

Anna KUROWSKA¹

Opiekun naukowy: Izabella RAJZER²

OCENA BIOAKTYWNOŚCI PODŁOŻY WYTWARZANYCH TECHNIKĄ DRUKU 3D

Streszczenie: Biopolimery są powszechnie wykorzystywane, jako materiały stanowiące podłoże w inżynierii tkankowej. Posiadają one zdolność biodegradacji w kontakcie z żywymi tkankami. Wprowadzenie bioaktywnych dodatków do podłoża wywołuje odpowiedź biologiczną w postaci warstwy apatytu, umożliwiającego wytworzenie bezpośredniego wiązania między tkanką a wszczepionym materiałem. W ramach pracy wykonano ocenę bioaktywności podłoży z polikaprolaktonu (PCL) w warunkach *in vitro* w płynie fizjologicznym (SBF – sztuczne osocze).

Słowa kluczowe: polikaprolakton, płyn fizjologiczny (SBF), bioaktywność, druk 3D podłoży, inżynieria tkankowa.

THE BIOACTIVITY EVALUATION OF 3D PRINTED SCAFFOLDS

Summary: Biopolymers are widely used as scaffold in tissue engineering. They have the ability to biodegrade in contact with living tissues. The introduction of bioactive additives into the scaffold structure, induces a biological response in the form of apatite layer formation, which leads to a direct connection between the human tissue and implanted material. The bioactivity of PCL scaffolds was assessed *in vitro* in simulated body fluid (SBF).

Keywords: polycaprolactone, simulated body fluid (SBF), bioactivity, 3D printed scaffold, tissue engineering.

1. Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa łączy ze sobą dziedziny z zakresu nauk technicznych i medycznych. Celem inżynierii tkankowej jest odbudowa uszkodzonych tkanek i narządów. Metody inżynierii tkankowej opierają się na wytworzeniu podłoży (*ang. scaffolds*), o porowatej i przestrzennej mikrostrukturze, których zadaniem jest

¹ Mgr inż., Akademia Techniczna Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, annakurowska@interia.pl

² Dr hab. inż., prof. ATH Akademia Techniczna Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, irajzer@ath.bielsko.pl

stworzenie odpowiednich warunków do regeneracji uszkodzonych tkanek lub narządów [1]. O prawidłowym przebiegu regeneracji tkanki decydują takie czynniki jak: mikrostruktura rusztowania, jego właściwości oraz skład chemiczny (np. obecność bioaktywnych cząstek). Przestrzenna mikrostruktura podłoża powinna naśladować matrycę zewnątrzkomórkową ECM (*ang. extracellular matrix*), zapewniając tym samym prawidłowy metabolizm i funkcje życiowe posadzonych na podłożu komórek, zachowanie ich odpowiedniego kształtu oraz właściwe różnicowanie i proliferację [1,2]. Podłoża mogą być wytwarzane z polimerów, służąc jednocześnie jako nośnik leków bądź innych bioaktywnych dodatków [2].

Polikaprolakton (PCL) to biokompatybilny i biodegradowalny polimer, należący do grupy poliestrów alifatycznych. Cechują go korzystne właściwości mechaniczne oraz odpowiednie właściwości biologiczne [3]. Najczęściej stosowany jest do produkcji implantów oraz nici chirurgicznych. W organizmie człowieka polikaprolakton ulega powolnej, trwającej około 2 lat biodegradacji, która zachodzi na skutek hydrolizy wiązań estrowych [4].

Nadanie właściwości antybakteryjnych podłożom wykonanym z polikaprolaktonu jest możliwe poprzez wprowadzenie odpowiednich dodatków. W literaturze opisywane są właściwości antybakteryjne grafenu [5]. Grafen jest materiałem o udowodnionej biokompatybilności, dodatkowo może być również nośnikiem genów i leków [6,7]. Innym dodatkiem często wprowadzanym do podłoży tkankowych, mającym właściwości bioaktywne, tzn. zapewniające odpowiednie, bezpośrednie połączenie z otaczającą tkanką po implantacji, jest bioszkieło [8].

Celem pracy była ocena bioaktywności podłoży dla inżynierii tkankowej wytworzonych metodą druku 3D z polikaprolaktonu modyfikowanego różnymi dodatkami. Ocenę aktywności biologicznej podłoży modyfikowanych grafenem i bioszkiełem przeprowadzono w warunkach *in vitro* w płynie fizjologicznym SBF (Simulated Body Fluid) symulującym sztuczne osocze krwi. Próbki przetrzymywano w roztworze płynu SBF, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, w temperaturze 37°C. Na podstawie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* można wnioskować o potencjalnym zachowaniu się materiału w warunkach *in vivo*, czyli po implantacji do żywych tkanek.

2. Materiały i metody

2.1 Materiały

Do sporządzenia próbek wykorzystano filament, którego materiałem bazowym był Poly-ε-kaprolacton (PCL) o masie cząsteczkowej 80 kDa, firmy Sigma Aldrich. W pracy wykorzystano:

- 1) grafen płatkowy (GNP), w formie proszku, firmy Sigma Aldrich, (mieszanka: 1 g GNP/40 g PCL);
- 2) Bioszkieło A2 wytworzone na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, AGH (przemieszka: 1 g BG/40 g PCL);
- 3) Bioszkieło modyfikowane cynkiem (A2Zn5) również wytworzone na WIMiC, AGH (przemieszka: 1 g BG_Zn/40 g PCL).

W ramach pracy wydrukowano próbki z czystego polikaprolaktonu (PCL), polikaprolaktonu z dodatkiem bioszkieła (PCL_BG), polikaprolaktonu z dodatkiem

bioszkła z cynkiem (PCL_BG_Zn), oraz polikaprolaktonu z dodatkiem grafenu (PCL_GRAF).

2.1.1 Druk 3D

Podłoża do badań zostały zaprojektowane (CAD), a następnie wytworzone przy użyciu technologii druku przestrzennego. Zastosowano drukarkę ANET A8 (Prusa i3, rozdzielczości 0,1-0,3 mm) pracującą w technologii FDM. Parametry procesu druku dla poszczególnych materiałów przedstawiono w Tabeli 1. Zmiana temperatury stołu dla pierwszej warstwy i dla warstw kolejnych, miała na celu poprawę przyczepności próbki do platformy produkcyjnej, a tym samym wyeliminowanie ryzyka jej uszkodzenia.

Tabela 1. Parametry druku 3D

	Temperatura dyszy [°C]	Temperatura stołu dla pierwszej warstwy [°C]	Temperatura stołu dla warstw kolejnych [°C]	Szybkość druku [%]
PLC	170	50	20	50
PCL_BG	170	40	40	25
PCL_BG_Zn	190	50	20	50
PCL_GRAF	190	50	50	125

2.2 Metody Badań

Test *in vitro* w płynie SBF

W tabeli 2 przedstawiono skład jonowy oraz pH dla sztucznego (SBF) i fizjologicznego osocza krwi [8,9].

Tabela 2. Skład jonowy sztucznego i fizjologicznego osocza krwi [9]

Jon	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HC O ₃	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	pH
Stężenie [mmol/d]									
SBF	142	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1	0,5	7,25-7,4
Osocze krwi	142	5,0	1,5	2,5	103	27	1	0,5	7,2-7,4

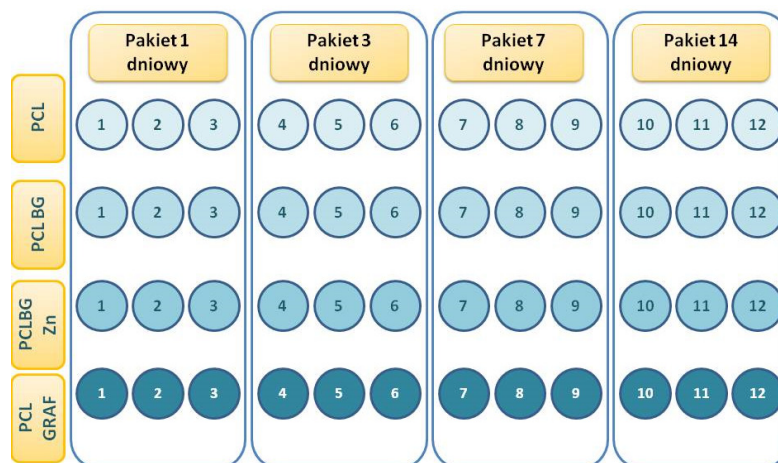
Sporządzono 1 litr płynu SBF (*simulated body fluid*) o stężeniu 1,5x zgodnie ze składem zaproponowanym przez prof. T. Kokubo (Tabela 3) [9].

Tabela 3. Skład 1000 ml 1,5 x płynu SBF.

Odczynnik	Ilość
NaCl	12,054 g
NaHCO ₃	0,528 g
KCl	0,3375 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,345 g

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4665 g
HCl (1M)	60 ml
CaCl ₂	0,4395 g
Na ₂ SO ₄	0,108 g
TRIS	9,0945 g

Metodą druku 3D otrzymano 4 rodzaje różnych podłoży z polikaprolaktonu, różniących się rodzajem wprowadzonego dodatku. Każdą z próbek zważono oraz zmierzono jej grubość i średnicę (tester Mitutoyo 7316S), po czym umieszczono w 5 ml pojemniku i zalano płynem SBF. Inkubację prowadzono w cieplarni w temperaturze 37°C (temperatura zbliżona do temperatury ludzkiego ciała). Płyn wymieniano co dwa dni, za każdym razem badając zawartość jonów: Na⁺, K⁺, Ca²⁺ (analyzer jonów EasyLyte®Calcium MEDICA), wartość pH (pH-metr ELMETRON CP-401) oraz przewodnictwo (konduktometr ELMETRON CC-505). Po 1, 3, 7 i 14 dniach inkubacji próbki wyciągnięto z płynu (Rys. 1), przepłukano wodą destylowaną, wysuszono i zważono.



Rysunek 1. Próbki do badań w płynach fizjologicznych z podziałem na pakiety

Ocenę mikrostruktury próbek przeprowadzono przed i po inkubacji za pomocą mikroskopu optycznego OPTA-TECH wyposażonego w kamerę CMOS 3.

3. Wyniki i dyskusja

Zachowanie się materiałów w środowisku płynów fizjologicznych zależy od wielu czynników. Z jednej strony duży wpływ ma budowa i własności samego polimeru z drugiej, istotnymi czynnikami są warunki panujące w otaczającym je środowisku, takie jak temperatura czy pH.

Badania pH i przewodnictwa podczas inkubacji rusztowań w płynie SBF

Ocenę stabilności rusztowań wytworzonych techniką druku 3D przeprowadzono na podstawie zmian pH i przewodnictwa płynu SBF, w którym inkubowane były próbki.

Na Rysunku 2a przedstawiono zmiany wartości pH próbek podczas inkubacji w płynie SBF. Przeprowadzone badania inkubacji modyfikowanych dodatkami rusztowań tkankowych miały na celu określenie wpływu stymulowanego środowiska biologicznego na zachowanie się materiału (np. na jego degradację). W ramach przeprowadzonych badań, wykazano, że pH próbek modyfikowanych różnymi dodatkami utrzymuje się na podobnym poziomie. Przewodnictwo badanych próbek mieściło się w zakresie 22-28 mS/cm (Rys. 2b). Brak istotnych zmian pH oraz przewodnictwa płynu SBF podczas inkubacji wytworzonych rusztowań przez okres dwóch tygodni świadczy o stabilnym zachowaniu materiałów podczas inkubacji.

Badania stężenia zawartości jonów wybranych pierwiastków w czasie inkubacji w sztucznym osoczu

Ocenę trwałości chemicznej podłoży przeprowadzono na podstawie zmian stężenia jonów sodu, potasu i wapnia w sztucznym osoczu (płynie SBF). Wyniki badań przedstawiono na rysunku 3. Odnotowano zmniejszenie się stężenia jonów wapnia w płynie SBF w przypadku wszystkich inkubowanych próbek, podczas gdy stężenie jonów sodu i potasu pozostawało bez zmian. Zmniejszenie jonów wapnia w płynie SBF podczas inkubacji próbek prawdopodobnie może być związane z tworzeniem się warstwy Ca-P na inkubowanych rusztowaniach, a tym samym z pobieraniem jonów wapnia z roztworu. Po 5 dniach inkubacji próbek można zaobserwować pierwszy znaczny spadek stężenia jonów wapnia. Jest on największy w przypadku próbki PCL modyfikowanej bioszkiełem (PCL_BG). Kolejny większy spadek można zaobserwować w 10 dniu inkubacji próbek. Próbki modyfikowane grafenem charakteryzują się najmniejszą zmianą stężenia jonów wapnia.

Badania zmian masy próbek w czasie inkubacji w sztucznym osoczu

Procentowe zmiany masy próbek przedstawiono na rysunku 4. Zmiany masy liczono według wzoru:

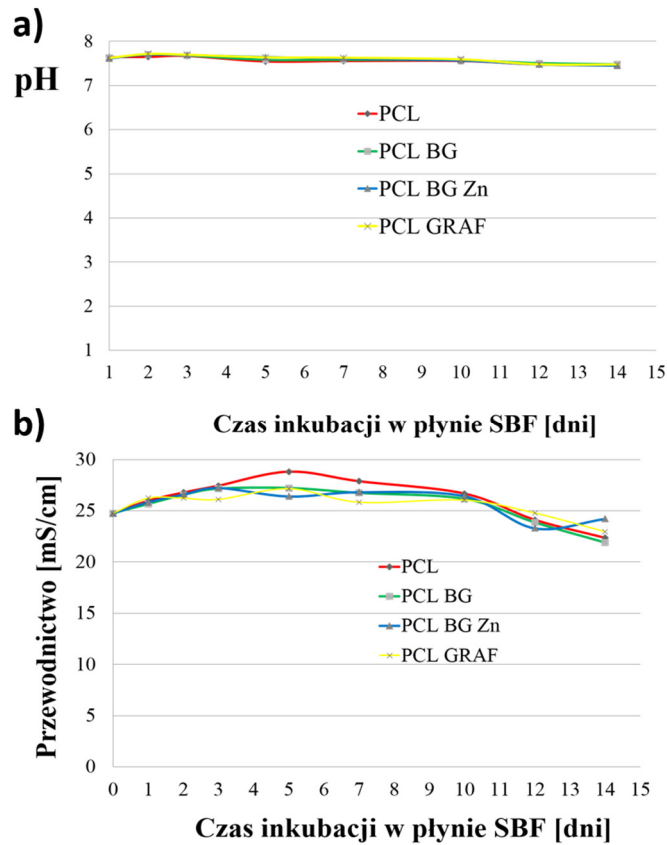
$$\Delta m = \frac{mk - mp}{mp} \cdot 100 [\%] \quad (1)$$

Gdzie: mp – masa próbki przed inkubacją;

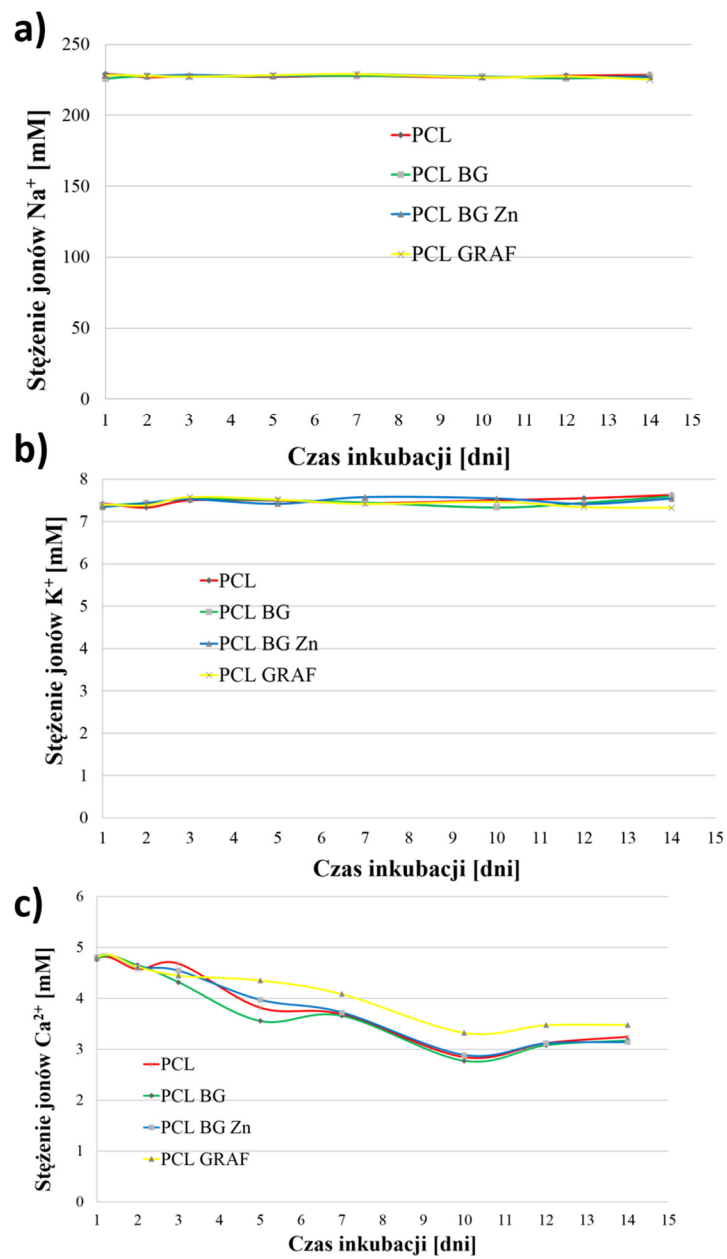
mk – masa próbki po danym okresie inkubacji.

Modyfikacja rusztowań poprzez wprowadzenie grafenu do polimerowej matrycy z PCL spowodowała znaczny przyrost masy. W przypadku próbki PCL modyfikowanej bioszkiełem z cynkiem oraz niemodyfikowanym bioszkiełem zaobserwowano spadek masy w pierwszych dniach inkubacji, szczególnie mocno zaznaczony w przypadku próbki PCL_BG_Zn. Dla czystego PCL odnotowano nieznaczny wzrost masy, który jest wynikiem charakterystycznego dla polimerów efektu wchłaniania wilgoci. Wzrost masy modyfikowanych próbek w trakcie dwóch tygodni inkubacji związany jest z powstawaniem warstwy apatytu na powierzchni porowatych rusztowań modyfikowanych bioaktywnymi dodatkami.

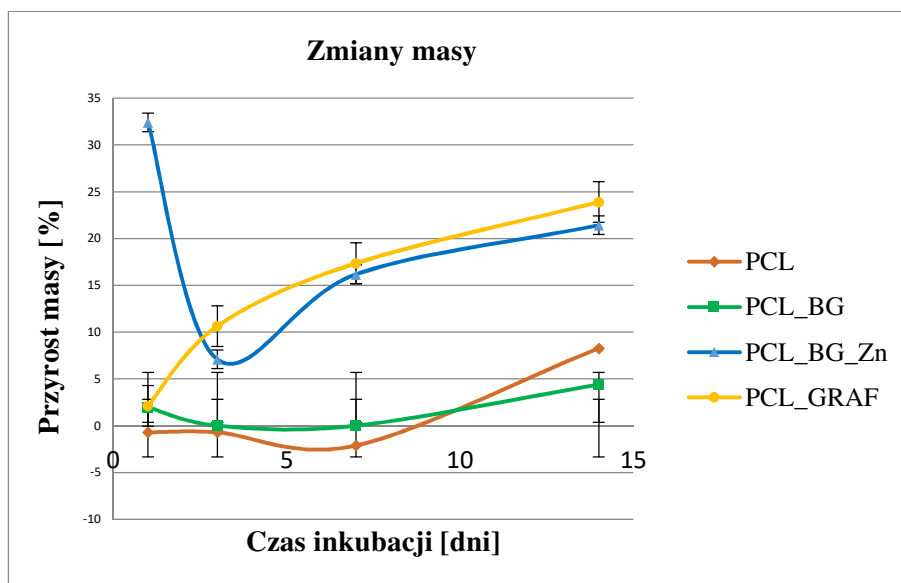
W celu potwierdzenia otrzymanych wyników badań przeprowadzono obserwacje mikroskopowe próbek po procesie inkubacji.



Rysunek 2. Zmiany pH (a) oraz przewodnictwa płynu SBF (b) podczas 14 dniowej inkubacji próbek



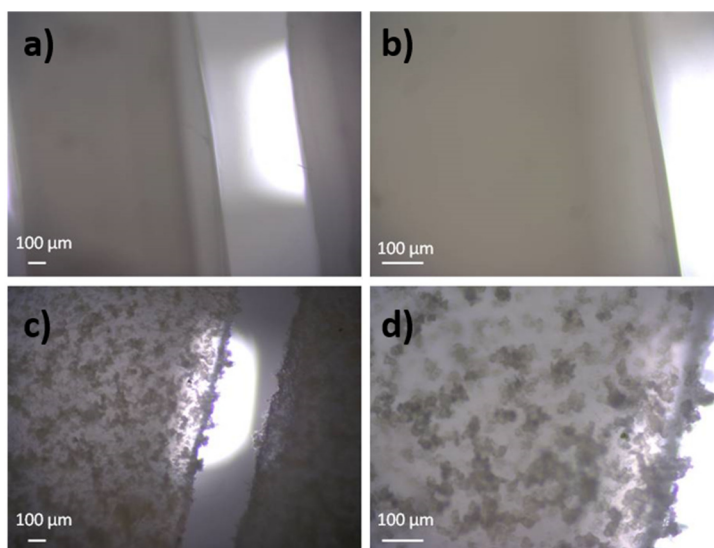
Rysunek 3. Zmiany stężenia jonów Na^+ , K^+ , Ca^+ w płynie SBF w trakcie inkubacji próbek.



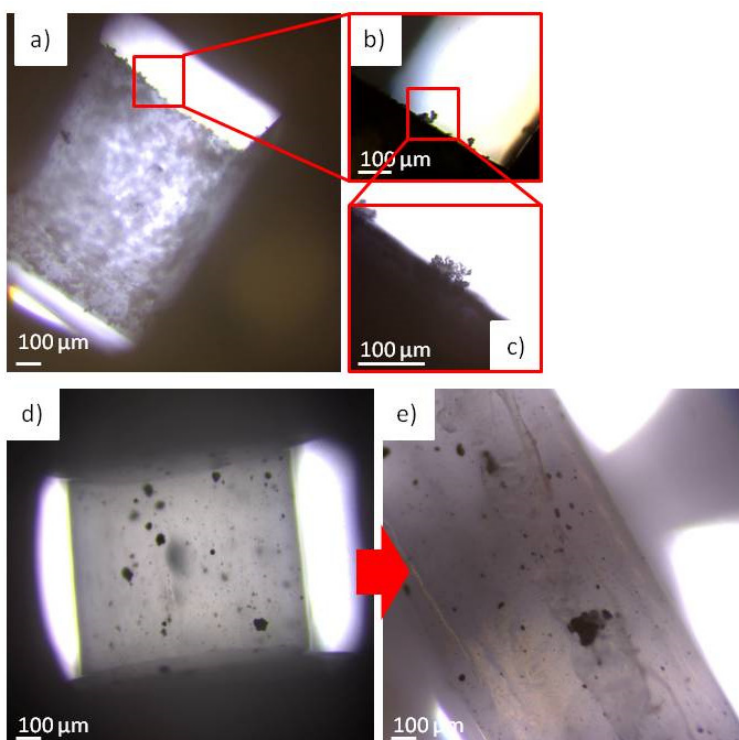
Rysunek 4. Zmiany masy próbek w trakcie inkubacji w płynie SBF przez okres 2-tygodni.

Badania zmian zachodzących w wytworzonych materiałach pod wpływem płynu SBF.

Ocenę zmian zachodzących w wytworzonych materiałach pod wpływem płynu SBF przeprowadzono również wykorzystując badania mikroskopowe. Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono po 7 dniach inkubacji podłoży w sztucznym osoczu. Na rysunku 5 przedstawiono przykładowy obraz mikroskopowy kompozytowej próbki PCL_BG_Zn przed i po inkubacji w płynie SBF. Przed procesem inkubacji powierzchnia rusztowania była gładka i jednolita. Po 7 dniach inkubacji zauważono charakterystyczne dla apatytu wydzielenia na powierzchni próbki. Podobne wydzielenia zaobserwowano również w przypadku próbek modyfikowanych grafenem (Rys. 6).



Rysunek 5. Morfologia powierzchni próbki PCL_BG_Zn przed (a-b) i po (c-d) inkubacji w płynie SBF (mikroskop optyczny).



Rysunek 6. Morfologia powierzchni próbki PCL_GRAF przed (d-e) i po (a-c) inkubacji w płynie SBF (mikroskop optyczny).

4. Wnioski

Wstępne badania przeprowadzone w płynie SBF potwierdziły bioaktywny charakter modyfikowanych podłoży wytwarzanych metodą druku 3D. Ocena bioaktywności na podstawie przeprowadzonego 14 dniowego testu SBF potwierdziła możliwość formowania się warstwy apatytu na powierzchni modyfikowanych materiałów polimerowych. Zarówno zmiana stężenia jonów wapnia w roztworze, jak i przyrost masy świadczą o formowaniu się warstwy apatytu na powierzchni materiałów. Badane materiały wykazały również stabilność chemiczną. Wyniki przeprowadzonych badań zostały potwierdzone obserwacjami mikroskopowymi. Przeprowadzone zostaną również badania FTIR i WAXD. Wyniki uzyskane w ramach pracy, wskazują na bioaktywny potencjał drukowanych materiałów polimerowych modyfikowanych dodatkami, a tym samym potwierdzają możliwość ich zastosowania dla celów medycznych.

PODZIĘKOWANIA: Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego pt. „Warstwowe podłoża wspomagające rekonstrukcję chrząstek nosa wytwarzane metodą druku przestrzennego i elektroprzędzenia” nr 2015/18/E/ST5/00189 (Sonata Bis 5).

LITERATURA

1. DZIADEK M., CHOLEWA-KOWALSKA K.: Wybrane metody otrzymywania porowatych rusztowań w inżynierii tkankowej. *Inżynieria Biomedyczna*. Vol. 20, nr.4, 192-202 (2014).
2. KRUK A., GADOMSKA-GAJADHUR A., RUŚKOWSKI P.: Zastosowanie bioresorbowalnych rusztowań w inżynierii tkankowej
3. GIL-CASTELL O., BADIA J.D., RIBES-GREUS A.: Tailored electrospun nanofibrous polycaprolactone/gelatin scaffolds into an acid hydrolytic solvent system. *European Polymer Journal* 101, 273-281 (2018).
4. ALTUN E., EKREN N., ERDEM KURUCA S., GUNDUZ O.: Cell studies on Electrohydrodynamic (EHD) - 3D-bioprinted Bacterial Cellulose \ Polycaprolactone scaffolds for tissue engineering. *Materials Letters* 234, 163- 167 (2019).
5. BOJKO Ł., RYNIOWICZ A.M.: Wykorzystanie grafenu w medycynie. *Problemy Nauk Stosowanych*, Tom 3, 147 – 156 (2015).
6. HUCZKO A., DĄBROWSKA A., KURCZ M.: Grafen otrzymywanie, charakterystyka, zastosowanie. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2016.
7. SŁOMA M.: Nanomateriały węglowe w technologii elektroniki drukowanej. Oficyna wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2017.
8. DZIADEK M., PAWLIK J., CHOLEWA-KOWALSKA K.: Szklą bioaktywne w inżynierii tkankowej. *Inżynieria biomedyczna*, vol. 20, nr 3, 156-165 (2014).
9. KOKUBO T., TAKADAMA H.: How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27, 2907–2915 (2006).