

Anna KUROWSKA<sup>1</sup>, Joanna WRONA<sup>2</sup>, Anna NIKODEM<sup>3</sup>,  
Izabella RAJZER<sup>4</sup>

## **ANALIZA HOMOGENICZNOŚCI DODATKU MODYFIKUJĄCEGO W STOPIE POLIKAPROLAKTONU W OPARCIU O BADANIA MIKROTOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ**

**Streszczenie:** W pracy przedstawiono metodę wykonania stopu polimeru, jako nowy sposób otrzymywania biomateriałów kompozytowych, o osnowie polikaprolaktonu, modyfikowanych bioaktywnymi i antybakteryjnymi cząstkami. Przeprowadzono badania mikrotomografii komputerowej, do oceny homogeniczności dodatku modyfikującego w objętości próbki, w oparciu analizę rozkładu i wielkości wtrąceń. Wykazano bardziej jednorodny rozkład analizowanych wtrąceń w stopie polimeru modyfikowanego dodatkami, w porównaniu z wcześniejszą metodą otrzymywania podobnych materiałów kompozytowych.

**Słowa kluczowe:** inżynieria tkankowa, PCL, grafen, HAp,  $\mu$ CT

## **MICRO-COMPUTED TOMOGRAPHY ANALYSIS OF HOMOGENICITY OF THE MODIFYING ADDITIVE IN THE POLYCAPROLACTONE MELT**

**Summary:** The paper presents the method of manufacturing a polymer melt, as a new method to obtain composite biomaterials with a polycaprolactone matrix, modified with bioactive and antibacterial particles. Micro-computed tomography tests were carried out to assess the homogeneity location of the modifying additive in the sample volume, based on the analysis of the distribution and size of inclusions. A more homogeneous distribution of the analyzed inclusions in the polymer melt modified with additives was shown with the previous method of obtaining similar composite materials.

**Keywords:** tissue engineering, PCL, graphene, HAp,  $\mu$ CT

---

<sup>1</sup> dr inż., Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, akurowska@ath.bielsko.pl

<sup>2</sup> inż., Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Chemia i Inżynieria Materiałów, Międzywydziałowe Koło Naukowe Biomechaników, 234037@student.pwr.edu.pl

<sup>3</sup> dr inż., Politechnika Wrocławska, Wydział Mechaniczny, Katedra Mechaniki, Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, anna.nikodem@pwr.edu.pl

<sup>4</sup> dr hab. inż., prof. ATH, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, irajzer@ath.bielsko.pl

## 1. Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa, jako interdyscyplinarna dziedzina nauki, łączy ze sobą wiedzę z zakresu nauk biologicznych, chemicznych, medycznych oraz nowoczesnej inżynierii biomateriałów [1]. Zadania inżynierii tkankowej obejmują poszukiwanie metod szybkiej i skutecznej regeneracji uszkodzonych bądź utraconych tkanek [2]. Jednym z elementów triady inżynierii tkankowej są podłoża tkankowe inaczej zwane rusztowaniami [3, 4]. W celu osiągnięcia skutecznej regeneracji, podłożom tym stawiane są określone wymagania dotyczące: organizacji przestrzennej, porowatości [5], biomimetyczności, biodegradacji [6], bioaktywności i biomateriału z którego zostały wykonane [7, 8].

Jednym z biomateriałów, który spełnia powyższe wymagania jest polikaprolakton. PCL należy do grupy biopolimerów zatwierdzonych przez FDA, degradowane poprzez hydrolizę wiązań estrowych w warunkach fizjologicznych, przez co zalecany jest do implantacji [9]. Charakteryzuje go wysoka krystaliczność, biokompatybilność, wytrzymałość mechaniczna, łatwość przetwarzania oraz biodegradowalność [10, 11]. Z kolei takie właściwości PCL jak, bioaktywność, niewielka hydrofilowość czy czas degradacji, można regulować poprzez włączanie cząstek materiałów bioaktywnych [12]. Modyfikatorem może być Hydroskypatyt (HAp), jako materiał bioceramiczny, o właściwościach osteindukcyjnych [13] oraz grafen, który posiada właściwości antybakteryjne, a jego cząstki z powodzeniem można osadzić w matrycy polimerowej [14].

Druk 3D należy do jednej z powszechnie stosowanych metod wytwarzania rusztowań tkankowych [15]. Metoda ta daje możliwość szybkiego otrzymywania podłoży, przy niewielkich kosztach. Ponadto technologia druku przestrzennego stwarza możliwość indywidualnego dostosowywania rusztowań, zarówno pod względem kształtu jak i architektury wewnętrznej, a otrzymane wydruki są precyzyjne i powtarzalne [16, 17, 18, 19]. Technika FDM wykorzystuje termoplastyczne filamenty, które komercyjnie przyjmują postać pręta nawiniętego na szpulę [20].

Z uwagi na szereg wymagań stawianych biomateriałom stosowanym do wytwarzania podłoży tkankowych, obecna oferta handlowa komercyjnie dostępnych filamenów jest ograniczona. W ramach poprzednich prac badawczych zaproponowano wytworzenie podłoży tkankowych do regeneracji ubytków chrząstki nosa, z wykorzystaniem metody druku przestrzennego (3D/FDM) i laboratoryjnie wytworzonego filamentu, w formie sztyftów.

Wytworzenie innowacyjnego filamentu o osnowie polikaprolaktonu, modyfikowanego bioaktywnymi i antybakteryjnymi cząstkami, wymaga opracowania metody otrzymywania biomateriałów kompozytowych, z homogenicznie rozmieszczonymi modyfikatorami.

W ramach poprzednich prac do wytworzenia filamentu, stosowano mieszanki, które poddawane były suchej homogenizacji w mieszadło mechaniczne przez około 20 minut, aż do momentu równomiernego oblepienia proszkiem modyfikatora granulek polimeru. Wówczas homogenizacja polimeru odbywała się jedynie w ślimakowym układzie uplastyczniającym.

W ramach niniejszej pracy zaproponowano nowy sposób otrzymywania jednorodnego rozkładu cząstek modyfikujących o osnowie polimeru. Proces wtrysku poprzedzono etapem przygotowaniu stopu polimeru i modyfikatora. Wyniki badań

dotyczące analizy homogeniczności otrzymanych biomateriałów kompozytowych przedstawiono w niniejszym opracowaniu.

Celem pracy jest analiza homogenicznego rozkładu dodatku modyfikującego w stopie PCL. Wytworzone próbki oceniono przy pomocy mikrotomografii komputerowej ( $\mu$ CT).

## 2. Materiały i metody

### 2.1 Materiały

Do przygotowania próbek wykorzystano polimer: poly- $\epsilon$ -kaprolacton (PCL) w formie granulek, o masie cząsteczkowej 80 kDa (Sigma Aldrich), Hydroksyapat (HAp) (AGH, Kraków) oraz Grafen płatkowy (GNP), w formie proszku (Sigma Aldrich, Hiszpania). Do badań wykorzystano również wcześniej przygotowane sztyfty filamentowe modyfikowane grafenem.

Do badań doświadczalnych przygotowano 3 rodzaje próbek:

- (1) sztyft PCL/graf - metoda wtrysku - (0,2 g GNP/40 g PCL),
- (2) stop PCL/graf - stop mieszanki czystego granulatu PCL i grafenu - (0,2 g GNP/40 g PCL),
- (3) stop PCL/graf+HAp - stop gotowego sztyftu PCL/Graf i Hydroksyapatytu (0,1 g HAp/3 g PCL+graf).

### Technologia wtrysku

Filament w formie sztyftów został wytworzony w technologii wtrysku, przy użyciu w pełni hydraulicznej wtryskarki Babyplast 6/10P (Rambaldi Group). Temperatura uplastyczniania dla polikaprolaktonu z dodatkiem grafenu wynosiła 210°C. Temperatura w dyszy wynosiła 200°C. Wartości temperatury dobrano tak, aby uzyskać odpowiednią płynność mieszanki, umożliwiającą jej wtryskiwanie do formy.

### Stop polimeru

Stopy polimeru wykonano przy użyciu trójkomorowego urządzenia do topienia wosku Vario E (Renfert). Temperatura topnienia dla obu stopów wynosiła 110°C. Każdy ze stopów mieszano mechanicznie przez 1 minutę, podgrzewano i ponownie mieszano przez 1 minutę. Czynność powtarzano 5 razy dla każdego ze stopów.

### 2. 2 Metody pomiarowe

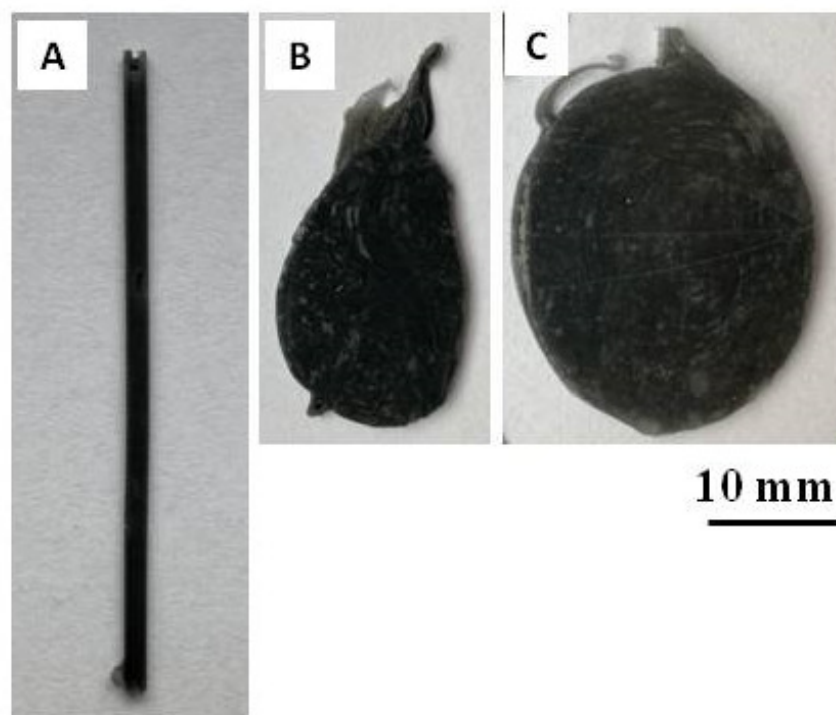
W celu określenia zawartości wtrąceń grafenu i hydroksyapatytu, przeprowadzono badania z użyciem mikrotomografu komputerowego 1172 Skyscan, Bruker (Kontich, Belgia). Ze względu na różną geometrię badanych próbek, parametry rejestracji różniły się między sobą, a ich szczegółowe wartości przedstawia Tabela 1. Badania przeprowadzono w Katedrze Mechaniki Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Wydziału Mechanicznego Politechniki Wrocławskiej.

Tabela 1. Porównanie geometrii próbek poddanych badaniom z użyciem mikrotomografii, wraz z parametrami ich rejestracji

| parametry próbek            | szyft PCL/graf | stop PCL/graf | stop PCL/graf+HAp |
|-----------------------------|----------------|---------------|-------------------|
| kształt próbki              | walec          | nieregularny  | nieregularny      |
| wysokość [mm]               | 47             | 31            | 44                |
| szerokość/średnica [mm]     | 1,7            | 14            | 24                |
| objętość [mm <sup>3</sup> ] | 113,15         | 298,48        | 1791,59           |
| rozdzielczość [μm]          | 6              | 10            | 13,5              |
| parametry lampy             | 40kV/250μA     | 40kV/250μA    | 95kV/104μA        |

### 3. Wyniki i dyskusja

Filament oraz próbki stopów przygotowanych do badań przedstawiono na Rys. 1.



Rysunek 1. Zdjęcia makroskopowe wykonanych próbek: A) szyft PCL/graf; B) stop PCL/graf; C) stop PCL/graf+HAp

Pomiar wartości geometrycznych wtrąceń oraz ich zawartości procentowej w próbce przeprowadzono na zrekonstruowanych, w programie NRecon, Bruker przekrojach. W programie CTAn przeprowadzono segmentację, której celem było wyselekcjonowanie wtrąceń grafenu i hydroksyapatytu, co pozwoliło na dalszą analizę parametrów strukturalnych tych struktur. W Tabeli 2 przedstawiono szczegółowe wyniki parametrów opisujących macierz PCL (zawartość objętościową jak również porowatość matrycy PCL) oraz wtrącenia grafenu i hydroksyapatytu.

*Tabela 2. Porównanie wartości zawartości procentowej wtrąceń oraz porowatości próbek grup 1-3, uzyskane w pomiarach z użyciem mikrotomografii komputerowej, gdzie: Obj.V/TV - to zawartość objętościowa matrycy oraz wtrąceń w objętości próbki; Po(tot) - to całkowita porowatość próbki z uwzględnieniem porowatości otwartej - Po(op) i porowatości zamkniętej - Po(cl), St.Th - to średni rozmiar wtrąceń*

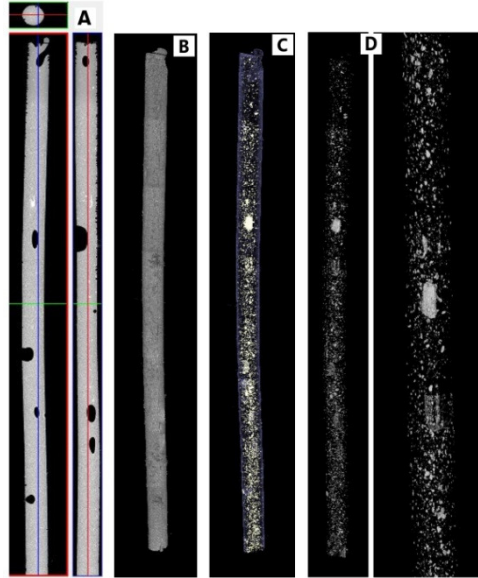
| próbka:          | sztyft PCL/graf | stop PCL/graf | stop PCL/graf+HAp |
|------------------|-----------------|---------------|-------------------|
| <b>matryca</b>   |                 |               |                   |
| Obj.V/TV [%]     | 70,8356         | 97,544        | 97,3067           |
| Po(tot) [%]      | 29,1645         | 2,456         | 2,6933            |
| Po(op) [%]       | 29,0489         | 0,5495        | 0,5720            |
| Po(cl) [%]       | 0,1629          | 1,9169        | 2,1335            |
| <b>wtrącenia</b> |                 |               |                   |
| Obj.V/TV [%]     | 0,9571          | 0,0611        | 0,1337            |
| St.Th [mm]       | 0,0337          | 0,0483        | 0,2784            |

Z danych przedstawionych w tabeli 2 wynika, że zawartość polikaprolaktonu we wszystkich próbkach (Obj. V/TV) jest mniejsza niż 100%. Oznacza to, że oprócz matrycy w próbkach występują pory oraz wtrącenia. We wszystkich próbkach występowała zarówno porowatość otwarta jak i zamknięta, które składają się na porowatość całkowitą. W sztyfcie ilość porów otwartych (ok. 29%), wynika z procesu otrzymywania i jest związana z dostaniem się powietrza podczas uplastyczniania i wtryskiwania polimeru.

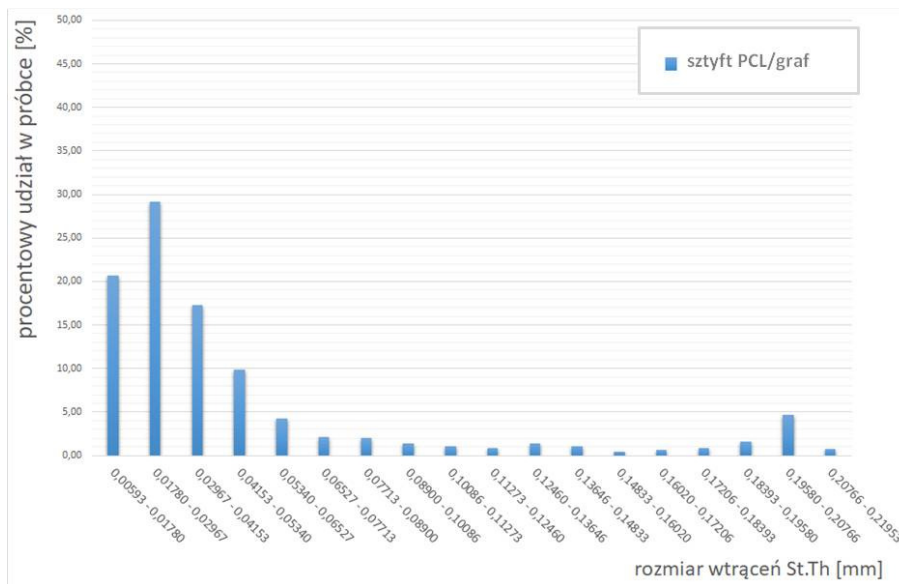
Na Rysunkach 2, 4, 6 przedstawiono zrekonstruowane obrazy próbek poddanych badaniom z użyciem mikrotomografii komputerowej, dodatkowo uwidaczniając analizowane wtrącenia. Oprócz drobnych wtrąceń rozproszonych w całej objętości próbek, zwłaszcza w przypadku sztyftu, widoczne są również większe aglomeraty drobnych cząstek. Natomiast w przypadku próbki 3 (PCL/graf+HAp) można zaobserwować liczne wtrącenia o większych rozmiarach.

Badania z użyciem mikrotomografii pozwoliły przeprowadzić pomiar wielkości geometrycznych wtrąceń grafenu w matrycy PCL oraz ich procentowy udział w objętości PCL (Rysunek 3, 5, 7). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że rozmiar wtrąceń w próbce 1 zawiera się w przedziale 0,005-0,219 [mm], a w próbce

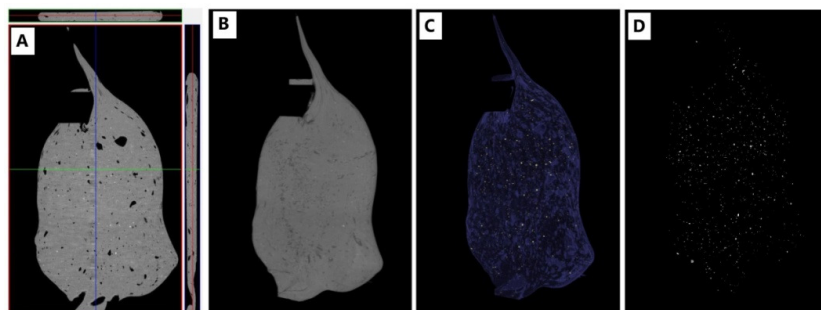
2 od 0,009-0,109 [mm]. W próbce 3 rozmiar wtrąceń posiada zakres 0,013-0,579 [mm].



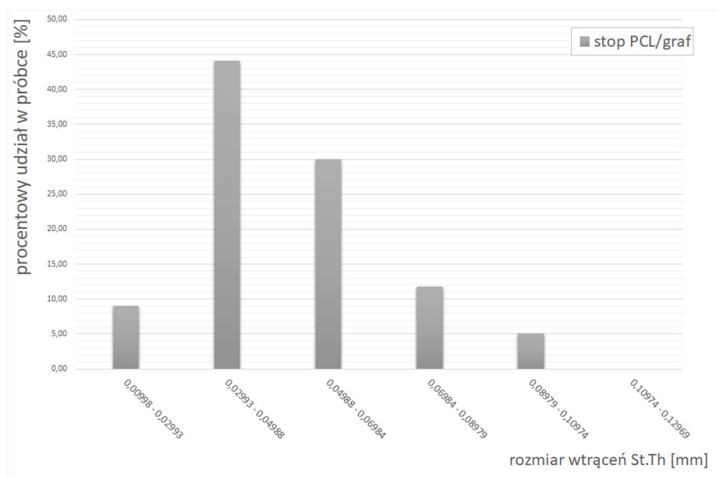
Rysunek 2. Przykładowa rekonstrukcja próbki filamentu w formie sztyftu PCL/graf, uzyskana z użyciem mikrotomografii komputerowej: A) przekroje próbki w płaszczyznach: czołowej, poprzecznej oraz strzałkowej; B) widok całej próbki; C-D) zdjęcia wtrąceń wypełniających sztyft PCL/graf



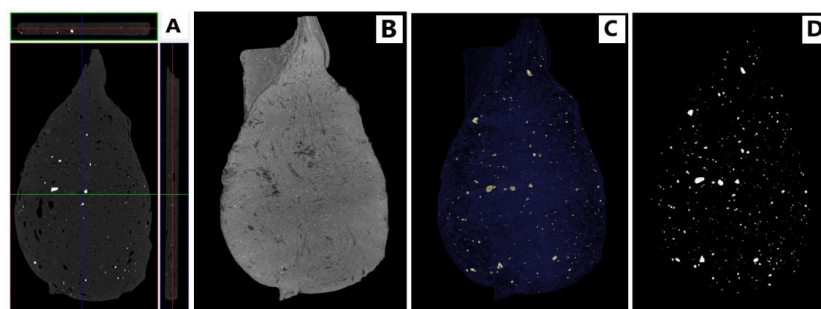
Rysunek 3. Procentowy udział wtrąceń grafenu w matrycy PCL, w próbce nr 1



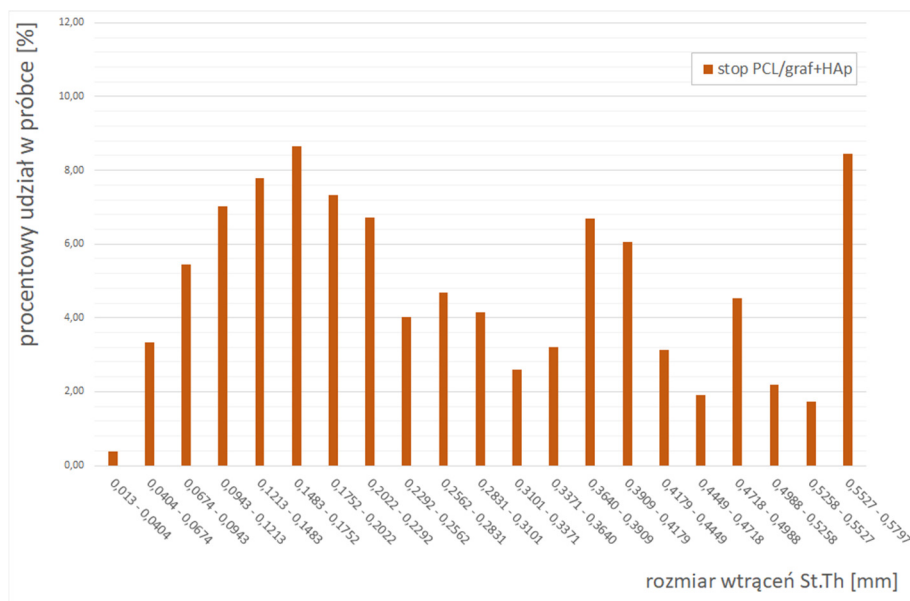
Rysunek 4. Przykładowa rekonstrukcja stopu mieszanki czystego granulatu i grafenu, uzyskana z użyciem mikrotomografii komputerowej: A) przekroje próbki w płaszczyznach: czołowej, poprzecznej oraz strzałkowej; B) widok z zewnątrz całej próbki; C-D) zdjęcia wtrąceń wypełniających stop PCL/graf



Rysunek 5. Procentowy udział wtrąceń grafenu w matrycy PCL, w próbce nr 2



Rysunek 6. Przykładowa rekonstrukcja stopu gotowego sztyftu PCL/graf i hydroksyapatytu, uzyskana z użyciem mikrotomografii komputerowej: A) przekroje próbki w płaszczyznach: czołowej, poprzecznej oraz strzałkowej; B) widok z zewnątrz całej próbki; C-D) zdjęcia wtrąceń wypełniających stop PCL/graf+HAP



Rysunek 7. Procentowy udział wtrąceń grafenu w matrycy PCL, w próbce nr 3

Analizując względem siebie otrzymane histogramy, przedstawiające procentowy udział wtrąceń grafenu w matrycy PCL, dla próbek 1 i 2 (szyftu PCL/graf oraz stopu PCL/graf) o określonej geometrii, można zaobserwować, że próbka 2 (stop PCL/graf) charakteryzuje się bardziej jednorodnym rozkładem, z punktu widzenia średniej wartości średnicy analizowanych wtrąceń. Rozmiar wtrąceń w próbce 2 zawiera się w przedziale 0,009-0,109 [mm], a aż 74% wszystkich wtrąceń posiada rozmiar z zakresu 0,029 -0,069 [mm]. W otrzymanych wynikach dla tej próbki wykazano również, całkowity brak wtrąceń o większej geometrii, powyżej 0,109 [mm].

#### 4. Wnioski

Z wstępnych badań przeprowadzonych przy wykorzystaniu mikrotomografii komputerowej wynika, że najbardziej jednorodny rozkład wtrąceń (dodatki) otrzymano dla stopu PCL/graf po wcześniejszym kilkietapowym procesie zmieszania i stopieniu składników w temperaturze 110°C. W oparciu o wstępne doświadczenia można wnioskować, że zaproponowany w ramach niniejszej pracy sposób przygotowania próbek do dalszych etapów przetwórstwa wtryskowego umożliwi otrzymywanie homogenicznych szyftów (filamentów do druku 3D), wykazujących jednorodny rozkład cząstek modyfikujących w osnowie polimeru. Niemniej jednak, aby móc potwierdzić efekty niniejszej pracy konieczne jest w ramach dalszych prac przygotowanie granulatu z wykonanych stopów oraz przeprowadzenie dodatkowych badań  $\mu$ CT na kształtkach otrzymanych przy wykorzystaniu wtryskarki.



Otrzymanie jednorodnego rozkładu wtrąceń w kształtkach/sztyftach otrzymywanych metodą wtrysku ma istotne znaczenie dla właściwości fizykochemicznych otrzymywanych z nich w następnym etapie (metodą druku 3D) biomateriałów.

## LITERATURA

1. CASTELLS-SALA C., ALEMANY-RIBES M., FERNÁNDEZ-MUIÑOS T., RECHA-SANCHO L., LÓPEZ-CHICÓN P., ALOYREVERTÉ C., CABALLERO-CAMINO J., MÁRQUEZ-GIL A., SEMINO C. E.: Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. *Biochips & Tissue chips* S2 (2012), 1-14.
2. KRUK A., GADOMSKA-GAJADHUR A., SEBAI A., RUSKOWSKI P.: Rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej. *Wyroby Medyczne* (2017)4, 31-35.
3. MATHEW P., AUGUSTINE R., KALARIKKAL N., THOMAS S.: Tissue engineering: principles, recent trends and the future ansuja. *Nanomedicine and Tissue Engineering*, Chapter (2016), 31-82.
4. CHOCHOLATA P., KULDA V., BABUSKA V.: Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* (2019); 12; 568: 1-25.
5. AL-HIMDANI S., JESSOP Z. M., AL-SABAH A, COMBELLACK E., IBRAHIM A., DOAK S. H., HART A. M., ARCHER C. W., THORNTON C. A., WHITAKER I. S.: Tissue-engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery. *Frontiers in Surgery* 4(2017)4, 1-14.
6. ANDRZEJEWSKA A., TOPOLIŃSKI T.: Polimery biodegradowalne do zastosowań biomedycznych. *Postępy w inżynierii mechanicznej* 6(2015)3, 5-12.
7. GADOMSKA-GAJADHUR A., ŁOJEK K., SZYMANIAK M., GADOMSKA A.: Materiały porowate do regeneracji tkanki kostnej i chrzęstnej. *Wyroby Medyczne* (2018)3, 51-58.
8. DZIADEK M., CHOLEWA-KOWALSKA K.: Wybrane metody otrzymywania porowatych rusztowań w inżynierii tkankowej. *Inżynieria Biomedyczna* 20(2014)4, 193-202.
9. SULTANA N., KHAN T. H.: Polycaprolactone Scaffolds and Hydroxyapatite/Polycaprolactone Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Bionanoscience* (2013).
10. HAIDER A., HAIDER S., KANG I.: A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* (2018)11, 1165-1188.
11. NAZEER M. A., YILGOR E., YILGOR I.: Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer* (2019)168, 86-94.
12. HASHIMDEEN S. H., THOROGATE R., MIODOWNIK M., EDIRISINGHE M. J.: Fabrication of bespoke nasal septal scaffolds. *Materials and Design* (2016)90, 403-409.
13. KLIMEK K., ŚWIĘTEK M., BŁAŻEWICZ M., GINALSKA G.: Ocena *in vitro* cytotoksyczności nanokompozytu PCL/HAp jako rusztowania dla inżynierii tkankowej. *Inżynieria Biomateriałów* 128-129(2014), 50-53.

14. SHAREENA T. P. D., MCSHAN D., DASMAHAPATRA A. K., TCHOUNWOU P. B.: A Review on Graphene-Based Nanomaterials in Biomedical Applications and Risks in Environment and Health. *Nano-Micro Lett.* 10(2018)53, 1-34.
15. RICHARDS D. J., TAN Y., JIA J., YAO H., MEI Y.: 3D Printing for Tissue Engineering. *Isr J Chem.* 2013 Oct 1; 53(9-10): 805–814.
16. STODULSKA U., KRUK A., RUŚKOWSKI P., GADOMSKA-GAJADHUR A.: Otrzymywanie polimerowych rusztowań komórkowych. *Wyroby Medyczne* (2018), 1: 38-40.
17. LASKA-LEŚNIEWICZ A.: Wykorzystanie metod szybkiego prototypowania (rapid prototyping) w nowoczesnej medycynie. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe* (2017) (2)15: 39-48.
18. TURNBULL G., CLARKE J., PICARD F., RICHES P., JIA L., HAN F., LI B., SHU W.: 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* (2018) 3: 278-314.
19. CHIA H. N., WU B. M.: Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering* (2015) 9(4): 1-14.
20. BOSE S., VAHABZADEH S., BANDYOPADHYAY A.: Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, 16(2013)12, 496-504.