

In vitro enzimska razgradnja poli(ϵ -kaprolaktona) i PCL/GEL mješavine za biomedicinsku primjenu

Roko Blažić, Antonia Ressler, Denis Žagar

SAŽETAK

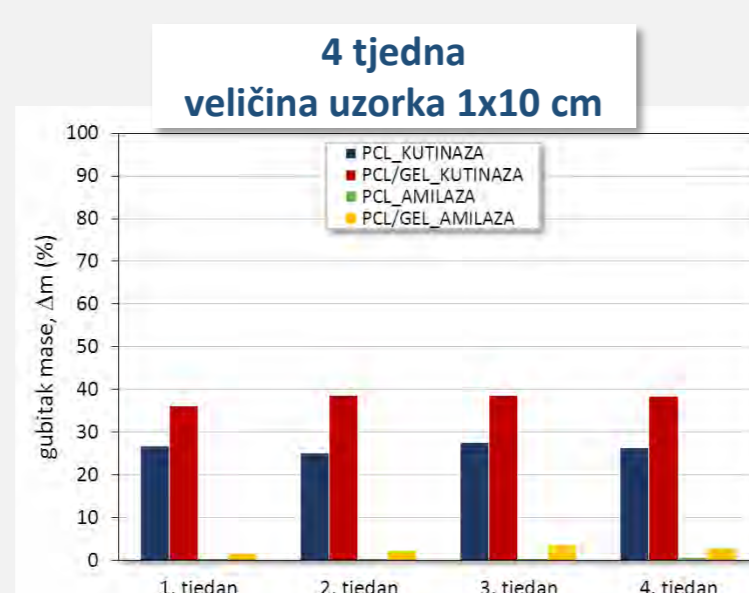
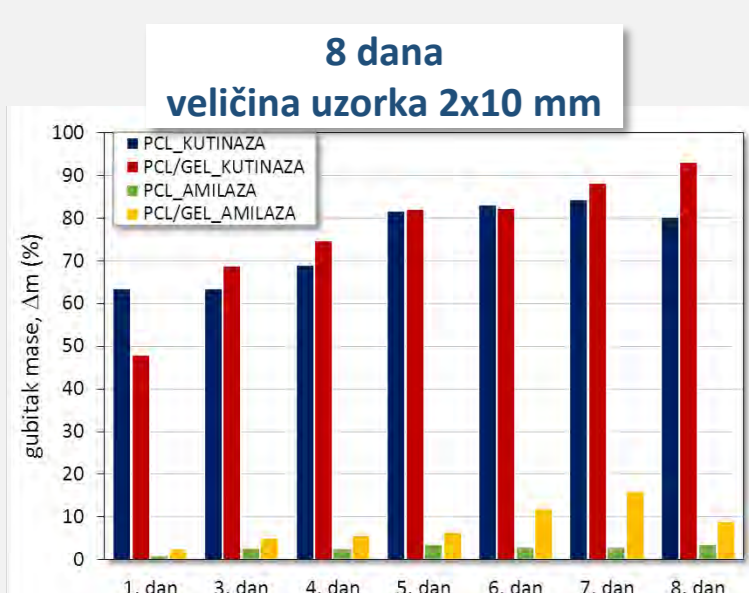
Razgradnja implantiranih materijala u ortopedskom inženjerstvu tkiva od iznimne je važnosti jer otklanja potrebu uklanjanja implantata u drugom kirurškom zahvatu, te osigurava prostor za rast prirodnog tkiva. Stoga je razgradnja potrebno postići brzinom koja omogućuje regeneraciju prirodnog tkiva na mjestu oštećenja. U međuvremenu, djelomično razgrađeni nosači (*scaffolds*) moraju održavati njihovu mehaničku cjelovitost, dok novoformirano tkivo ne preuzme funkciju i potpuno ih zamijeni.

Najistaknutija skupina biorazgradivih materijala su alifatski poliesteri, jer su se pokazali korisnima za niz biomedicinskih primjena kao na primjer za fiksaciju kostiju nakon loma (vijci, pločice, igle), izradu dentalnih implantata, prekrivanje rana (umjetna koža), zatvaranje rana (šavovi, kirurške spojnice).

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) sintetski je polimer koji se istražuje za potencijalnu primjenu u medicini. Prednost u korištenju PCL-a u inženjerstvu tkiva je biostabilnost i mehanička svojstva koja osiguravaju dugoročnu prisutnost i elastičnost. PCL izaziva blagi upalni proces, a adhezija i rast stanica je ograničena zbog njegove hidrofobnosti. Osim toga, PCL polimer se sporo razgrađuje.

Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj proteinske komponente želatine na brzinu enzimsku razgradnju poli(ϵ -kaprolaktona) kako bi se dobio materijal zadovoljavajućih svojstava, definirane brzine razgradnje koji bi mogao naći primjenu za izradu elemenata za fiksaciju koštano tkiva. U ovom radu istražen je utjecaj enzima kutinaze i α -amilaze na brzinu razgradnje PCL polimera i mješavine PCL polimera sa želatinom (PCL/GEL).

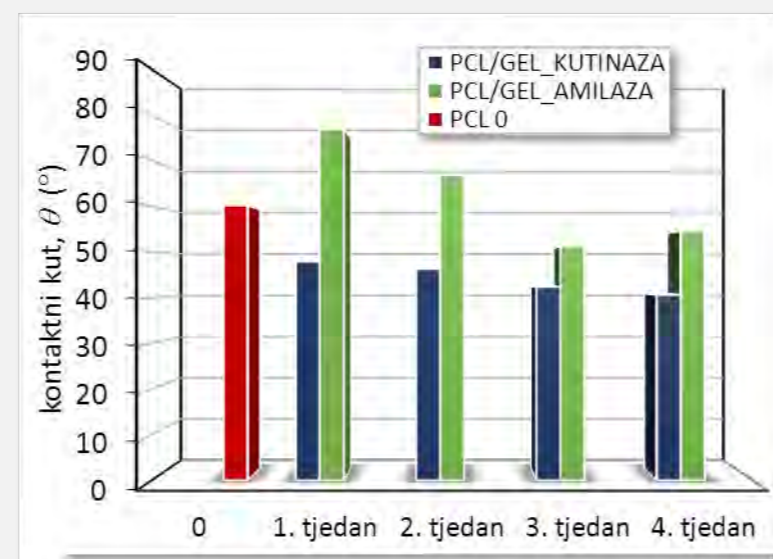
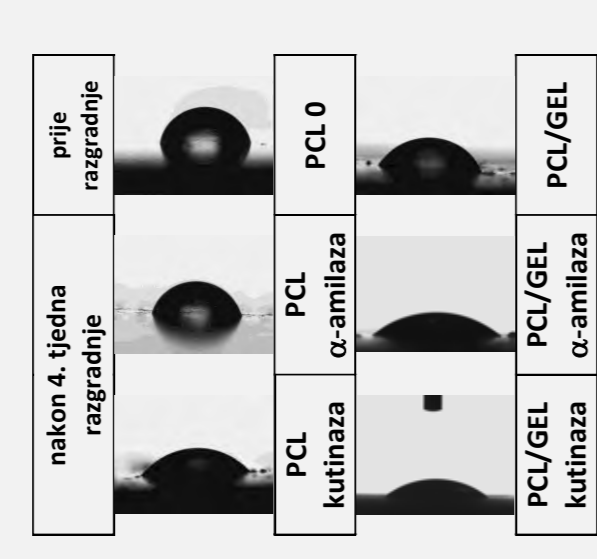
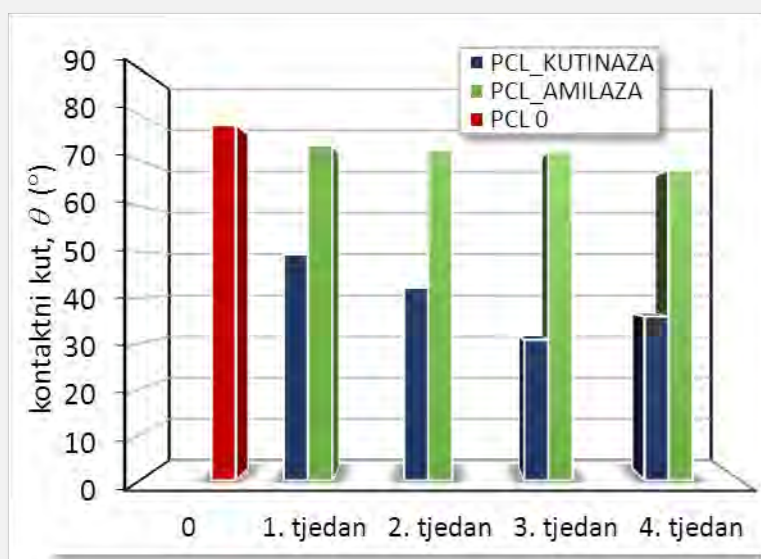
GUBITAK MASE



- veći gubitak mase u PBS otopini s enzimom kutinaze osobito kod uzoraka PCL/GEL
- u 1. tjednu vidljiv najveći gubitak mase a nakon toga nema značajne promjene
- gubitak mase PCL i PCL/GEL uzoraka manji je u odnosu na uzorke manjih dimenzija

- PCL/GEL – veći gubitak mase – posljedica je bubrenja gela i razgradnje u unutrašnjosti materijala
- značajan gubitak mase u PBS otopini s enzimom kutinaze - ukazuje na veću brzinu razgradnje

KONTAKTNI KUT S VODOM



- PCL - hidrofoban karakter površine
- u PBS otopini kutinaze - sniženje θ_{H_2O} s porastom vremena razgradnje - porast hidrofilitnosti površine
- u PBS otopini α -amilaze - neznatno sniženje θ_{H_2O} tijekom 4 tjedna razgradnje

- PCL/GEL - hidrofilan karakter površine
- u PBS otopini kutinaze - sniženje θ_{H_2O} s porastom vremena razgradnje - porast hidrofilitnosti površine
- u PBS otopini α -amilaze - porast θ_{H_2O} tijekom 1. i 2. tjedna – hidrofoban karakter, a u 3. i 4. tjednu – porast hidrofilitnosti

SLOBODNA POVRŠINSKA ENERGIJA

uzorak	Owens-Wendt			Wu		
	γ^d (mJ m^{-2})	γ^p (mJ m^{-2})	γ (mJ m^{-2})	γ^d (mJ m^{-2})	γ^p (mJ m^{-2})	γ (mJ m^{-2})
PCL	35,40	0,31	35,41	36,39	1,24	37,63
GEL	41,63	2,11	43,74	42,00	4,28	46,28

- PCL - niža γ i nepolarni karakter površine, posljedica je nepolarne prirode PCL-a
- GEL - viša γ i polarni karakter površine, posljedica je prisutnosti polarnih skupina u želatini (aminokiseline)

PARAMETRI ADHEZIJE

Sustav	γ_{S1} (mJ m^{-2})	W_s (mJ m^{-2})	S_{S1} (mJ m^{-2})
PCL/GEL	1,01	78,10	7,36

- niska vrijednost γ_{S1} ukazuje na značajne interakcije na međupovršini PCL/GEL
- pozitivna vrijednost koeficijenta razlijevanja, S_{S1} ukazuje na dobro močenje GEL faze PCL fazom

ZAKLJUČCI

- promjena mase uzoraka ukazuje na značajne razlike u mehanizmima razgradnje PCL i PCL/GEL mješavine s enzimima kutinaze i α -amilaze
- FTIR-ATR spektroskopijom potvrđene su značajne promjene u strukturi nastale enzimskom razgradnjom u PBS otopini s kutinazom
- peptidne veze ukazuju na prisutnost enzima na površini PCL-a i PCL/GEL mješavine, što ukazuje na vezivanje enzima za površinu
- promjena molekularne mase ukazuje na površinsku razgradnju PCL polimera i PCL/GEL mješavine, erozijom površine
- parametri adhezije pokazuju dobre interakcije između PCL polimera i želatine (GEL)
- porast hidrofilitnosti potvrđuje značajne promjene na površini PCL polimera i mješavine PCL/GEL nakon enzimsku razgradnje kutinazom i α -amilazom
- podatak želatine značajno utječe na mehanizam i brzinu razgradnje PCL polimera
- istraživani materijali pokazuju obećavajuće rezultate za dobivanje biorazgradivog materijala kontroliranog vremena razgradnje za primjenu u fiksaciji koštano tkiva

EKSPERIMENTALNI DIO

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)

- Capa 6800, Perstorp, UK - linearni poliestar visoke molekularne mase, kompatibilan s velikim brojem termoplasta, topljiv u uobičajenim otapalima

Želatina (GEL)

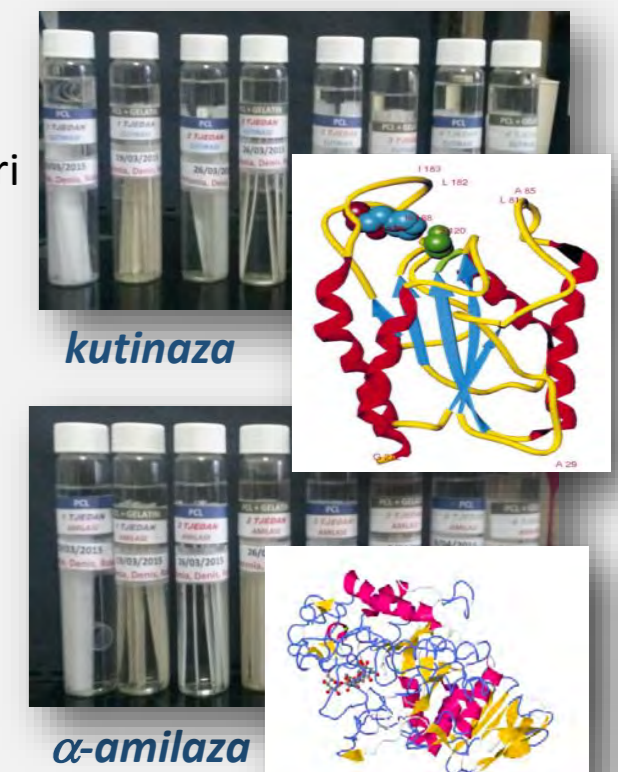
- G1890 Gelatin dobivena iz svinjske kože, čvrstoće gela ~300 g Bloom, Tip A koji se koristi kao bioreagens, te za elektroforezu i za kulturu stanica, proizvođača Sigma Aldrich

Priprava uzoraka

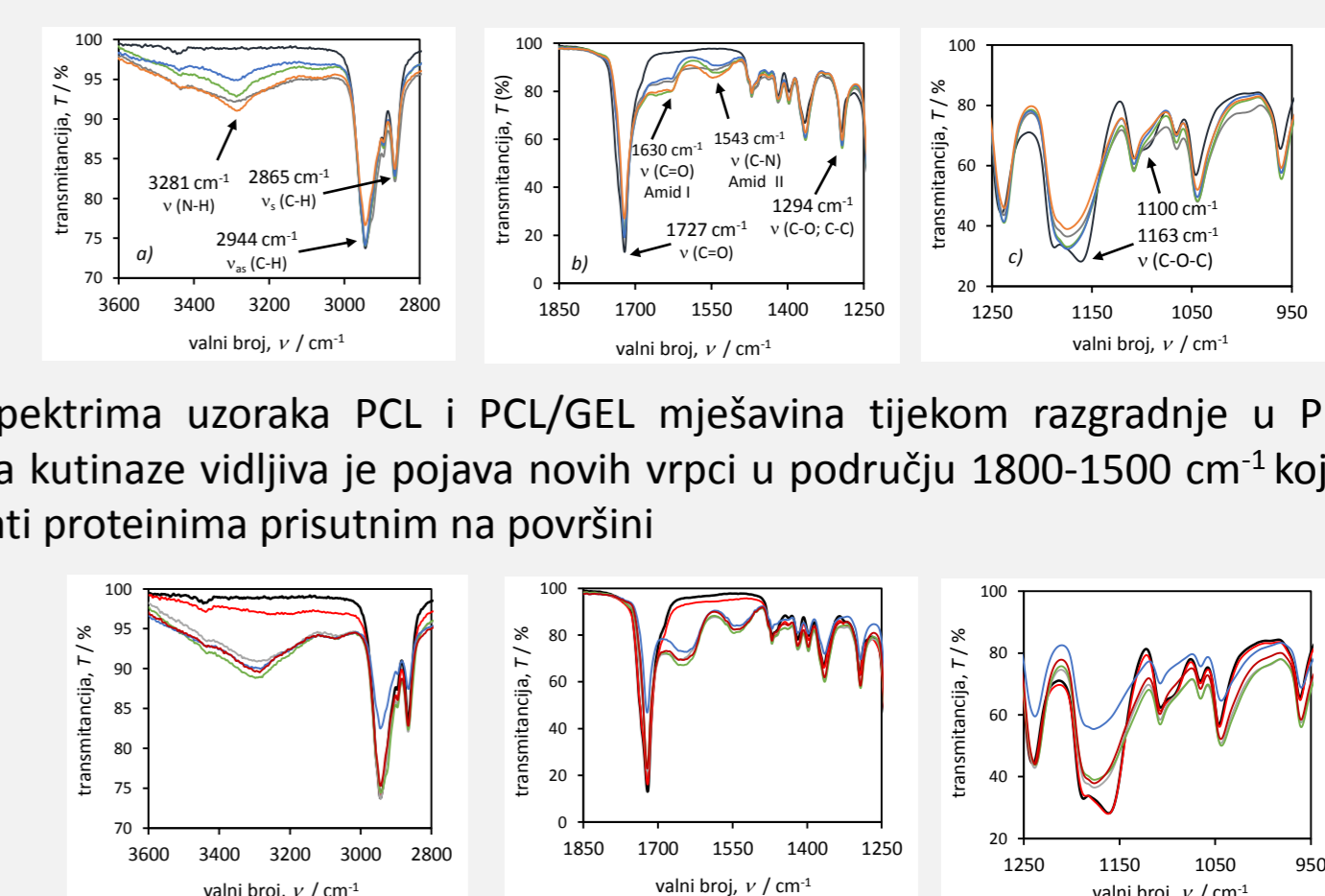
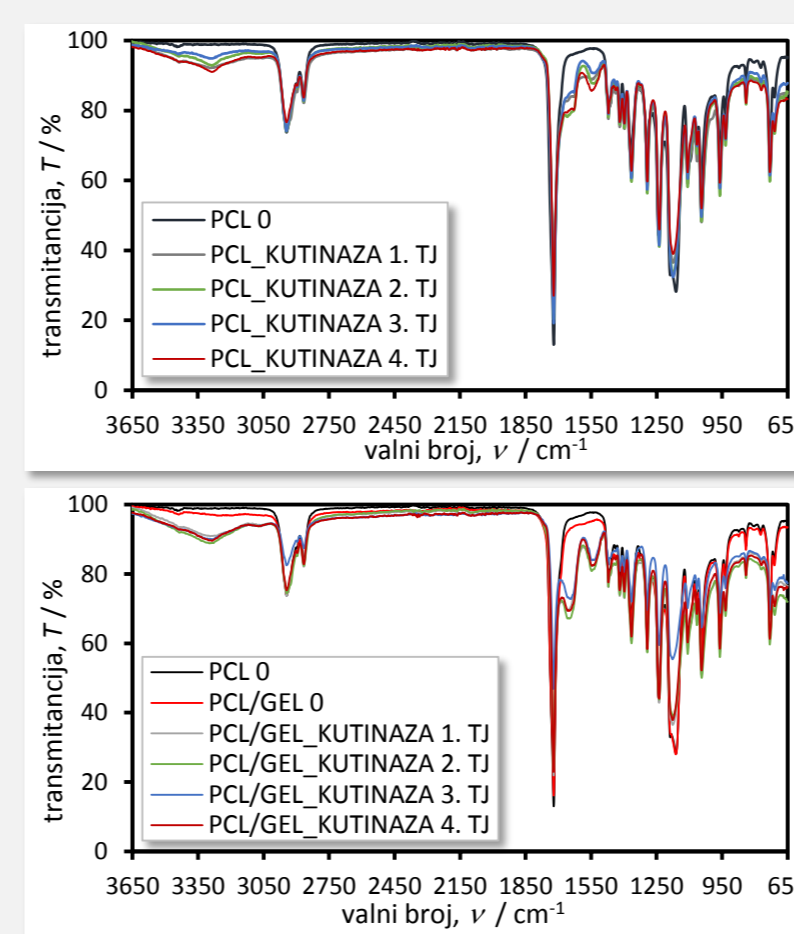
- PCL/GEL mješavina sastava 90/10 pripravljena je zamješavanjem u talini, na Brabender gnjetelici pri temperaturi 140°C
- PCL i PCL/GEL pločice 10x10 cm pripravljane su na Dake preši pri 140°C

Postupak enzimsku razgradnje

- eprovete (5 kom) PCL-a i PCL/GEL mješavine dimenzija 1x10 cm vagane su i stavljene u bočice s PBS otopinama s enzimom kutinaze i α -amilaze koncentracije 20 mg/L
- u svaku bočicu od 50 ml postavljeno je 5 pločica, s razmakom od 1 mm između pojedine pločice
- hidrolitička razgradnja u PBS otopini enzima inkubirana je na 37 °C, tijekom različitih vremena (4 tjedna)
- nakon 168, 336, 504, 672 sati uzorci su izvađeni iz otopine, isprani destiliranom vodom te osušeni filter papirom
- uzorci su sušeni do konstantne mase



FTIR – ATR SPEKTROSKOPIJA

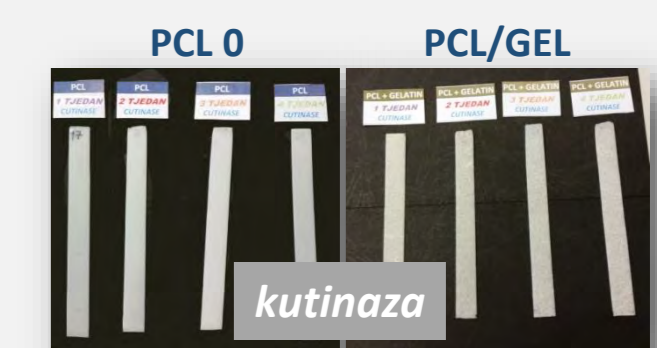


- na spektrima uzoraka PCL i PCL/GEL mješavina tijekom razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze vidljiva je pojava novih vrpca u području 1800-1500 cm^{-1} koje se mogu pripisati proteinima prisutnim na površini

- vrpce koje se javljaju kod ~1650 cm^{-1} pripisuju se *amid I* a vrpca kod ~1540 cm^{-1} *amid II*, što ukazuje na mogućnost da se na površinu PCL-a tijekom izlaganja enzimskoj razgradnji enzim kutinaze adsorbira na površinu PCL, odnosno PCL/GEL mješavine
- FTIR-ATR spektroskopijom na površini uzorka PCL polimera i PCL/GEL mješavine nisu uočene bitne promjene nakon enzimsku razgradnje u PBS otopini s α -amilazom

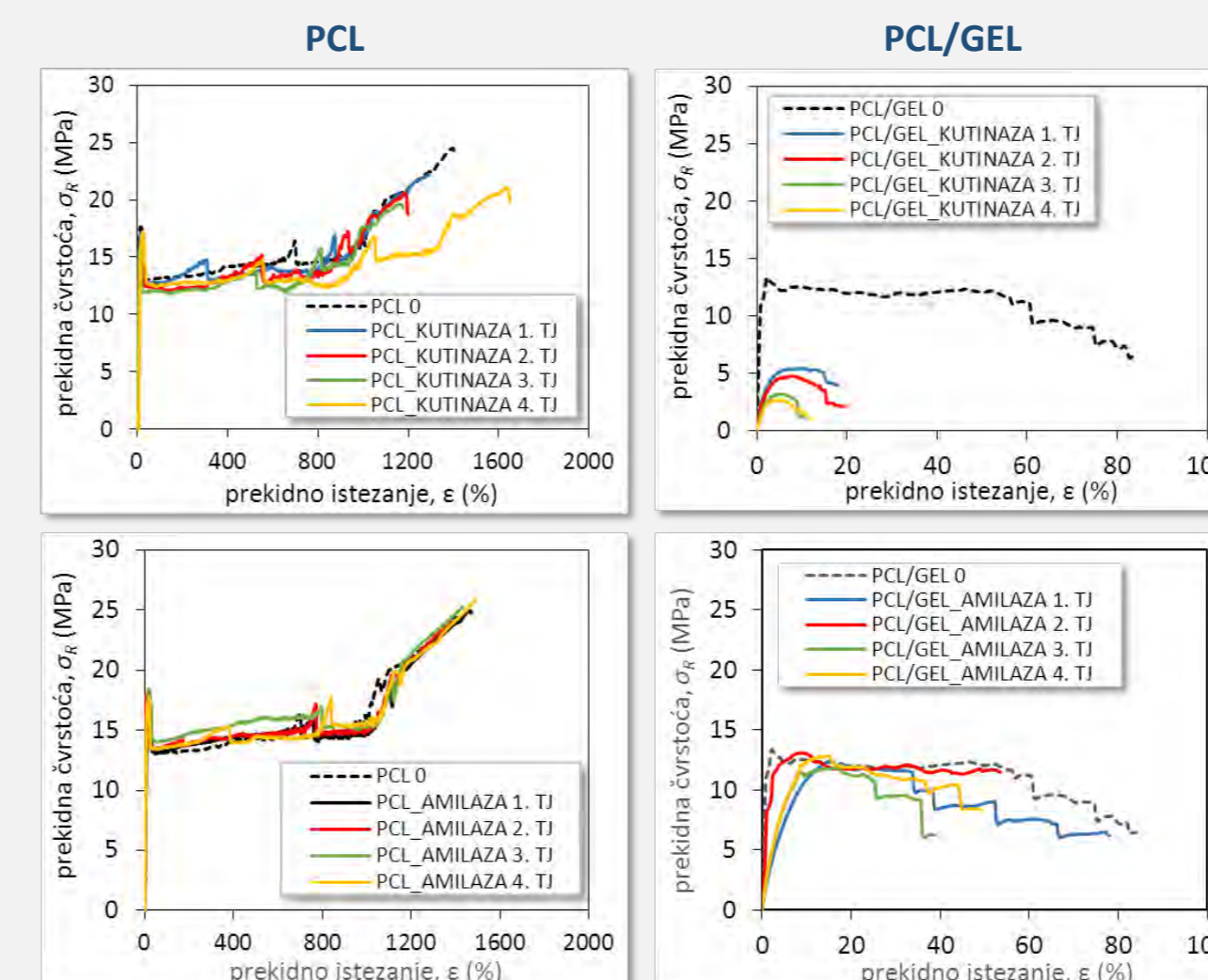
MOLEKULNA MASA (GPC)

- GPC analizom nije utvrđena promjena molekularnih masa PCL i PCL/GEL uzoraka tijekom 4 tjedna enzimsku razgradnje u PBS otopini kutinaze i α -amilaze
- dobiveni rezultati ukazuju da se razgradnja uzoraka PCL-a i mješavina PCL/GEL odvija mehanizmom erozije površine



uzorci tijekom 4 tjedna enzimsku razgradnje

MEHANIČKA SVOJSTVA



- unatoč značajnom gubitku mase nakon enzimsku razgradnje u kutinazi PCL ne pokazuje značajno sniženje prekidnih karakteristika
- PCL/GEL – značajno sniženje prekidne čvrstoće i istezanja u kutinazi – posljedica enzimsku razgradnje u unutrašnjosti materijala na mjestima gdje je bila gel faza – što rezultira bržom razgradnjom i poroznom strukturom PCL-a kao nosača

SEM

