

## DEGRADACJA WĘGLOWYCH NANOKOMPOZYTÓW WŁÓKNISTYCH (SFC+NHAP) W OSNOWIE RESORBOWALNEGO POLIMERU PL(L/DL)A – BADANIA WSTĘPNE

EWA STODOLAK<sup>1</sup>, WIOLETTA RYZNER<sup>1</sup>, BARBARA CZAJKOWSKA<sup>2</sup>, MARTA BŁAŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

<sup>2</sup>UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM,

UL. CZYSTA 2, 30-057 KRAKÓW

E-MAIL: STODOLAK@AGH.EDU.PL

### Streszczenie

*W pracy zbadano: wpływ fazy włóknistej na osnowę resorbownego polimeru i biogodność tak otrzymanego materiału kompozytowego. Oceniono zmiany fizykochemiczne powierzchni wywołane wprowadzonym materiałem włóknistym oraz szybkość degradacji kompozytu w warunkach in vitro. Fazę włóknistą stanowiły włókna węglowe modyfikowane nanocząstkami hydroksyapatytu (nHAp). Badania wskazały, że wprowadzenie biogodnych włókien węglowych w matrycę polimerową poprawia przeżywalność osteoblastów (test MTT), a dodatkowa modyfikacja cząstkami nHAp aktywuje komórki kostne do wydzielania kolagenu typu I (ELISA). Naświetlanie promieniowaniem UV nie wpływa na trwałość materiału w warunkach in vitro (woda/37°C/3 miesiące), a jednocześnie obniża parametry mechaniczne kompozytu (wytrzymałość, moduł sprężystości). Proces ten wpływa również na zmiany powierzchniowe materiału obserwowane w postaci: wzrostu zwilżalności powierzchni i zmiany mikrostruktury powierzchni (SEM).*

**Słowa kluczowe:** kompozyty włókniste, nanokompozyty, degradacja polimerów, biogodność [Inżynieria Biomateriałów, 61, (2007), 12-16]

### Wprowadzenie

Biogodność, właściwości mechaniczne materiału w połączeniu z jego kontrolowanym czasem degradacji są jednym z podstawowych warunków decydujących o potencjalnych możliwościach zastosowania materiału jako tworzywa implantacyjnego [1]. W grupie materiałów

## DEGRADATION OF FIBROUS CARBON NANOCOMPOSITES (SFC+NHAP) IN RESORBABLE POLYMER PL(L/LD)A MATRIX – PRELIMINARY STUDIES

EWA STODOLAK<sup>1</sup>, WIOLETTA RYZNER<sup>1</sup>, BARBARA CZAJKOWSKA<sup>2</sup>, MARTA BŁAŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,

FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH-UST, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY,

COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY,

ST. CZYSTA 2, 30-057 KRAKOW, POLAND

E-MAIL: STODOLAK@AGH.EDU.PL

### Abstract

*The aim of the work was investigation of the influence of a fibrous phase on a resorbable polymer matrix and biocompatibility of such manufactured composite. Physicochemical changes of the surface induced by the introduced fibrous material and the degradation rate of the composite in in vivo conditions were evaluated. The fibrous phase was composed of carbon fibers modified with hydroxyapatite nanoparticles (nHAp). Investigations showed, that introduction of the biocompatible carbon fibers into the polymer matrix improves osteoblasts viability (MTT test), and additional modification with n-HAp particles activates bone-tissue cells to secretion of I-type collagen (ELISA). UV irradiation does not influence stability of the material in in vitro conditions (water/37°C/3 months), but it reduces mechanical properties of the composite (strength, Young's modulus). This process also influences the composite's surface properties, which can be observed in increase of the surface wettability and changes in the surface microstructure (SEM).*

**Keywords:** fibrous composite, nanocomposite, polymer degradation, bioactivity [Engineering of Biomaterials, 61, (2007), 12-16]

### Introduction

Biocompatibility, mechanical properties, and controlled time of degradation are the basic properties of material, which enable its application in implantation [1]. This features can be controlled in composites which are very promising materials for implantation. Incorporate of a second phase (fibers, particles) into a polymer matrix should lead not only

cechujących się najbardziej obiecującymi właściwościami są materiały kompozytowe. Wprowadzenie do osnowy polimerowej drugiej z faz (włókna, cząstki) ma na celu nie tylko zmodyfikowanie anizotropii właściwości mechanicznych, poprawę biogodności, ale modyfikacja taka powinna równocześnie stwarzać możliwość przerastania regenerującą się tkanką w warunkach *in vitro*, aby po jej całkowitej odbudowie zaniknąć. Otrzymanie kompozytowych materiałów o kontrolowanym czasie działania jest możliwe dzięki zastosowaniu polimerów resorbowalnych i biodegradowalnych. Wprowadzenie do resorbowalnej osnowy polimerowej fazy włóknistej daje możliwość modelowania parametrów mechanicznych (w zależności od typu włókna, sposobu jego ułożenia), fizykochemicznych i biologicznych (uzależnione od parametrów powierzchni). Jeśli dodatkowo fazę włóknistą zmodyfikuje się nanocząstką ceramiczną np. hydroksyapatytem to zyska ona zdolność do bioaktywności i polepszy połączenie na linii tkanka – implanty [2, 3]. Jeśli do bioaktywnego materiału dodać znajomość procesu degradacji to liczba potencjalnych zastosowań kompozytu jako biomateriału implantacyjnego rośnie (potencjalne zastosowania: chirurgia twarzo-czaszki, stomatologia, chirurgia kostna, inżynieria tkankowa) [4].

## Materiały i metody

Materiały kompozytowe wytworzono z resorbowalnego polimeru poli(L-laktyd-co-D,L-laktydu) o stosunku merów 80:20 i masie cząsteczkowej  $M_w$  200.000 Da (Boehringer Ingelheim, Germany). Polimerową osnowę modyfikowano nanokompozytowymi włóknami węglowymi zawierającymi 3% wag. nanohydroksyapatytu (Katedra Ceramiki Specjalnej WiMIC, AGH). Prekursorem włókien węglowych były organiczne włókna poliakrylonitrylowe (PAN) wytworzone w Katedrze Włókien Sztucznych, na Wydziale Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej. Włókna PAN poddano procesowi obróbki termicznej, który obejmował dwa etapy: stabilizację (280°C) i karbonizację (1000°C). Zastosowano roztwór polimeru o stosunku 1:30 (rozpuszczalnik  $CH_2Cl_2$ , POCh Gliwice). Do roztworu polimeru wprowadzano naważkę krótkich włókien węglowych (o długości 50 - 200  $\mu m$  i średnicy ok. 10  $\mu m$ ). Tak otrzymaną mieszaninę pozostawiono do odparowania na powietrzu (24h/temp. pokojowa), a następnie w próżni (24h/temp. 30°C). Tą drogą otrzymano dwa rodzaje próbek: kompozyt PL(L/DL)A z SFC+HAp oznaczony jako KHAp, i folię PL(L/DL)A oznaczoną jako P. Tak otrzymane materiały poddano dodatkowo naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym ( $\lambda = 342$  nm) przez 48h. W ten sposób otrzymano: kompozyt – KHApUV i folię polimerową PUV.

Badania biologiczne wytworzonych materiałów wykonano na linii osteoblastopodobnych komórek hFOB 1.19 i linii fibroblastopodobnych komórek HS-5. Hodowle przeprowadzano w inkubatorze w atmosferze: 5%  $CO_2$  / 95% powietrze, temp. 37°C (fibroblasty) lub 34°C (osteoblasty) przez 7 dni. Żywołność komórek oznaczono metodą wykorzystującą metabolizm barwnika MTT w mitochondriach (aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej). Oznaczenie stężenia kolagenu typu I produkowanego przez osteoblasty i fibroblasty oznaczono przy pomocy testu ELISA po 4 dniach inkubacji.

Zbadano degradację otrzymanych materiałów wyjściowych i poddanych obróbce UV, a następnie inkubowanych w wodzie (37°C/3 miesiące). Mikrostrukturę kompozytów po inkubacji (37°C/7 dni/SBF) oceniano na podstawie obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM JSM – 5400, Joel). Charakterystykę stanu powierzchni badanych materiałów (na każdym z etapów doświadczenia) dokonano metodą pomiaru kąta zwilżenia, używając aparatu DSA 10

to modification of anisotropy of its mechanical properties, and improvement of its biocompatibility, but besides it should allow ingrowth of the regenerating tissue in *in vitro* conditions and disappear after its full recovery. Production of composite materials with controlled operating time is possible due to application of bioresorbable and biodegradable polymers. Introduction of a fibrous phase into a bioresorbable polymer matrix makes possible modification of material's mechanical properties (controlled by the fiber type and arrangement), as well as its physicochemical and biological properties (related to the surface properties). Additional modifications of the fibrous phase with ceramic nanoparticles e.g. hydroxyapatite enhance its bioactivity and improves join between tissue and an implant [2,3]. Well-described bioactivity of a given composite material, together with thorough information about its degradation process enables potential application of the composite as an implant material in such fields as: maxillofacial surgery, stomatology, bone surgery, tissue engineering [4].

## Materials and methods

Composite materials were produced from resorbable polymer poly(L-lactide-co-D,L-lactide) with 80:20 mer ratio, and molecular weight ( $M_w$ ) 200.00 Da (Boehringer Ingelheim). The polymer matrix was modified with nanocomposite carbon fibers containing 3 wt. % nanohydroxyapatite (AGH-University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Special Ceramics, Krakow, Poland). The carbon fibers were produced from organic, polyacrylonitrilic (PAN) fibers (Institute of Man Made Fibers, Faculty of Textile Engineering and Marketing, Technical University of Lodz, Poland). During two-staged heat-treatment process, the PAN fibers were stabilized (280°C) and then carbonized (1000°C). The polymer to solvent ( $CH_2Cl_2$ , POCh) ratio was 1:30. The required, weighted amount of short carbon fibers (length 50 – 200  $\mu m$ , diameter 10  $\mu m$ ) was introduced into the polymer solution. The mixture was left for evaporation, first in air atmosphere at room temperature (24h), and then in vacuum at 30°C (24h). As a result two kinds of samples were produced: PL(L/DL) with SFC + n-Hap composite (KHAp), and PL(L/DL)A foil (P). The samples were UV-irradiated ( $\lambda = 342$  nm) for 48h, and such treated samples are named consequently KHApUV and PUV. Biological investigations of the materials were performed at osteoblast-like cells hFOB 1.19 line, and fibroblast-like cells HS-5 line. The cell cultures were kept in an incubator in 5%  $CO_2$  / 95% air atmosphere, at 37°C (fibroblasts) or 34°C (osteoblasts) for 7 days. Cell viability was determined using a method based on the metabolism of MTT dye (activity of mitochondrial dehydrogenase). Concentration of collagen type I for both cell lines (osteoblasts and fibroblasts) were determined using the ELISA test after 4 days of incubation. Degradation of the initial materials and UV-irradiated materials was investigated during incubated in water (37°C/3 months). Microstructure of the composites after incubation (37°C/7 days/SBF) was observed using scanning electron microscope (SEM JSM – 5400, Jeol). Surface of the initial materials and UV-irradiated materials incubated in *in vitro* conditions (at all stages of the experiment) was characterized by the wetting angle measurement (DSA 10, Kruss). Stability of mechanical properties of the composite and the foil was tested (water/37°C/3 months). Tensile strength of the materials was determined using universal testing machine (ZWICK 1435).

Kruss (Niemcy). Badaniu poddano próbki wyjściowe, a także poddane obróbce UV, a następnie inkubowane w warunkach *in vitro*. Badania wytrzymałości na rozciąganie materiałów wykonano na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej ZWICK 1435 (Niemcy).

## Wyniki i dyskusja

### Badania biologiczne

Badania komórkowe wykazały, że otrzymane materiały kompozytowe są materiałami biozgodnymi. Wprowadzenie w osnowę polimeru włóknistej fazy zawierającej nanocząstki HAp powoduje poprawę przeżywalności osteoblastów i fibroblastów w stosunku do samego polimeru (RYS.1). Aktywność sekrecyjna komórek kostnych (produkcja kolagenu typu I) jest największa na powierzchni materiału KHAp (wyższa niż aktywność osteoblastów na powierzchni kompozytu z włóknem węglowym bez udziału fazy ceramicznej, RYS.2).

### SEM/EDS

Gładka powierzchnia folii polimerowej P ulega lekkiemu sfałdowaniu po inkubacji w wodzie przez okres 3 miesięcy (37°C, RYS.3a). Ten sam efekt: wzrost chropowatości powierzchni polimeru, obserwuje się na folii polimerowej naświetlanej promieniami UV (PUV), a następnie inkubowanej przez 3 miesiące (RYS.4a). Wprowadzenie do osnowy polimerowej włókien węglowych z nanoHAp (KHAp) modyfikuje gładką dotąd powierzchnię folii nadając jej kształt oddający mikrostrukturę włókien (RYS.3b). Degradacja powierzchni kompozytu (nieregularności, wzrost chropowatości, spękania) jest znacznie silniejsza w przypadku kompozytu poddanego wcześniej działaniu UV (KHAp UV, RYS.4b).

### Badania powierzchni

Inkubacja porównawcza dwóch folii polimerowych: wyjściowej (P) i folii dodatkowo poddanej naświetlaniu promieniowaniem UV (PUV) wykazała, że największy spadek kąta zwilżania (większą hydrofilowość) obserwuje się na powierzchni folii polimerowej niemodyfikowanej (P) (RYS.5). Brak zmian zwilżalności powierzchni dla folii (PUV) jest prawdopodobnie wynikiem zahamowania procesu degradacji (lub zmianą jej mechanizmu: z degradacji powierzchniowej na degradację w masie). W przypadku kompozytów z włóknem węglowym (KHAp, KHAp UV) zmiany zwilżalności powierzchni są niewielkie i niezależne od modyfikacji powierzchni promieniowaniem UV i wynikają ze wzrostu chropowatości powierzchni materiałów kompozytowych.

### Badania mechaniczne

Dodatek włókien węglowych do osnowy polimerowej nie wpływa na poprawę parametrów mechanicznych materiału (odkształcenie, moduł Younga, wytrzymałość). Dobry udział objętościowy włókien (3% wag.) osłabia strukturę kompozytu. Włókna węglowe działają tu jako faza osłabiająca (defektująca) materiał. Inkubacja kompozytu (KHAp) dodatkowo wpływa na obniżenie wytrzymałości materiału (RYS.6). Nie odnotowano zmian wytrzymałości dla inkubowanej folii polimerowej (P).

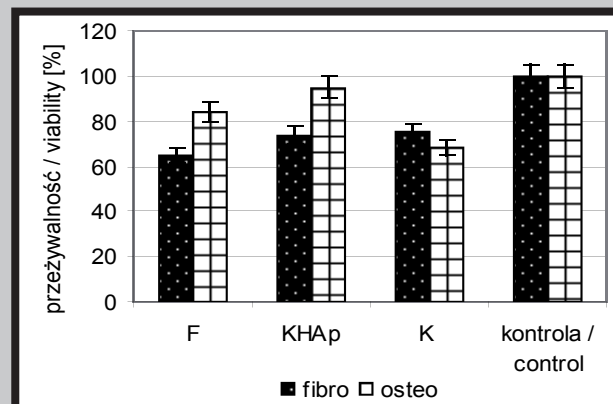
## Wnioski

Wprowadzenie włókien węglowych modyfikowanych nanocząstkami hydroksyapatytu do osnowy resorbowalnego polimeru powoduje:

- zmianę jego parametrów powierzchniowych: włókna obniżają wartość kąta zwilżania (powierzchnia materiału staje się bardziej hydrofilowa),
- zmianę topografii powierzchni (wzrasta chropowatość),

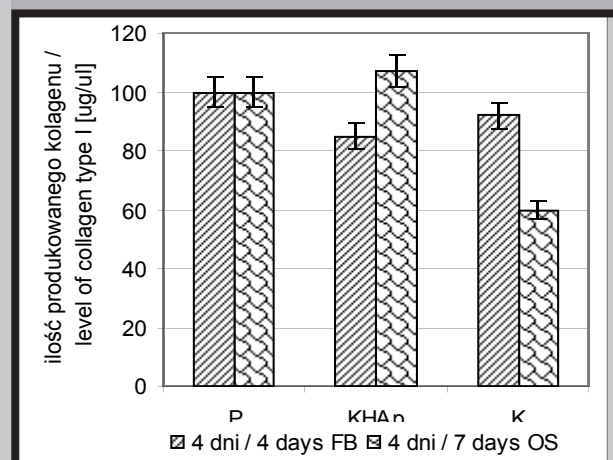
## Results

### Biological investigations



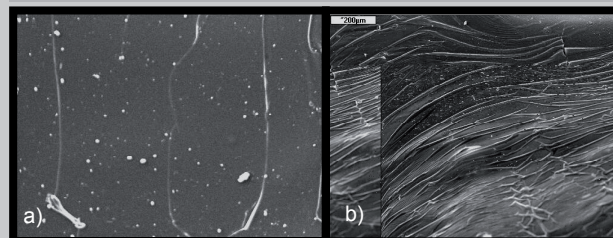
RYS. 1. Przeżywalność komórek kontaktowanych z powierzchnią materiału badanego: P - folia polimerowa, K - kompozyt z włóknem węglowym, KHAp - kompozyt z włóknem węglowym modyfikowanym nanoHAp.

FIG. 1. Cell viability contacted with materials after 7 days: pure polymer foil (P), composites materials reinforced short carbon fibres (K), composites materials with nanohydroxyapatite (KHAp).



RYS. 2. Poziom kolagenu typu I po 4 dniach inkubacji z materiałem badanym: P - folia polimerowa, KHAp - kompozyt z włóknem węglowym modyfikowanym HAp, K - kompozyt z włóknem węglowym.

FIG. 2. Level of collagen type I produced by osteoblasts and fibroblasts after 4 days incubation with cells: P - pure polymer foil, K - composites materials reinforced short carbon fibres, KHAp - composites materials with nanohydroxyapatite.



RYS. 3. Folia polimerowa (P) po 3 miesiącach inkubacji (3-a), kompozyt (KHAp) po 3 miesiącach inkubacji w warunkach *in vitro* (woda/37°C/3 miesiące) (3-b).

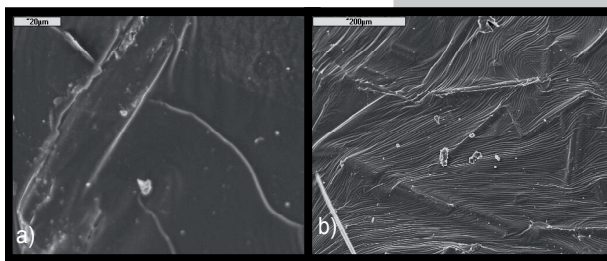
FIG. 3. Pure polymer foil (P) (3-a), and samples of composite (KHAp) after 3 months degradation *in vitro* condition (water/37°C) (3-b).



- poprawę biogodności materiału

Obecność włókien z nanododatkiem wpływa na trwałość materiału polimerowego - szybsza degradacja kompozytu w porównaniu z folią polimerową.

Naświetlanie promieniowaniem UV może prowadzić do zahamowania procesu degradacji zarówno materiału polimerowego jak i materiału kompozytowego.



**RYS. 4. Powierzchnia folii polimerowej modyfikowanej UV (PUV) po inkubacji w warunkach in vitro (4-a), mikrostruktura kompozytu z włóknem węglowym (z nanododatkiem HAp) po naświetleniu promieniowaniem UV (KHAp UV) i 3 miesięcznej inkubacji w warunkach in vitro (4-b).**

**FIG. 4. Microstructure of surface modified UV: pure polymer foil (PUV) (4-a) and composites with nano-Hap (KHAp UV) (4-b) after 3-months incubation (in vitro condition).**

The cell tests indicated that the produced composite materials are biocompatible. Incorporation of the fibrous phase containing HAp nano-particles into the polymer matrix leads to better osteoblasts and fibroblasts viability comparing with the pure polymer (FIG.1). The production of collagen type-I produce of bone-tissue cells is the highest at KHAp surface. The activity of cells is low than of a composite with carbon fibers but without a ceramic phase (FIG.2).

#### SEM/EDS studies

A smooth surface of the polymer foil (P) undergoes a slight creasing after the incubation in water for three months (37°C, FIG.3a). The same effect of the increase in the polymer surface roughness can be observed in case of the UV-

irradiated polymer foil (PUV) after three-month incubation (FIG.4a). Introduction the carbon fibers containing n-HAp (KHAp) modifies the smooth surface of the foil, and as a result, it imitates the fibers microstructure (FIG.3b). Degradation of the composite surface (irregularities, roughness increase, cracks) is stronger in case of the UV-irradiated composite (KHApUV) (FIG.4b).

#### Surface investigations

Comparative incubation of the two polymer foils: initial (P), and UV-irradiated (PUV) indicates, that the largest drop in the wetting angle value (higher hydrophilicity) is observed in case of the initial polymer foil surface (P) (FIG.5). Invariable wettability of the PUV foil surface most probably is caused by the inhibition of degradation process, or changes in the process mechanism: from surface to bulk degradation. In case of the composites with carbon fibers (KHAp, KHAp UV), changes in the surface wettability are rather small and independent from the surface modification with UV-irradiation, and they are caused by increase in the surface roughness.

#### Mechanical tests

Addition of carbon fibers into the polymer matrix does not improve mechanical properties of the material (strain, Young's modulus, strength). The chosen volume fraction of fibers (3% wg.) weakens the composite structure. The carbon fibers act here as a weakening (defects-introducing) phase. The incubation of the composite (KHAp) additionally reduces its strength (FIG.6). Changes in the incubated polymer foil (P) strength were not observed.

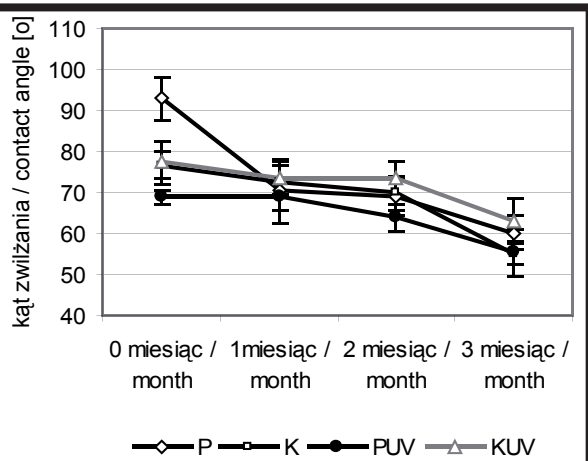
#### Conclusions

Introduction of the carbon fibers modified with HAp nano-particles into the bioresorbable polymer matrix causes:

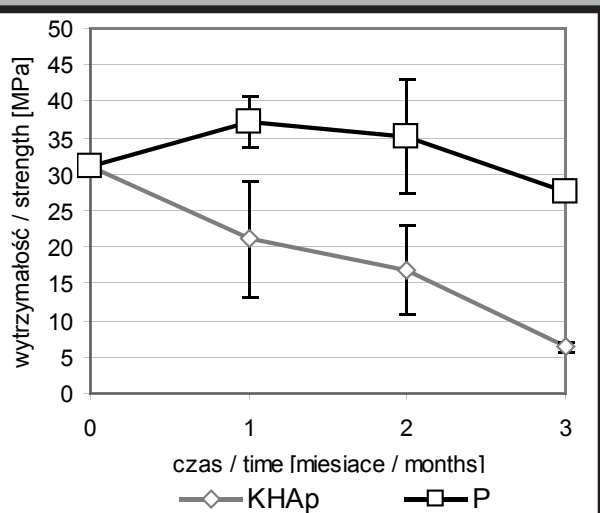
- changes in its surface characteristics i.e. fibers reduce value of the wetting angle (the surface becomes more hydrophilic)
- change in the surface topography (the surface roughness increases)
- improvement of the material biocompatibility

Presence of the fibers containing nano-particles influences stability of the polymer material i.e. faster degradation of the composite material comparing with the polymer foil.

UV-irradiation may lead to inhibition of the degradation process of both, the polymer and the composite material.



**RYS. 5. Zmiany kąta zwilżania materiałów kompozytowych i polimerowych w trakcie inkubacji w warunkach in vitro (woda/37°C/3 miesiące).**  
**FIG. 5. Changing of contact angle for composites materials and polymer foil (in vitro condition: water/37°C/3 months).**



**RYS. 6. Zmiana wytrzymałości folii polimerowej (P) i kompozytu (KHAp) z włóknem węglowym modyfikowanym HAp w trakcie inkubacji w warunkach in vitro.**  
**FIG. 6. Changing strength of polymer foil (P) and composite material modified by bioactive carbon fibres (KHAp) during incubation in in vitro conditions (37°C/water/3 months).**

*Praca finansowana przez AGH, badania statutowe nr 11.11.160.367.*

*This study was supported by AGH-UST, statute investigation No 11.11.160.367.*

## Piśmiennictwo

- [1] Ying-Ying Shangguana, Ya-Wu Wang, Qiong Wua, Guo-Qiang Chena: The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), *Biomaterials* 27 (2006) 2349–2357.
- [2] Taizo Furukawa, Yoshitaka Matsusue, Tsunoru Yasunaga, Yasuo Shikinami, Masaki Okuno, Takashi Nakamura: Biodegradation behavior of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly (L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures, *Biomaterials* 21 (2000) 889–898.

## References

- [3] Yun Hui Leea, Jong Hoon Leea, In-Gu Ana, Chan Kimb, Doo Sung Leea, Young Kwan Leec, Jae-Do Nama: Electrospun dual-porosity structure and biodegradation morphology of Montmorillonite reinforced PLLA nanocomposite scaffolds, *Biomaterials* 26 (2005) 3165–3172.
- [4] D. Żuchowska, R. Steller: *Modyfikacja polimerów-praca zbiorowa*; Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2005.