Experimentální Analýza Napětí 2007

BIOCOMPOSITE FOR HARD TISSUE REPLACEMENT DESIGN WITH RESPECT TO ITS OSSEOINTEGRATION

NÁVRH BIOKOMPOZITU PRO NÁHRADY TVRDÝCH TKÁNÍ S PŘIHLÉDNUTÍM K JEJICH OSSEOINTEGRACI

Miroslav Sochor[1], Karel Balík[2], Lucie Bačáková[3], Barbora Vagaská[4], Tomáš Suchý[5], Martin Černý[6], Zbyněk Sucharda[7]

Abstract: *The study presented is aimed at development of an advanced porous composite material with suitable mechanical properties for potential use in the bone tissue engineering, hierarchically organized at both micrometer and nanometer scale. The composite will consist of polyamide fabrics embedded in siloxane matrix with hydroxyapatite micro- or nanocrystals. At the same time, the nanocrystals homogeneously dispersed within the matrix will protrude on the pore walls and will create a bioactive nanopattern on the wall surface.*

Keywords: *composite material, osseointegration, polyamide, polysiloxane, hydroxyapatite, bone*

1. Úvod

Cílem naší studie byl výběr vhodných druhů polyamidové výztuže pro přípravu kompozitních materiálů na bázi polysiloxanové pryskyřice, ověření jejich biokompatibility a mechanických vlastností. Polysiloxanová pryskyřice jako matrice uvažovaných kompozitů byla zvolena na základě výsledků z naší předchozí studie, ve které byla testována její biokompatibilita a smáčivost [1]. Polyamid, jako výztuž ve formě tkaniny, byl vybrán díky jeho biokompatibilitě a možnosti dlouhodobější resorpce tohoto materiálu (až 4 roky) [2, 3]. Dále byla mikroskopicky charakterizována časticová plniva na bázi hydroxyapatitu (HAp) z hlediska jejich velikosti a tvaru.

2. Použité materiály a výroba kompozitů

2.1 Vláknové výztuže

1) UHELON 67 M; jedná se o síťovinu z alifatického polyamidového vlákna PA 6 (Polyamide technical sieves, Silk and Progress, Moravská Chrastová), měrná hmotnost vlákna 1,14 g/cm^3, tlouštka monofilu 50µm, velikost očka 99 µm, volná plocha 44% (Obr. 1, Tab. 1).

---

[1] Doc. Ing. Sochor Miroslav, CSc., Laboratory of Biomechanics, Czech Technical University in Prague, Technická 4, 166 07 Prague 6, Czech Republic, miroslav.sochor@fs.cvut.cz

[2] Ing. Balík Karel, CSc., Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences, Department of Composite and Carbon Materials, V Holešovičkách 41, 182 09 Prague 8, Czech Republic, balik@irsm.cas.cz

[3] MUDr. Lucie Bačáková, CSc., Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4-Krč, Czech Republic, e-mail: lucy@biomed.cas.cz

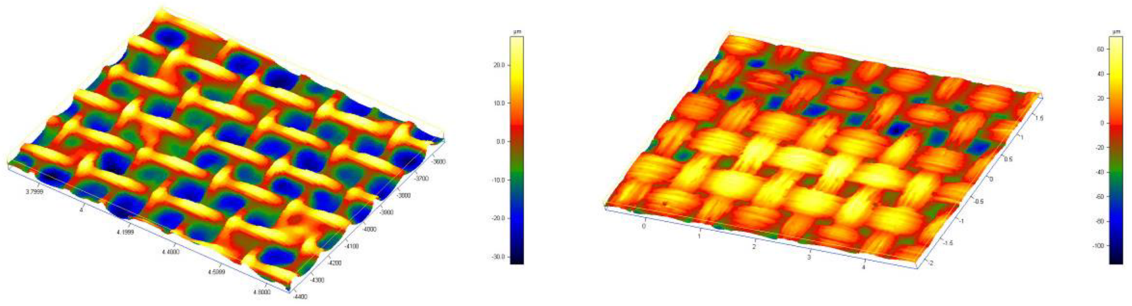
[4] Ing. Barbora Vagaská, Ph.D., Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4-Krč, Czech Republic, e-mail: lucy@biomed.cas.cz

[5] Ing. Tomáš Suchý, ZČU Laboratory of Biomechanics, Czech Technical University in Prague, Technická 4, 166 07 Prague 6, Czech Republic, suchyt@biomed.fsid.cvut.cz

[6] Ing. Martin Černý, Ph.D., Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences, Department of Composite and Carbon Materials, V Holešovičkách 41, 182 09 Prague 8, Czech Republic, m.cerny@irsm.cas.cz

[7] Ing. Zbyněk Sucharda, Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences, Department of Composite and Carbon Materials, V Holešovičkách 41, 182 09 Prague 8, Czech Republic, sucharda@irsm.cas.cz

2) Tkanina 20796; jedná se o tkaninu plátnové vazby z aromatických polyamidových vláken (Aramid balanced fabric, Hexcel, Francie, použité vlákno HM 215), měrná hmotnost vlákna 1,44 g/cm^3, tlouštka monofilu 13,5 μm, gramáž 60g/m^2, tlouštka tkaniny 0,07 mm (Obr. 1, Tab. 1).



Obr. 1. 3D snímky tkanin; vlevo UHELON, vpravo aramidová tkanina 20796 (MarSurf TS 50/4)

	Aramid	UHELON
průměr monofilu [μm]	12	50
hustota [g/cm^3]	1,44	1,14
tahová pevnost [MPa]	3150	480
Youngův modul [GPa]	110	0,092
bod měknutí [°C]	400	255

Tab. 1. Vlastnosti monofilů použitých tkanin

2.2 Matrice

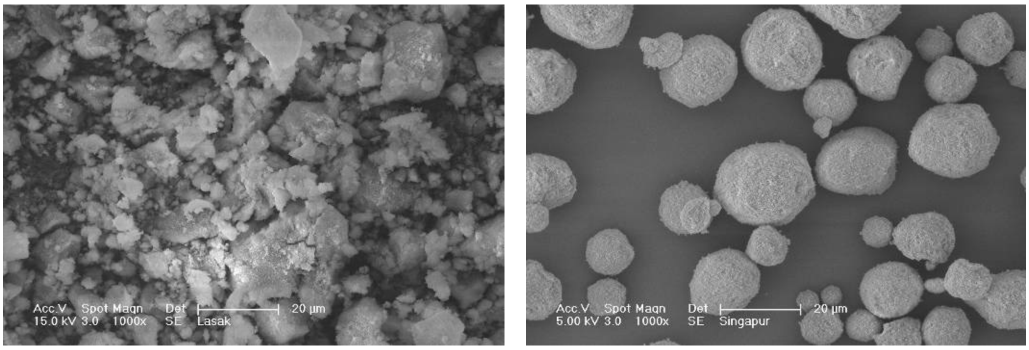
Polymetylsiloxanová pryskyřice M130 (Lučební závody Kolín, ČR), roztok 1:1(hm) v xylenu, měrná hmotnost cca 1,31 g/cm^3. Pomocná látka - sůl kyseliny fosforečné (fosforečný aniont), jako katalyzátor polykondenzace siloxanové pryskyřice (phosphorus (V) aniont) (phosphoricacid).

2.3 Částicová plniva

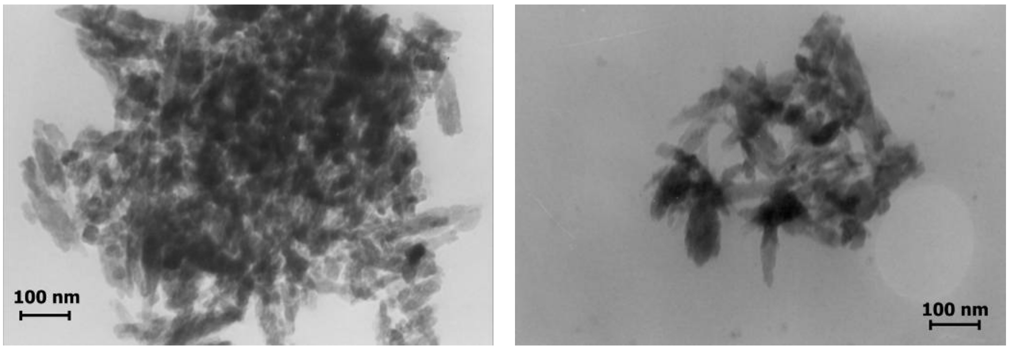
Částicová plniva byla do matrice dodávána z důvodů vylepšení mechanických vlastností a dosažení bioaktivity. Oba tyto aspekty jsou předmětem dalšího výzkumu. Byly použity dva druhy mikro-částic HApu (viz níže). Před aplikací plniv byla provedena jejich rozměrová analýza (Obr. 2, 3), potřebná především z pohledu jejich vlivu na mechanické, ale i osseointegrační vlastnosti kompozitů. Plniva použitá pro dosavadní výrobu kompozitů:

1) HAp (Lasak s.r.o.), částice 10-100 μm, měrná hmotnost cca 3,1 g/cm^3 (použity dvě rozměrově se lišící šarže, viz kapitola 5.1)

2) HAp (School of Mechanical and Aerospace Engineering, Singapore, dále jen Singapore), částice 5-40 μm, měrná hmotnost cca 3,1 g/cm^3.



Obr. 2. SEM snímky HApu Lasak (vlevo) a Singapore (vpravo)



Obr. 3. TEM snímky HApu Lasak (vlevo) a Singapore (vpravo), částice na spodní hranici použitých frakcí

2.4 Příprava prepregu

Byl proveden předběžný propočet obsahu jednotlivých složek tak, aby jejich poměr byl cca 50:50 (obj.), při výpočtu se vycházelo z uvedených měrných hmotností jednotlivých složek a z pravděpodobných ztrát matrice při lisování ve formě přetoku. V případě prepregů s částicovým plnivem byl výpočet proveden pro zajištění poměru 40:10:50(obj.) pryskyřice: částicové plnivo:vláknitá výztuž se zohledněním přetoku pryskyřice s plnivem. Byla připravena odpovídající plocha výztuže a odvážena pryskyřice, resp. zamíchána pryskyřice s plnivem a případně s dalšími přídavky komponent. Z hlediska průběhu teplot bylo nutno zvolit dva rozdílné postupy pro použité dva typy vláknových výztuží: PA 6 má tepelnou odolnost do max.180°C, přičemž při teplotách nad 160°C křehne. Pro tento typ kompozitu bylo nutno přidávat do siloxanové pryskyřice kyselinu fosforečnou (0,5g kys./100 g pryskyřice),která snižuje zpracovatelské teploty na 135-160°C. Aramidové vlákno má odolnost do 280°C, takže potřebné zpracovatelské podmínky jsou odpovídající a bylo možno použít zavedený a odzkoušený režim.

Lisování s výztuží UHELON: 135°C/tlak=kontakt/1hod.-135°C/1MPa/1hod.-160°C/1,1MPa/4 hod.

Lisování s aramidovou výztuží: 135°C/kontakt/2 hod-135-225°C/1 MPa/0,5 hod - 225°C/1,1MPa/4 hod.- dotvrzeno ve formě bez tlaku 250°C/4 hod. v sušárně.

3. Mechanické vlastnosti

U obou typů vyrobených kompozitů byly měřeny mechanické vlastnosti, jmenovitě modul pružnosti v ohybu a ohybová pevnost. Tyto základní charakteristiky byly stanoveny pro první přehled chování kompozitů. Kompozit z UHELONu vykazoval bohužel příliš malou tuhost a

ohybovou pevnost tedy nebylo možné určit s dostatečnou přesností. Pro zvýšení tuhosti bude dále modifikován HApem.

Modul pružnosti v ohybu E_M byl měřen čtyřbodovým ohybem (Inspekt 100 HT, Hagewald&Peschke, Německo). Ohybová pevnost R_M byla měřen tříbodovým ohybem (Inspekt 100 HT, Hagewald&Peschke, Německo). Vzorek byl nejprve třikrát předtížen silou 50 N a odlehčen. Vlastní měření opět probíhalo od předpětí 10 N a rychlost zatěžování byla 0,5 mm/min. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 2.

	E_M [GPa]	R_M [MPa]
Aramid+M130 (bez povrchové úpravy)	30,4	165,9
Aramid+M130 (povrchové póry 0,4-0,6mm)	22,6	93,1
UHELON+M130	3,9	-

Tab. 2. Měřené mechanické vlastnosti kompozitů

4. In vitro testy kultivace buněk na tkaninách

4.1 Příprava materiálu pro in vitro kultivaci buněk

Tkaniny byly nejprve nastříhány na kolečka o průměru 2,1 cm, sterilizovány v autoklávu (120°C, 1hod., 1 atm) a poté vloženy do polystyrenových komůrek (TPP, Švýcarsko). Jako kontrolní kultivační materiál byly použity komůrky TPP. Pro kultivaci byly použity kostní buňky linie MG 63 (European Collection of Cell Culture, Salisbury, UK).

4.2 Hodnocení morfologie buněk

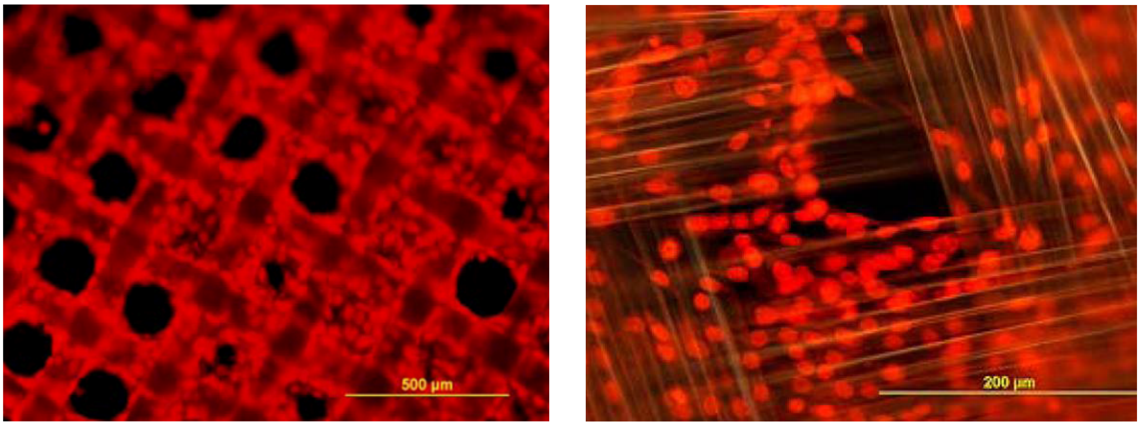
Buňky byly fixovány vychlazeným 70% etanolem (-20°C, 5min) a barveny propidium iodidem (barvivo pro nukleové kyseliny, 5mg/ml roztok v PBS). Rovněž bylo provedeno imunofluorescenční barvení proti cytoskeletálnímu proteinu – beta-aktinu a osteokalcínu. Buňky byly hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 50 a fotografovány kamerou DP 70. Počet i životachopnost buněk byly hodnoceny přístrojem ViCell XR analyzer (Beckman Coulter, USA). Byly provedeny konstrukce růstových křivek a výpočet doby zdvojnásobení počtu buněk v kultuře.

4.3 Hodnocení plochy buněk

Buňky byly obarveny propidium iodidem a imunofluorescenčním barvením proti cytoskeletárnímu proteinu – beta-aktinu a fotografovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 50 (dig. Kamera DP 70, objektiv 20x), k analýze byl použit software Atlas (Tescan, Brno, ČR).

4.4 Závěr

Z výsledků kultivace buněk na tkanině UHELON i aramidové tkanině vyplývá, že počet buněk na obou byl sice vždy nižší než na referenčním kultivačním materiále (polystyrén), ale že tyto buňky se vyznačují vysokou životaschopností srovnatelnou právě s kontrolním vzorkem. Jejich morfologie byla srovnatelná s morfologií charakteristickou pro životaschopné buňky – buňky byly dobře přichycené a rozprostřené, nebyly zakulacené a měly betaaktinový cytoskelet srovnatelný s buňkami rostoucími na referenčním materiále- viz Obr.4.



Obr. 4. Buňky rostoucí na testovaných materiálech sedmý den po nasazení, barveny propidium iodidem (vlevo: UHELON, vpravo: aramidová tkanina)

5. In vitro testy kultivace buněk na kompozitech

5.1 Použité materiály, způsob provedení testů

Pro in vitro testy kultivace buněk na kompozitech bylo vyrobeno celkem šest vzorků na bázi aramidové výztuže (výroba dle části 2.4). Kompozity z UHELONu nebyly zatím pro svou nízkou tuhost a také vzhledem k dalším plánovaným úpravám struktury do těchto zkoušek zařazeny. Tyto testy si kladly za cíl porovnat vliv příměsí v matrici a povrchových úprav na přilnavost a životnost kostních buněk. Testy byly provedeny užitím stejného postupu jako v případě tkanin (sledovány 1., 3. a 7. den).

Použité materiály:

A: aramidová tkanina + M130

B: aramidová tkanina + M130+ fosf.aniont

C: aramidová tkanina + M130 – lisováno s povrchovými pory 400-600 µm

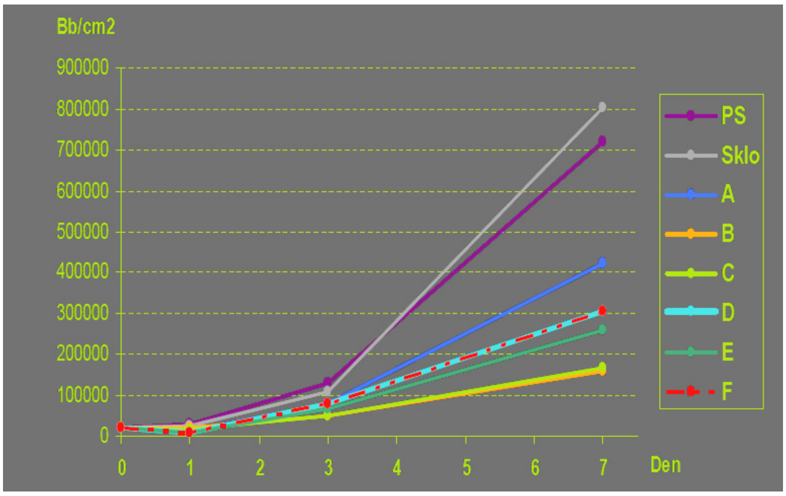
D: aramidová tkanina + M 130 + HAp (Lasak) (frakce 10-100 µm)

E: aramidová tkanina + M 130 + HAp (Lasak, frakce do 60 µm)

F: aramidová tkanina + M130 + HAp (Singapore)

5.2 Závěr

Počet buněk na všech testovaných kompozitních materiálech je vždy nižší než na referenčním kultivačním materiálu (polystyrén (PS), a sklo) viz Obr. 5, což je pravděpodobně způsobeno především hydrofóbní polysiloxanovou matricí a vyšší drsností. Životaschopnost buněk na kompozitech je však srovnatelná s hodnotami na kontrole. Materiál není cytotoxický. Na všech materiálech se už třetí den po nasazení tvoří souvislá vrstva kostních buněk. Materiál se jeví jako vhodný pro konstrukci kostních náhrad.



Obr. 5. Růstové křivky pro testované kompozitní materiály

6. Diskuse a shrnutí

Zdá se, že počty buněk i jejich morfologie na obou výztužích, UHELONu i Aramidu dovolují použít tyto materiály pro přípravu kompozitů. Stejný závěr je možno konstatovat i pro připravené kompozity. V případě UHELONu bude ověřen ještě vliv HAp částicové výztuže na mechanické vlastnosti. Kompozit na bázi aramidové výztuže vykazoval mechanické vlastnosti shodné s vlastnostmi lidské kosti.

Poděkování: Tato studie byla podporována Grantovou agenturou České republiky projektem č. 106/06/1576 a ministerstvem školství České republiky projektem "Transdisciplinární výzkum v biomedicínském inženýrství II., č. MSM 684007712.

Literatura

[1] Balík, K., Sochor, M., Hulejová, H., Černý, M., Pešáková, V., Hulejová, H., Suchý, T., Sucharda, Z.: *Composite materials based on glass fabrics and siloxane matrix as substitutive and connective elements of bones in orthopaedics*. Acta Research Reports, 2006, 15, 39-45.

[2] Springer, I.N.G., Fleiner, B., Jepsen, S., Açil, Y.: *Culture of cells gained from temporomandibular joint cartilage on non-absorbable scaffolds*. Biomaterials, 2001, 22, 2569–2577.

[3] Kawai, T., Ohtsuki, C., Kamitakahara, M., Miyazaki, T., Tanihara, M., Sakaguchi, Y., Konagaya S.: *Coating of an apatite layer on polyamide films containing sulfonic groups by a biomimetic process*. Biomaterials, 2004, 25, 4529-4534.