

Szerkezeti stabilitás optimalizálása in situ térhálósítással vákuumfóliás szendvicsszerkezetű scaffoldok esetén

Optimization of structural stability of vacuum bagged sandwich-like scaffolds by in situ crosslinking

KECZÁNNÉ Dr. ÜVEGES Andrea^{1,2}, tudományos főmunkatárs,
Prof. Dr. HEGEDÜS Csaba¹, egyetemi tanár

Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Bioanyagtan és Fogpótlástani nem önálló Tanszék, Debrecen,
Nagyerdei körút 98, hegedus.csaba.prof@dentel.unideb.hu, <https://dentel.unideb.hu>
Debreceni Egyetem, Műszaki Kar, Gépészmérnöki Tanszék, Debrecen, Ótemető u. 2-4.,
auveges@eng.unideb.hu, <https://mecheng.unideb.hu/>

Abstract

The aim of the research is to produce and characterize a sandwich-like scaffold for bone regeneration. The cover layers of the scaffold are polyvinyl alcohol (PVA) fibrous meshes produced by electrospinning, and the core material is a chitosan composite containing β -tricalcium phosphate (β -TCP) produced by lyophilization. The in-situ crosslinking of the nanofibrous PVA and the formation of the sandwich-like structure were performed using the vacuum bagging. Our results contribute to the development of new generations, biocompatible materials that can provide optimal support for bone regeneration processes.

Keywords: vacuum bagging, electrospinning, nanofibrous mesh, sandwich-like structure, structural integrity

Kivonat

A kutatás célja szendvicsszerkezetű scaffold vákuumfóliás módszerrel történő előállítása és karakterizálása. A scaffold külső rétegei elektrosztatikus szálképzéssel előállított polivinil-alkohol (PVA) szálhálók, a scaffold mag anyaga liofilizálással előállított β -trikalcium-foszfát (β -TCP) tartalmú kitozán kompozit. A nanoszálak szerkezetű PVA in situ térhálósítása és a szendvicsszerkezet kialakítása vákuumfóliás eljárással történt. Eredményeink hozzájárulhatnak az új generációs, biokompatibilis anyagok fejlesztéséhez, amelyek optimális támogatást nyújthatnak a csontregenerációs folyamatokhoz.

Kulcsszavak: vákuumfóliás módszer, elektrosztatikus szálképzés, nanoszálak szálháló, szendvics szerkezet, szerkezeti integritás

1. BEVEZETÉS

A háromdimenziós (3D) scaffold szerkezetek fejlesztése az elmúlt évtizedekben kiemelt jelentőséget nyert az anyagtudományi és biomérnöki területeken, köszönhetően sokrétű alkalmazhatóságuknak a szövetmérnökség, a gyógyszerhatóanyag leadó rendszerek és a fejlett kompozit anyagok terén. Tervezésük során alapvető követelmény a megfelelő porozitás, mechanikai szilárdság és biokompatibilitás biztosítása, ami komoly anyagtudományi és gyártástechnológiai kihívásokat jelent a kutatók számára.

A nanoszálak szerkezetű polimereket, különösen a polivinil-alkoholt (PVA), széles körben alkalmazzák a korszerű scaffold anyagok fejlesztésében, ami kedvező tulajdonságaiknak, például a biokompatibilitás, biodegradálhatóság és a jól szabályozható mechanikai sajátságoknak köszönhető [1]. Az elektrosztatikus szálképzés egy hatékony és széles körben alkalmazott módszer a PVA nanoszálak előállítására [2-4], amely lehetővé teszi a szálak átmérőjének, orientációjának és morfológiájának pontos szabályozását.

A β -trikalcium-foszfát (β -TCP) és a kitozán kombinációja különösen ígéretes a csontszövet mérnöki alkalmazásokban, köszönhetően a β -TCP kiváló osteokonduktivitásának [5] és a kitozán kedvező biológiai tulajdonságainak. A kitozán, mint természetes eredetű poliszacharid, kiváló biokompatibilitással, biodegradálhatósággal és antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkezik [6], míg a β -TCP, mint bioaktív

kerámia, elősegíti a csontképződést és biztosítja a mechanikai szilárdságot. A β -TCP-kitozán kompozitok előállításának egyik leghatékonyabb módja a liofilizálás. Reves és munkatársai tanulmányukban részletesen vizsgálták a liofilizálás hatását a kitozán-kalcium foszfát mikrogömbökre és scaffoldokra, különös tekintettel a gyógyszerhatóanyag leadási tulajdonságokra [7]. Kutatásukban kimutatták, hogy a liofilizálás a scaffoldok felületének több mint 400%-os növekedését és a porozitás 50%-os növekedését eredményezte.

A szendvicsszerkezetű kompozit anyagok, amelyek különböző tulajdonságú rétegekből állnak, számos előnyt kínálnak a homogén anyagokhoz képest, beleértve a jobb mechanikai, testre szabható tulajdonságokat és a funkcionális rétegek integrálását [8]. A vákuumfóliás technika a szendvicsszerkezetű kompozitok előállításának hatékony módszere, amely során a különböző rétegeket vákuum segítségével tömörítik és kapcsolják össze [9]. Ez a módszer különösen előnyös lehet porózus scaffoldok esetében, mivel lehetővé teszi a kontrollált tömörítést anélkül, hogy károsítaná a scaffold belső szerkezetét. A vákuumfóliás technika előnye, hogy egyenletes nyomáseloszlást biztosít a teljes szerkezet mentén, ami homogénebb végterméket eredményez. Az in situ térhálósítás a vákuumfóliás technikával kombinálva különösen hatékony módszer lehet a szendvicsszerkezetű scaffoldok szerkezeti stabilitásának javítására.

Korábbi kutatásunk során nanoszálás szerkezetű, csontosodási folyamatokat segítő polivinil-alkohol/kitozán mártixú β -TCP-vel módosított aerogél tartalmú kompozit scaffoldot állítottunk elő [10]. A biztató eredmények ellenére felmerült az igény arra, hogy a bioaktív anyagot nagyobb koncentrációban alkalmazzuk, melynek az elektrosztatikus szálképzés komoly korlátot szab. Célunk szendvics-szerkezetű scaffoldok előállítása PVA nanoszálás rétegek és β -TCP tartalmú kitozán kompozit rétegek kombinálásával vákuumfóliás módszerrel in-situ térhálósítással.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1.1. PVA szálhálók előállítása

A szálás szerkezetű anyag polivinil-alkohol (Merck, Darmstadt, Németország) (65 kDa, polidisperzitás: 3,168) 10 tömegszázalékos citromsavat is tartalmazó vizes oldatának felhasználásával történt elektrosztatikus szálképzéssel (Nanospinner NS1, Inovenso Ltd, Törökország). A PVA oldásához a desztillált vízhez mért polimert 24 órán át 80 °C-on kevertettük, majd hozzáadtuk a citromsavat (CA; VWR Chemicals, Franciaország), melynek alkalmazott mennyiségeit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat – A nanoszálás PVA előállításához alkalmazott citromsav és PVA tömegaránya

Minta jelölése	Tömegarány m_{PVA}/m_{CA}
CL-9	9/1
CL-8	8/2
CL-7	7/3
CL-6	6/4
CL-5	5/5

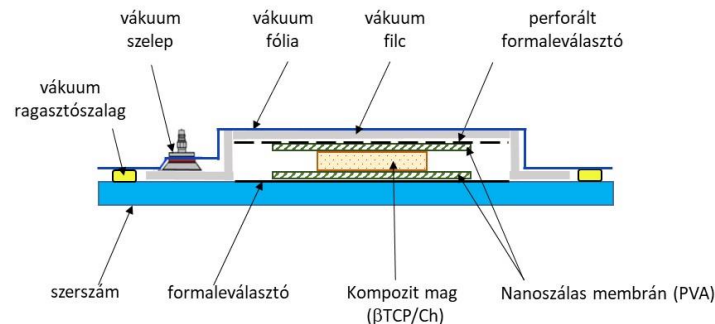
A PVA oldatot 5 ml-es fecskendőbe tettük és 25 kV feszültség, 13 cm dűzni-kollektor távolság, 0,62 ml/óra áramlási sebesség mellett 1 órán át elektrosztatikus szálképzéssel készítettünk belőle szálhálót. Az így elkészített szálhálók alkották a későbbiekben a szendvicsszerkezetű anyag határoló rétegét (CL). A háló fizikai és biológiai tulajdonságainak javítása érdekében a szálhálókat a későbbiekben térhálósítottuk.

1.2. β -TCP/kitozán kompozit maganyag preparálása

A β -TCP/kitozán kompozit előállításához alkalmazott kitozánból (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (750-1000 kDa) előzetesen 4 tömegszázalékos oldatot készítettünk, melyhez oldószerként 2 térfogatszázalékos esetsav-oldatot használtunk. Az oldási folyamatot keveréssel és melegítéssel segítettük elő (24 óra, 80 °C). Az oldódást követően az oldat szárazanyag tartalmára (kitozán) vonatkoztatott 30 tömegszázalék β -TCP-t adtunk hozzá és újabb 24 órán át intenzíven kevertettük. Az így kapott szuszpenziót 12 mm átmérőjű és 3 mm magasságú korong alakú mintatartóba tettük és -70 °C-ra hűtöttük, majd -53 °C-on 72 órán át liofilizáltuk.

1.3. Szendvicsszerkezetű scaffold kialakítása

A szendvicsszerkezet kialakítása vákuumfóliás módszerrel történt úgy, hogy két PVA szálháló közé tettünk egy liofilizált β -TCP/kitozán kompozit magot, majd az 1. ábrán látható módon 4 órán keresztül 0,5 bar nyomáson, 120 °C-on tartottuk a mintát. A szendvicsszerkezet kialakításával egyidőben a térhálósítási folyamat is végbement.



1. ábra. A szendvicsszerkezetű scaffold kialakításának sematikus ábrája vákuumfóliás módszerrel

1.4. Vizsgálati módszerek

Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A PVA szálhálót, a β -TCP/kitozán kompozit magot és a szendvicsszerkezetű scaffold morfológiáját kétsugaras pásztázó elektronmikroszkóppal (Thermo Fisher Scientific Scios2, FIB-SEM, Waltham, MA, USA) jellemeztük. A nem vezető minták töltésfelhalmozódásának elkerülése érdekében a megfigyeléseket alacsony, 5 kV-os gyorsítófeszültségen végeztük.

Infravörös spektroszkópia (FTIR)

A mérést egy gyémánt ATR kristályt tartalmazó Nicolet 6700 FT-IR spektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük. A mérések során a PVA szálhálóról és a kompozit mag mintákról 16 szkennelés történt 0,482 cm^{-1} felbontással. A térhálósított PVA szálhálót a mérés előtt desztillált vízben áztattuk, hogy az esetlegesen el nem reagált citromsavat eltávolítsuk belőle.

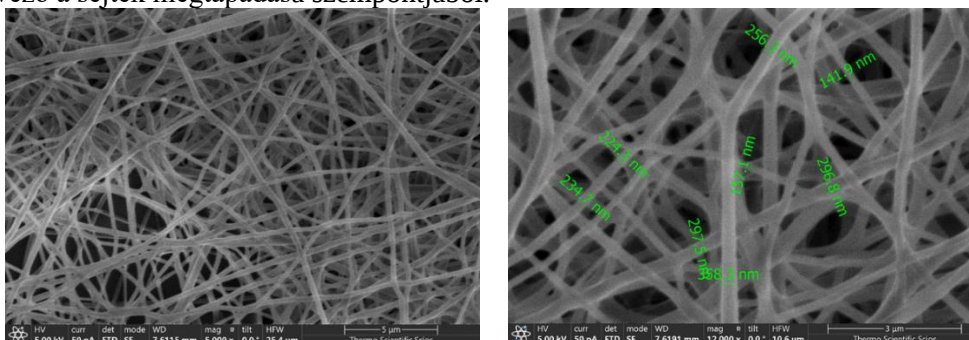
Nedvesítési peremszög

A PVA szálhálók nedvesítési paraméterét kontaktszög méréssel (Krüss GmbH, Hamburg, Németország) vizsgáltuk 20 °C-on, Young-Laplace modellt alkalmazva. A PVA szálhálók felületére egy vízcseppet (2 μl) helyeztünk és a kontaktszöget a vízcsepp felhelyezését követő 5 másodpercben megmértük.

2. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

2.1. A PVA szálhálók jellemzése

Szálas szerkezetű PVA morfológiáját és a szálak méretét SEM vizsgálatokkal végeztük. A 2. ábrán egy vákuumfóliás módszerrel térhálósított PVA szövet képét láthatjuk. A térhálósítást ebben az esetben a szendvicsszerkezet kialakításától függetlenül végeztük el, hogy a kép értékelését ne zavarja a β -TCP/kitozán kompozit jelenléte. A szálas szerkezetű anyag jellemző szálátmérője 250 nm körüli, ami a szakirodalom szerint kedvező a sejtek megtapadása szempontjából.

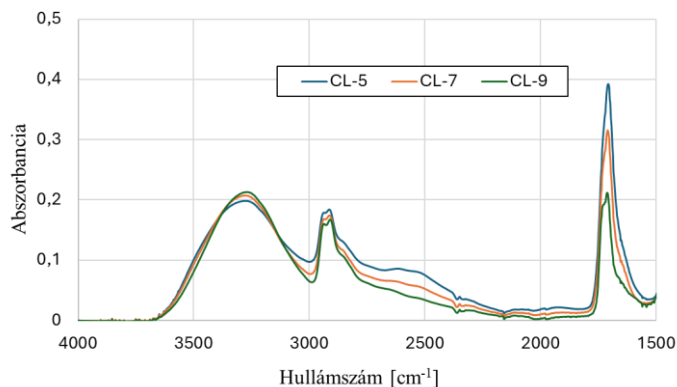


2. ábra. Az észterezési reakció utáni (térhálós) nanoszálás PVA SEM képei (5000x és 12000x nagyítások)

A térhálósítás eredményeképpen a szálak az érintkezési pontok mentén kissé ellapulnak, amit az egymást keresztező szálak összekapcsolódása eredményez.

Néhány esetben a szálak teljes hossza mentén történő összekapcsolódás is megfigyelhető, ugyanakkor még így is megmaradt a porózus szerkezet.

A térhálósított PVA mintákról készített IR spektrumok a 3. ábrán láthatók. A térhálósodás a PVA –OH csoportjai és a citromsav –COOH csoportjai között végbemenő észterezési reakcióval értelmezhető, ami a karbonil csoport vegyértékrezgéséhez rendelhető 1720 cm^{-1} abszorpciós csúcs intenzitás növekedését eredményezi. Megfigyelhető továbbá, hogy a kiindulási minták citromsav tartalmának növelése, a térhálósodás fokozódását eredményezi, ami az említett vegyértékrezgési sáv intenzitásnövekedését eredményezte.



3. ábra. A különböző mértékben térhálósított nanoszálak PVA minták FTIR spektrumai (CL-5: PVA/CA=5/5; CL-7: PVA/CA=7/3; CL-9: PVA/CA=9/1)

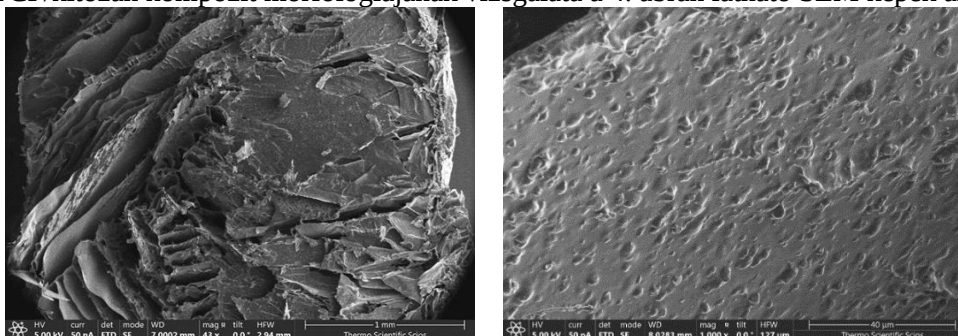
A különböző mértékben térhálósított PVA szálhálók nedvesedési peremszög értékeit a 2. táblázatban foglaltuk össze. A kontaktszög értéke minden minta esetén kisebb, mint 90° , vagyis a minták vízzel részlegesen nedvesíthetők. Mivel a vízzel való nedvesíthetőség előfeltétele a sejtek megtapadásának a felület hidrofíl jellegének megtartása elvárt a térhálósítást követően is. Az eredmények alapján megfigyelhető, hogy a citromsav mennyiségi növekedésével a minták kontaktszög értékei növekedtek, vagyis a szálhálók vízzel való nedvesíthetősége fokozatosan csökkent, ami a térhálósodás mértékének növekedésével értelmezhető.

2. táblázat – A különböző mértékben térhálósított nanoszálak PVA membránok kontaktszög értékei

Minta jelölése	Tömegarány $m_{\text{PVA}}/m_{\text{CA}}$	Hőkezelés	Peremszög $\pm$ SD [$^\circ$]
CL-9	9/1	120 $^\circ\text{C}$ 4 óra	$51,90 \pm 4,9$
CL-8	8/2		$72,18 \pm 6,2$
CL-7	7/3		$79,55 \pm 5,3$
CL-6	6/4		$81,33 \pm 5,4$
CL-5	5/5		$84,87 \pm 6,1$

2.2. β -TCP/kitozán kompozit maganyag jellemzése

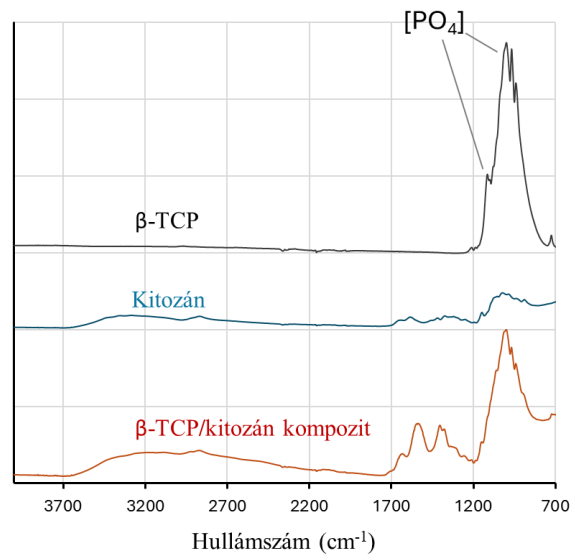
A β -TCP/kitozán kompozit morfológiájának vizsgálata a 4. ábrán látható SEM képek alapján történt.



4. ábra. A β -TCP/kitozán kompozit SEM képei (43x és 1000x nagyítások)

A bal oldali képen jól látható a liofilizálás eredményeként kapott xerogél porózus, lamellás szerkezete, míg a jobb oldali, nagyobb felbontású képen a β -TCP homogén eloszlása is megfigyelhető a kitozánban.

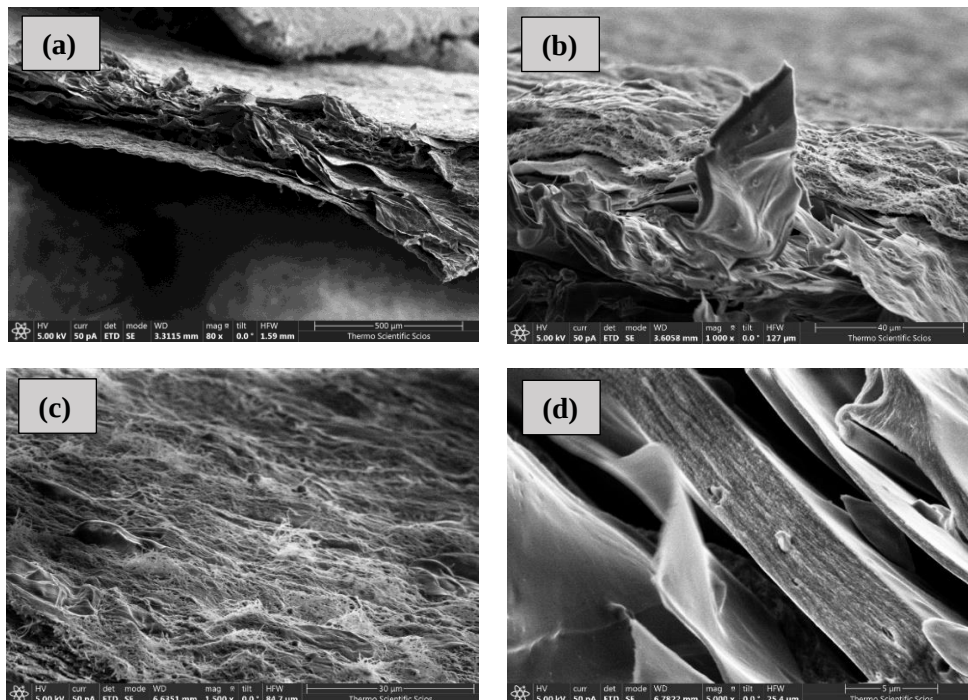
Az 5. ábrán a kiindulási β -TCP és kitozán, valamint a belőlük képzett kompozit maganyag FTIR spektruma látható. A spektrumok összevetése alapján egyértelműen megállapítható, hogy a kompozitban a β -TCP karakterisztikus jelei beazonosíthatók.



5. ábra. A β -trikalcium-foszfát, a kitozán és a β -TCP/kitozán kompozit FTIR spektrumai

2.3. A szendvicsszerkezetű scaffold jellemzése

A scaffold minták morfológiai vizsgálata SEM vizsgálattal történt, melyek képei a 6. ábrán láthatók. A 6. ábra (a) képe egy korong alakú minta „tépett” keresztmetszeti képe, melyen jól látható a PVA szálhálók között elhelyezkedő β -TCP/kitozán maganyag. A kép alapján elmondható, hogy a vákuumfóliázás kíméletes megoldás a szendvicsszerkezet kialakítására, mivel ennek eredményeként megmaradt a maganyag (6.d kép) lamellás, porózus szerkezete és a határoló PVA réteg (6.c kép) nanoszálak szerkezete is. A 6. ábra (b) képe a PVA szálháló és a kompozit mag érintkezési határfelületéről készített felvétel.



6. ábra. A szendvicsszerkezetű scaffoldról készített SEM képek: (a) a minta „tépett” keresztmetszeti képe, (b) a nanoszálak háló és a kompozit xerogél határfelülete, (c) a szendvicsszerkezetű minta felszíne, (d) a minta kompozit maganyaga

Jelentős rétegleválás nem figyelgető meg annak ellenére sem, hogy különböző szerkezetű rétegek egymásra építse történt, ami azzal értelmezhető, hogy az in situ térhálósítás során erős kémiai kötések nemcsak a PVA szöveteken szálain belül és a szálak érintkezési pontjain alakulhat ki, hanem a vákuum hatására érintkező PVA és kitozán határfelület között is létrejöhet.

3. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során elektrosztatikus szálképzéssel állítottunk elő jellemzően 250 nm szálátmérővel rendelkező PVA nanoszálak szöveteket és liofilizálással β -TCP/kitozán kompozitot, melyekből vákuumfóliás módszerrel alakítottuk ki a szendvicsszerkezetű scaffoldot. Megállapítottuk, hogy a liofilizálás lehetőséget biztosít nagy mennyiségű (akár 30%) homogén eloszlású bioaktív kerámia bevitelére és porózus, háromdimenziós struktúra létrehozására, mely kedvező tulajdonságokat biztosíthat a csontszövet regeneráció szempontjából. Az in-situ térhálósítás különösen előnyös lehet a PVA nanoszálak szálháló és a β -TCP/kitozán kompozit kombinálása esetén, ahol a különböző kémiai összetételű rétegek közötti hatékony adhézió kritikus a szerkezet stabilitása szempontjából. Megállapítottuk, hogy a PVA szálhálók térhálósodásának mértéke a CA mennyiségi változtatásával befolyásolható.

Összességében elmondható, hogy a vákuumfóliás technika és az in-situ térhálósítás kombinációja különösen ígéretes a szendvicsszerkezetű scaffoldok szerkezeti stabilitásának optimalizálásában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

„A TKP2021-EGA-20 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg.”

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Teixeira M.A., Amorim M.T.P. and Felgueiras H.P. *Poli(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications*. Polymers, 2020, 12(1), 7, 1-33.
- [2] Dai X., Nie W., Shen H., Machens H., et al. *Electrospinning based biomaterials for biomimetic fabrication, bioactive protein delivery and wound regenerative repair*. Regenerative Biomaterials, 2024, 12, 139.
- [3] Das A., Shetty S., Chethan K.N., Shetty R. and Sampath S.S. *Electrospun nanofibers: transformative innovations in biomedical applications and Future prospects in healthcare advancement*. Cogent Engineering, 2024, 11(1).
- [4] Demir D., Bolgen N. and Vaseashta A. *Electrospun Nanofibers for Biomedical, Sensing, and Energy Harvesting Functions*. Polymers, 2023, 15(21), 4253.
- [5] Drevet R., Fauré J. and Benhayoune H. *Bioactive Calcium Phosphate Coatings for Bone Implant Applications: A Review*. Coatings, 2023, 13(6), 1091
- [6] Mawazi S.M., Kumar M., Ahmad N. and Mahmood A. *Recent Applications of Chitosan and its Derivatives in Antibacterial, Anticancer, Wound Healing, and Tissue Engineering Fields*. Polymers, 2024, 16(10), 1351.
- [7] Reves B.T., Bumgardner J.D., Cole J.A., Yang Y. and Haggard W.O. *Liophilization to improve drug delivery for chitosan-calcium phosphate bone scaffold construct: A preliminary investigation*. Journal of Biomedical Materials Research Part B, 2009, 90(1), 1-10.
- [8] Yahia S., Khalil I.A. and El-Sherbiny I.M. *Sandwich-Like Nanofibrous Scaffold for Bone Tissue Regeneration*. ACS Applied Materials and Interfaces, 2019, 11, 32, 28610-28620.
- [9] Tavares S.S.L. *Optimisation of low pressure processing for honeycomb sandwich structure*. <http://doi.org/10.5075/EPFL-THESIS-4497> (Utolsó letöltés: 2025. 03 05.)
- [10] Boda R., Lázár I., Keczánné Ü.A. et al. *Tricalcium Phosphate-Modified Aerogel Containing PVA/Chitosan Hybrid Nanospun Scaffold for Bone Regeneration*. Journal of Molecular Science, 2023, 24(8), 1-23.