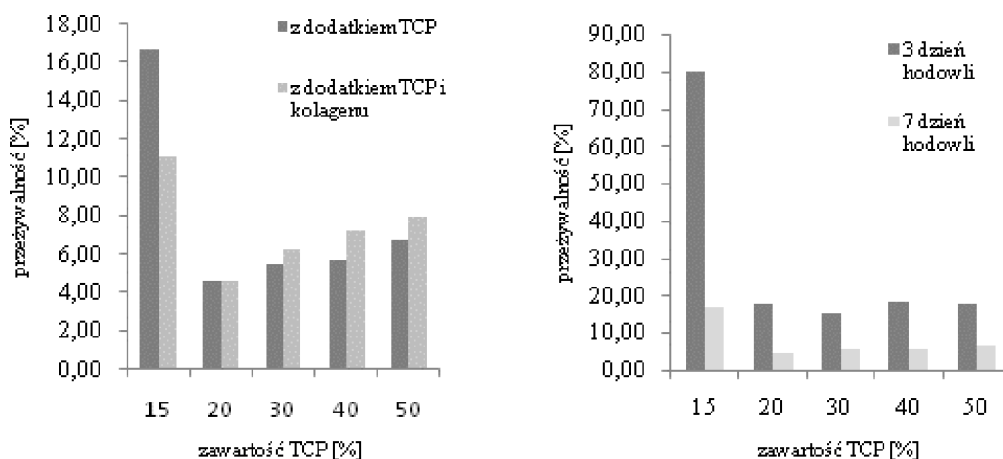
Opracowana technika pozwala otrzymywać porowate, biodegradowalne materiały, które potencjalnie mogłyby znaleźć



Rys. 2. Przebieg degradacji biomateriałów w zależności od zawartości ceramiki (po lewej) i kolagenu (po prawej)



Rys. 3. Zależność modułu *Younga* od zawartości ceramiki whitlockitowej β -TCP (po lewej) oraz 50% TCP i kolagenu (po prawej)



Rys. 4. Przeżywalność komórek na materiałach z TCP oraz TCP/kolagen w 7 dniu hodowli (po lewej), przeżywalność komórek wyznaczona w 3 i 7 dniu hodowli (po prawej)

zastosowanie jako materiał kośćozastępczy do wypełniania niewielkich tkankowych ubytków. Zaprezentowana metoda pozwala wprowadzać substancje znane jako wspierające regenerację defektów kostnych. Zastosowany dodatek ceramiki wyraźnie poprawił nie tylko wytrzymałość mechaniczną, ale także degradację, z drugiej jednak strony zbyt duża jej zawartość wpływa negatywnie na wzrost komórek. Kolagen zwiększył w znacznym stopniu elastyczność materiałów, z drugiej

strony jego udział skutkował niższą przeżywalnością hodowanych komórek.

LITERATURA

1. P. Habibovic, K.de Groot: *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 25 (2007).
2. B. Gasser: *Injury*, 31, S-D48 (2000).
3. M.N.V. Kumar *et al.*: *Chem. Rev.* 104: 6017 (2004).
4. Seda Tighi R, *et al.*: 18, 1665 (2007).