



Ewa Stodolak*, Marta Błażewicz

Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Poland

* Corresponding author. E-mail: stodolak@agh.edu.pl

Otrzymano (Received) 01.02.2008

KOMPOZYTY ALGINIANOWE - NOŚNIKI SUBSTANCJI BIOAKTYWNYCH BADANIA WSTĘPNE

Alginyiany stosowane są w bioinżynierii medycznej od wielu lat. Niniejsza praca poświęcona jest kompozytowym materiałom biopolimerowy otrzymywanym na bazie soli alginowych. Wytworzono trzy rodzaje kompozytów, których matrycę stanowiła sól alginianu sodu (NaAlg), natomiast fazą zdyspergowaną były materiały ceramiczne. W celu modyfikacji matrycy zastosowano trzy rodzaje dodatków: nanometryczny hydroksyapatyt (nHAp), nanometryczną krzemionkę (nSiO₂) lub bioaktywne szkło (BG) o rozmiarach ziaren rzędu < 5 μm. Wyjściową mieszaninę złożoną z biopolimerowej osnowy (NaAlg) i zdyspergowanej fazy ceramicznej (3% wag.) zestalano w roztworze soli nieorganicznej (CaCl₂). W wyniku reakcji chemicznej (wymiana jonowa Na⁺ na Ca²⁺) otrzymano materiały kompozytowe, w których matrycą dla cząstek ceramicznych była sól alginianu wapnia. Określono stopień skurczu materiałów kompozytowych Ca(Alg)₂/nHAp, Ca(Alg)₂/nSiO₂, Ca(Alg)₂/BG otrzymanych w postaci kul. Materiałem odniesienia były sfery z alginianu wapnia pozbawione dodatku. Stwierdzono, że stopień dyspersji modyfikatora w osnowie biopolimerowej (SEM/EDS) zależy nie tylko od rozdrobnienia materiału, ale przede wszystkim od powinowactwa chemicznego modyfikatora do osnowy kompozytu. Materiały kompozytowe poddano także badaniom trwałości, określając wpływ mediów immersyjnych (woda, PBS, płyn Ringera) na ich zachowanie się w środowisku *in vitro*. Stopień degradacji określano na podstawie zmian pH medium, a także na podstawie obserwacji mikroskopowych powierzchni kompozytów (SEM/EDS). Powyższe badania wykazały, że zastosowane materiały ceramiczne stanowić mogą źródło substancji bioaktywnych stymulujących regenerację tkanki kostnej.

Słowa kluczowe: alginiany, nośniki substancji aktywnych, kompozyty wielofunkcyjne

ALGINATE-BASED COMPOSITES - CARRIERS OF BIOACTIVE MATERIALS. PRELIMINARY STUDY

For many years alginates have been used in biomedical engineering. This study is devoted to biopolymeric composite materials based on alginate salts. Three kinds of composite materials were produced and characterised. Dispersed phase consisted of ceramic materials such as: nano-hydroxyapatite (nHAp), nano-silica (nSiO₂) or bioglass (BG). The composite matrix was sodium alginate solution consolidated in inorganic salt solution (CaCl₂). In effect of chemical reactions, ion exchange followed by gelling, composite materials Ca(Alg)₂/nHAp, Ca(Alg)₂/nSiO₂, Ca(Alg)₂/BG were obtained. The alginate spheres were made from the bio-polymer powder (NovaMatrix-Biopolymer, Norway) containing 60+65% of G monomer. The formation of the spheres was realised by dropping in the sodium alginate solution into a gelling bath with 3% CaCl₂ solution. The biopolymer matrix (NaAlg) was modified with: 3% wt. nanohydroxyapatite (AGH-UST, Department of Advanced Ceramics), 3% wt. colloidal silica (nSiO₂), 3% wt. bioglass (AGH-UST, Department of Glass and Amorphous Coatings Technology). Spheres without modifying agent were used as the reference material. Surface of the composite spheres and their shrinkage was investigated using stereoscope microscope. Microstructural features of composites beads were observed under scanning electron microscope. Dispersion of ceramic particles in the biopolymer matrix were investigated. All samples Ca(Alg)₂/nHAp, Ca(Alg)₂/n-SiO₂, Ca(Alg)₂/BG were tested *in vitro* condition (incubated in water, at 37°C/30 days). Curves of changing pH immersion medium were the same in all types of samples. Result of investigation shown that degradation time of the investigated composite materials is different, and depends on a presence of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ ions. Their durability decreases in the following order of immersing medium: PBS→Ringer solution→water. Dispersion of the modifying particles depends on their chemical characteristics and size. The best dispersion was achieved in case of n-HAp particles, and the worst in case of BG. The alginate spheres may be an effective carrier of bioactive substances, such as nHAp, n-SiO₂, BG, which are released during their degradation and can increase reconstruction and regeneration rates of the damaged tissue.

Keywords: alginate, bioactive delivery system, multifunctional composites

WPROWADZENIE

Polisacharydy, jakimi są sole alginianowy, stosuje się w medycynie jako sprawdzone środki opatrunkowe stosowane w postaci włókien, tkanin lub tzw. nietka-

nych materiałów chłonnych używanych w postaci sprasowanych włókien (płytki włókniste). Luźna struktura włókien dopasowuje się do różnych typów ran (oparze-

nia, owrzodzenia), a także skutecznie tamponuje wysięki, a nawet krwawienia. Zawartość jonów wapnia skoncentrowanych na powierzchni rany daje dodatkowy efekt hemostatyczny i wspomaga proces krzepnięcia. Opatrunek ma znaczące właściwości chłonne (pochłania wysięk o masie 18-krotnie przekraczającej masę opatrunku), tworzy on wokół każdego włókna żel, który wiąże zarówno wysięk, jak i znajdujące się w nim bakterie. Zjawisko żelowania i pęcznienia jest wynikiem wymiany jonów wapniowych z powierzchni włókien opatrunku na jony sodu znajdujące się w wydzielinie. Na powierzchni rany powstaje hydrofilowa wilgotna powłoka utrzymująca ciepło, sprzyjające gojeniu środowisko, bez niekorzystnych efektów ze strony środowiska zewnętrznego (stany zapalne, bakterie) [1-3]. Ta sama grupa biopolimerów jest popularnym materiałem opłaszczającym żywe komórki różnych tkanek i narządów. Z sukcesem stosuje się je w enakapsulacji komórek wysp Largenhansa trzustki, hepatocytów, a także chondrocytów. Taka terapia pozwala na stosowanie przeszczepów ksenogennych, gdyż zapewnia zachowanie odrębności opłaszczanych biopolimerem komórek względem pozostałych tkanek gospodarza [4, 5]. Dodatkowym udogodnieniem jest zwolnienie chorego od przyjmowania leków immunosupresyjnych, niezbędnych w typowych przeszczepach narządowych. W enakapsulacji komórek i tkanek wykorzystuje się specyficzną budowę chemiczną biopolimeru (najczęściej są to sole alginowe, będące połączeniem słabego kwasu i mocnej zasady, stąd łatwo wchodzą w reakcje wymiany kationowej). Właściwość ta pozwala na wykorzystanie alginianów w kolejnej sferze inżynierii biomateriałów, a mianowicie w zastosowaniu soli alginowych jako specyficznych nośników substancji aktywnych. Sole alginowe ulegają w środowisku wodnym szybkiej (NaAlg , HAlg) lub stopniowej ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$) degradacji, odslaniając stopniowo lub uwalniając bezpośrednio do ustroju substancje aktywne [6, 7]. W ten sposób dostarczane mogą być czynniki wzrostu, aktywatory enzymów lub same enzymy, a także niektóre leki. Jest to o tyle korzystne, że nośnik w postaci soli alginowej ulega degradacji, nie stwarzając konieczności ponownej interwencji chirurgicznej i może być dopasowywany do miejsca implantacji pod względem odpowiedniego kształtu (np. wypełnienia ubytku po resekcji zęba).

W nurcie powyższych zagadnień pozostaje obecna praca dotycząca otrzymywania materiałów kompozytowych będących nośnikami substancji bioaktywnych. Otrzymane metodą żelowania sferyczne kompozyty o osnowie z biopolimeru - $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ powstały na drodze wymiany kationów wyjściowej soli alginowej (NaAlg) wkraplanej do kąpieli żelującej, jaka stanowił 3% roztwór CaCl_2 . Wypełniacz ceramiczny w postaci proszku (nHap , nSiO_2 , BG) był dyspergowany mechanicznie (mieszadło mechaniczne) i ultradźwiękowo (płuczka ultradźwiękowa). Idea takiego kompozytu zakłada, że w wyniku oddziaływania z żywym organizmem osnowa

kompozytu - biodegradowalna sól alginianu wapnia, $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ - ulega degradacji, natomiast w środowisku biologicznym pozostają bioaktywne cząstki ceramiczne stymulujące regenerację uszkodzonej tkanki. W miarę degradacji alginianowej osnowy tworzy się *in vivo* porowata struktura ułatwiająca przerastanie implantu żywą tkanką. W pracy zbadano podstawowe właściwości fizykochemiczne otrzymanego wielofunkcyjnego kompozytu złożonego z alginianu wapnia i bioaktywnych cząstek ceramicznych.

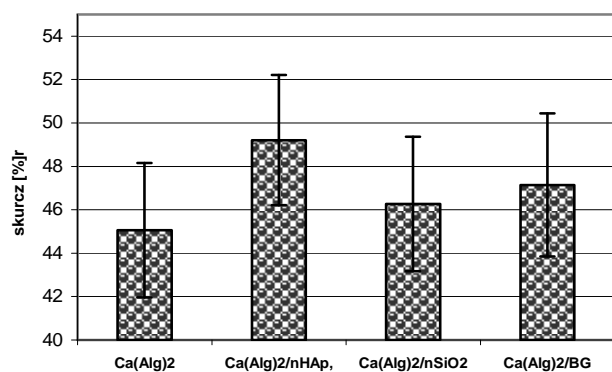
MATERIAŁY I METODY

Do wytworzenia materiałów kompozytowych wykorzystano sól sodową kwasu alginowego, stanowiącą prekursor do otrzymania alginianu wapnia $\text{Ca}(\text{Alg})_2$. Wyjściowy proszek biopolimerowy o nazwie komercyjnej PROTANAL 60/20 (NovaMatrix-Biopolimer, Norwegia) zawierał ~ 65% reszt kwasu guluoronowego, zwanego potocznie monomerem G. Zastosowano trzy rodzaje modyfikatorów ceramicznych. Pierwszym z nich był naturalny nanohydroksyapatyt (nHAp) wytworzony metodą hydrotermalną w Katedrze Ceramiki Specjalnej AGH, którego rozmiar ziaren wahał się w granicach ok. 30 nm. Drugim modyfikatorem zastosowanym w badaniach była nanokrzemionka (nSiO_2) koloidalna (DE-GUSSA, firmy Aerosil) o rozmiarze ziaren 50 ± 100 nm. Trzecim modyfikatorem ceramicznym było bioszkleo BioGlas wytworzone w Katedrze Szkl i Powłok Amorficznych AGH. Proszki ceramiczne dodawano do roztworu alginianu sodu rozpuszczonego w 0,3% roztworze NaCl . Zastosowano ten sam udział wagowy modyfikatora we wszystkich zawiesinach (3% wag.). Mieszanki homogenizowano mechanicznie i ultradźwiękowo aż do uzyskania jednolitej zawiesiny, następnie wkraplano do 3% roztworu chlorku wapnia CaCl_2 . Czas żelowania wynosił 10 min. Otrzymane kulki kompozytowe suszono przez 48 godzin w temperaturze 35°C . Skurcz kulek alginianowych oceniano na podstawie pomiarów średnicy materiału tuż po uformowaniu (tzw. średnica mokra), a następnie po wysuszeniu (tzw. średnica sucha). Powierzchnię kompozytów obserwowano w skaningowym mikroskopie elektronowym (Joel 5400, Japonia). Dyspersję modyfikatora w objętości kompozytu badano na przekroju sfery kompozytowej, wykorzystując do tego celu przystawkę do mikroanalizy rentgenowskiej EDS (Joel 5400, Japonia). Trwałość kompozytów określano na podstawie badań pH płynów immersyjnych, w których inkubowano badane materiały kompozytowe $37^\circ\text{C}/30$ dni (pH-metr Elmetron typ CP - 315). Materiał odniesienia stanowiły kulki alginianowe bez modyfikatora - kulki z alginianu wapnia, $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ poddane degradacji w tych samych warunkach co materiały kompozytowe. Zastosowano trzy rodzaje mediów immersyjnych: pierwszym z nich była woda, drugim roztwór wieloelektrolitowego płynu izotonicznego (płyn

Ringera, pH = 7), a trzecim roztwór buforu fosforanowego (PBS, pH = 7,4). Zastosowanie buforu fosforanowego pozwoliło na sprawdzenie, jak obecność anionów fosforanowych wpływa na trwałość postaci kompozytów (kulisty).

WYNIKI I DISKUSJA

Zastosowana metoda otrzymywania kompozytów alginianu wapnia z prekursora sodowego jest wynikiem reakcji wymiany kationów $\text{Na}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$, a w efekcie zmianą struktury biopolimeru. Rezultatem skrócenia łańcucha biopolimeru wokół dwuwartościowego kationu jest wysoki skurcz alginianu wapnia, $\text{Ca}(\text{Alg})_2$, który rośnie po dodaniu modyfikatora ceramicznego w szeregu: $\text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{nHAp} > \text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{BG} > \text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{nSiO}_2$ (rys. 1).



Rys. 1. Skurcz materiałów kompozytowych i materiału odniesienia po wysuszeniu ich na powietrzu

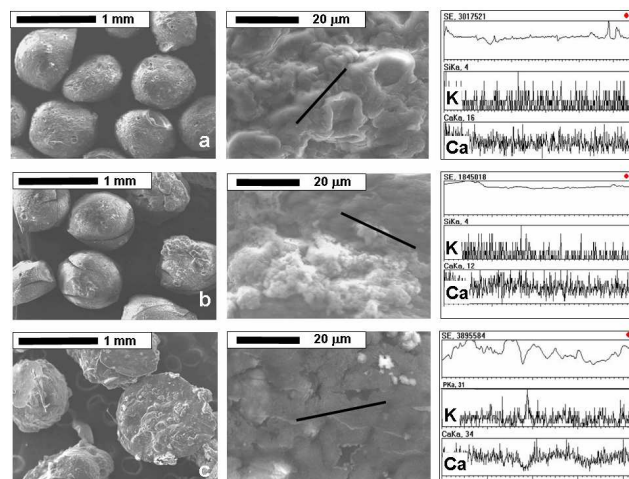
Fig. 1. Shrinkage of the composite materials and the reference sample after drying in air

Zastosowana temperatura (25°C) nie ma wpływu na stopień skurczu, a jedynie na szybkość procesu (25°C suszenie 72 h, ale już w temperaturze 50°C suszenie trwa 48 h). Wprowadzenie modyfikatora do biopolimerowej matrycy w fazie roztworu (1,5% NaAlg) powoduje najczęściej silną jego aglomerację. Jej stopień zależy od wielkości cząstek - najmniejszy jest w przypadku nSiO_2 , a największy, gdy modyfikatorem jest BG. Zastosowana dwustopniowa metoda dyspersji: mieszadło mechaniczne i płuczka ultradźwiękowa wpływa na poprawę homogeniczności układu kompozytowego.

Otrzymane sfery kompozytowe charakteryzują się kulistym kształtem i gładką powierzchnią. Kompozyty z 3% udziałem BG wyróżniają się widocznymi makroskopowo aglomeratami. Analiza wykonana skaningowym mikroskopem elektronowym wskazuje, że najlepszą dyspersję modyfikatora uzyskano w przypadku nanometrycznej koloidalnej krzemionki (rys. 2). Kompozyty z nHAp charakteryzują się gorszą dyspersją modyfikatora, widoczną po wykonaniu analizy EDS.

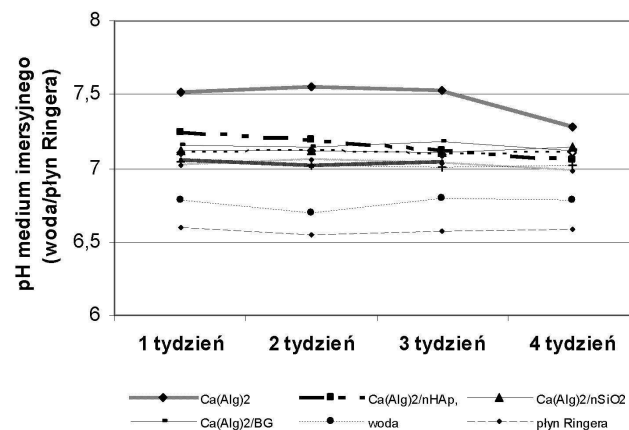
Stopień dyspersji materiałów ceramicznych i ich rodzaj nie wpływały w znaczący sposób na zachowanie się materiału w sztucznym środowisku *in vitro*. Zarówno

kompozyty, jak i materiał odniesienia (kulki z alginianu wapnia) są stabilne w wodzie oraz w wieloelektrolitowym płynie izotonicznym (płyn Ringera). Monitoring pH wyciągów (1:10) pozostaje na poziomie płynu immersyjnego pozbawionego kontaktu z badanym materiałem kompozytowym (woda/płyn Ringera inkubowany w tych samych warunkach: 37°C/miesiąc (rys. 3)).



Rys. 2. Morfologia wytworzonych kompozytowych sfer alginowych modyfikowanych dodatkami nanometrycznej krzemionki (a), nanometrycznego HAp (b), bioszklą BG (c)

Fig. 2. Morphology of the composite materials modified with nanometric silica nSiO_2 (a), nanometric hydroxyapatite nHAp (b), bio-glass BG (c)



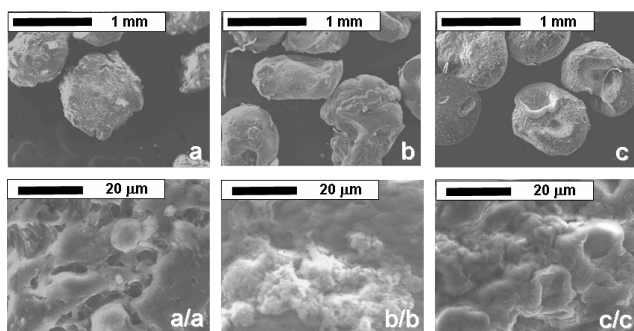
Rys. 3. Zmiana pH płynu immersyjnego (płyn Ringera) w funkcji czasu w trakcie inkubacji kompozytów z biopolimeru

Fig. 3. pH changes of the Ringer solution vs. incubation time of the alginate composites

Widocznym efektem degradacji kompozytów jest zmieniająca się powierzchnia i kształt materiałów kompozytowych. Najsilniejsze zmiany powierzchni (liczne spękania, pomarszczenia) wywołane erozją cieczy widoczne są na kulkach z nanohydroksyapatytem. Najmniej zmienione pozostają kompozyty z alginianu z koloidalną krzemionką (rys. 4).

Inkubacja kompozytów w buforze fosforanowym (PBS) w warunkach symulujących żywy organizm (37°C/5%CO₂/7 dni) prowadzi do zniszczenia kompo-

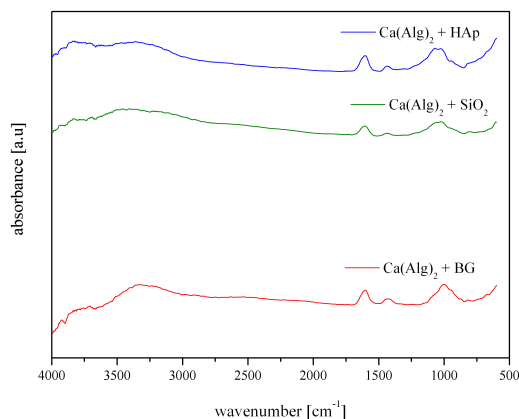
zytu i jego zupełnej degradacji. Jest to wynikiem obecności w roztworze jonów sodu, potasu i chloru, które wpływają na rozluźnienie struktury chemicznej, pozabawienie jej wiązań wodorowych, a także ponowną reakcję wymiany jonu $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Na}^+$ lub K^+ . W przypadku soli słabych kwasów (takich jak kwas alginowy, HAlg) wprowadzone do roztworu jony hydroniowe (pochodzące z roztworu PBS) wiążą aniony reszty kwasowej, tworząc cząsteczki słabo zdysocjowanego kwasu (HAlg). Konsekwencją tego jest wzrost stężenia jonów Ca^{2+} , czyli zwiększenie rozpuszczalności zestalonej soli $\text{Ca}(\text{Alg})_2$. W takim przypadku do roztworu immersyjnego przedostają się cząstki modyfikatorów (wynik potwierdzony analizą XRD).



Rys. 4. Morfologia kul z alginianu wapnia modyfikowanych cząstkami ceramicznymi nSiO₂ (a), nHAp (b), BG (c) po miesięcznym czasie degradacji (37°C/4 tygodnie/woda). Powierzchnia kompozytów po degradacji nSiO₂ (a/a), nHAp (b/b), BG (c/c)

Fig. 4. Morphology of beads made of calcium alginate modified with ceramic particles: nSiO₂ (a), nHAp (b), BG (c) after one month of degradation (37°C/4 weeks/water). Surface of the composites after degradation: nSiO₂ (a/a), nHAp (b/b), BG (c/c)

Zastosowanie manometrycznych cząstek ceramicznych do modyfikacji biopolimeru nie wpłynęło na jego strukturę chemiczną. Badania modelowe folii kompozytowych wykonane techniką ATR/FT IR nie wykazały dodatkowych pasm pochodzących od fazy ceramicznej w materiałach kompozytowych (rys. 5).



Rys. 5. Widmo materiałów kompozytowych $\text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{nHAp}$, $\text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{nSiO}_2$, $\text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{BG}$ (technika FTIR/ATR)

Fig. 5. Infrared spectra of the composite materials: $\text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{nHAp}$, $\text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{nSiO}_2$, $\text{Ca}(\text{Alg})_2/\text{BG}$ (FTIR/ATR method)

Analiza widma $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ wykonanego metodą spektroskopii transmisyjnej (FTIR/KBr) wskazuje natomiast, że otrzymane pasma widoczne na widmie materiałów kompozytowych pochodzą jedynie od matrycy biopolimerowej.

WNIOSKI

Zastosowana metoda otrzymywania kulistych materiałów kompozytowych z soli alginowych (NaAlg) może być wykorzystana jako nowy sposób wprowadzenia w miejsce uszkodzonej tkanki substancji aktywnych. Kompozytowe kule na bazie soli alginianowych stanowią mogą efektywny nośnik substancji bioaktywnych, uwalnianych w miejscu defektu. Wstępne badania wskazują, że otrzymane materiały charakteryzują się różnym czasem degradacji zależnym od obecności i stężenia jonów sodu, potasu czy chloru. W warunkach naturalnych materiały te nie powinny powodować stanów zapalnych ze względu na neutralny odczyn środowiska w trakcie degradacji, a uwalniane w jej trakcie substancje aktywne (nHAp, nSiO₂, BG) mogą stymulować odbudowę i regenerację uszkodzonej tkanki.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach prowadzonych Badań Statutowych KB WIMiC 11.11.160.367

LITERATURA

- [1] Bruce Davey R., Sparnon A.L., Byard R.W., Unusual donor site reactions to calcium alginate dressings, *Burns* 2000, 26, 393-398.
- [2] Kneafsev B., O'Shaughnessy M., Condon K.C., The use of calcium alginate dressings in deep hand burns, *Burns* 1996, 22, 40-43.
- [3] Petit B., Masuda K., D'Souza A.L. et al., Characterization of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments, *Experimental Cell Research* 1996, 225, 151-161.
- [4] Kikuchi T., Yamada H., Fujikawa K., Effects of high molecular weight hyaluronan on the distribution and movement of proteoglycan around chondrocytes cultured in alginate beads, *Osteoarthritis and Cartilage* 2001, 9, 351-356.
- [5] Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.M., Axelos M.A.V., Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations, *Polymer Gels and Networks* 1998, 6, 393-408.
- [6] Murata Y., Miyamoto E., Kawashima S., Additive effect of chondroitine sulfate and chitosan on drug release from calcium induced alginate gel beads, *Journal of Controlled Release* 1996, 38, 101-108.
- [7] Matricardi I., Onorati T., Coviello F., Alhaique, Drug delivery matrices based on scleroglucan/alginate/borax gels, *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 316, 21-28.