

WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE PIANEK NA BAZIE HIALURONIANU SODOWEGO

Ewelina Pabjańczyk-Wlazło^{*1}, Michał Chrzanowski², Grzegorz Szparaga¹

¹ Instytut Materialoznawstwa Tekstyliów i Kompozytów Polimerowych,
Politechnika Łódzka

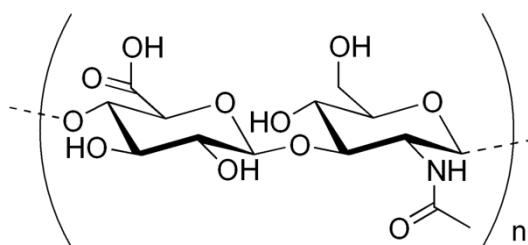
² Sieć Badawcza Łukasiewicz – Łódzki Instytut Technologiczny

*ewelina.pabjanczyk-wlazlo@p.lodz.pl

DOI 10.34658/9788366741805.2

1. Wstęp

Kwas hialuronowy (HA) został po raz pierwszy wyizolowany w 1934 r. z ciała szklatego bydła [1] przez dwóch amerykańskich naukowców Karla Meyera i Johna Palmersa. Nazwa związku pochodzi od greckiego słowa *hyalos*, które oznacza szkło i odnosi się do jego szklistej i przezroczystej właściwości. Od tego czasu w literaturze naukowej pojawiało się coraz więcej doniesień na temat miejsca występowania HA, jego właściwości fizyko-chemicznych i metod produkcji. HA jest nietoksycznym i niepowodującym podrażnienia związkiem i jednym z najszerzej rozpozszechnionych związków w przyrodzie. HA jest jednym z glikoaminoglikanów (GAG) – naturalnych heteropolisacharydów [2]. HA składa się z nierozgałęzionych polisacharydów, powtarzających się jednostek disacharydów połączonych wiązaniami glikozydowymi. Struktura HA jest przedstawiona na **Rys. 1** i składa się z dwóch naprzemiennych jednostek kwasu D-glukuronowego i N-acetylo-D-glukozaminy połączonych wiązaniami β -1,4- i β -1,3-glikozydowymi [3,4].



Rys. 1. Struktura chemiczna kwasu hialuronowego

Źródło: domena publiczna

In vivo występuje w postaci soli sodowej (HANa, hialuronian sodu) i głównie jest obecny w macierzy zewnątrzkomórkowej, ale także na powierzchni i wewnątrz komórek. Wyższe ilości kwasu hialuronowego wytwarzane są podczas gojenia się ran, rozwoju zarodkowego, a także w ciele szklistym oka, w ścianach naczyń

krwionośnych, pępowinie i stawach, podczas gdy najwyższe ilości można znaleźć w macierzy zewnątrzkomórkowej tkanek skóry [5,6].

HANA jest wysoce higroskopijnym biopolimerem ze względu na grupę karboksylową obecną w kwasie glukuronowym, która w fizjologicznym środowisku pH nadaje polimerowi charakter polianionowy. W środowisku wodnym cząsteczki HANA mogą zwiększać swoją objętość n-krotnie, tworząc sieć stabilizowaną wiązaniami wodorowymi. Jedna cząsteczka HANA może związać około 250 cząsteczek wody, jednak na jej zdolność do wiązania wody wpływa jej forma przestrzenna, na którą z kolei wpływa pH i różne kationy obecne w roztworze [7]. Większość cząsteczek wody jest mechanicznie unieruchomiona w helisie tego polisacharydu, a niektóre cząsteczki wiążą się z łańcuchem za pomocą wiązań wodorowych [8].

Te cechy HANA sprawiają, że jest to cząsteczka o dużej objętości hydrodynamicznej i dużej osmotyczności. Niezwykłe właściwości fizykochemiczne hialuronianu wynikają z połączenia jego struktury przestrzennej i zdolności do przybierania formy spirali z przypadkowymi zwojami. Ta cecha wraz ze specjalnymi właściwościami higroskopijnymi sprawia, że makrocząsteczka tego GAG-u przyjmuje ogromną objętość hydrodynamiczną, tworząc roztwory o wysokiej lepkości i elastyczności. To z kolei powoduje, że HANA odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu strukturalnej i biomechanicznej integralności tkanek, utrzymywaniu właściwej gospodarki wodnej komórek, biorąc udział w migracji komórkowej, różnicowaniu i proliferacji, które zachodzą w macierzy zewnątrzkomórkowej [9].

Zdolność wiązania wody wpływa na właściwości lepkosprężyste, a wodne roztwory hialuronianu wykazują właściwości pseudoplastyczne, tj. spadek lepkości wraz ze wzrostem naprężenia ścinającego i z powodu podwyższonej temperatury. Wiadomo również, że jego właściwości lepkosprężyste zależą od masy cząsteczkowej i stężenia HANA w roztworze [10]. Pianki polimerowe są jedną z najnowszych i coraz bardziej popularnych grup materiałów w dziedzinie medycyny regeneracyjnej ze względu na szczególne i korzystne właściwości, które wykazują np. struktura porowata, zdolność sorpcyjna i możliwość uzyskania kontrolowanego uwalniania substancji czynnych [11]. Ich właściwości, w zależności od metody otrzymywania, zależą w dużej mierze od rodzaju polimeru, jego masy cząsteczkowej, stężenia w roztworze, układu rozpuszczalników, zastosowanych dodatków (np. porogenów) i uzyskanej charakterystyki powierzchni, jak i struktury porowatej. W metodzie otrzymywania pianek za pomocą liofilizacji, tj. jednej z najprostszych metod otrzymywania pianek polimerowych polegającej najpierw na mrożeniu roztworów polimerowych, a później sublimacyjnym usuwaniu rozpuszczalnika. Zarówno rodzaj polimeru, jak i jego stężenie, mają wpływ na uzyskiwane właściwości mechaniczne finalnych struktur porowatych.

Celem badań było przygotowanie porowatych struktur za pomocą liofilizacji na bazie biogodnych soli sodowych kwasu hialuronowego oraz analiza zależności masy

cząsteczkowej zastosowanego polimeru i jego stężenia na wybrane właściwości mechaniczne otrzymanych pianek.

2. Materiały i metody

2.1. Polimer i przygotowanie roztworów

Sól sodowa kwasu hialuronowego (HANa) o czystości kosmetycznej została zakupiona od Contipro Biotech (Republika Czeska) w postaci białego proszku. W badaniu analizowano dwie masy cząsteczkowe polimeru: $M_1 = 80\text{--}130$ kDa i $M_4 = 2,0\text{--}2,2$ MDa oraz zastosowano cztery stężenia roztworów polimerowych (1,2,3 i 4%). HANa został wyprodukowany biotechnologicznie w wyniku fermentacji bakterii *Streptococcus Zooepidemicus Equi*, trawionych enzymatycznie (hialuronidazą jąder bydłęcych) do określonej masy cząsteczkowej i frakcjonowany chromatograficznie. Roztwory polimerów przygotowano przez rozpuszczenie polimeru w świeżo destylowanej wodzie i poddanie mieszanemu mechanicznemu przez 4 godziny. Dla każdej próbki przygotowano roztwór polimeru o objętości $V = 100$ ml, a roztwory polimeru wylano następnie do specjalnych plastikowych pojemników przeznaczonych do celów zamrażania, po 25 g na każdą próbkę.

2.2. Liofilizacja

Roztwory następnie zamrażano w temperaturze -80°C w chłodziarce laboratoryjnej przez 24 godziny, a tak przygotowane próbki suszono sublimacyjnie w liofilizatorze Martin Christ FREEZE DRYER ALPHA 1-2/LD PLUS (Stany Zjednoczone). Suszenie prowadzono przy ciśnieniu $p = 0,001$ mbar, stosując podgrzewaną półkę o ustawionej temperaturze 33°C . Proces prowadzono przez 48 godzin, aż do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika z próbki.

2.3. Badanie właściwości mechanicznych

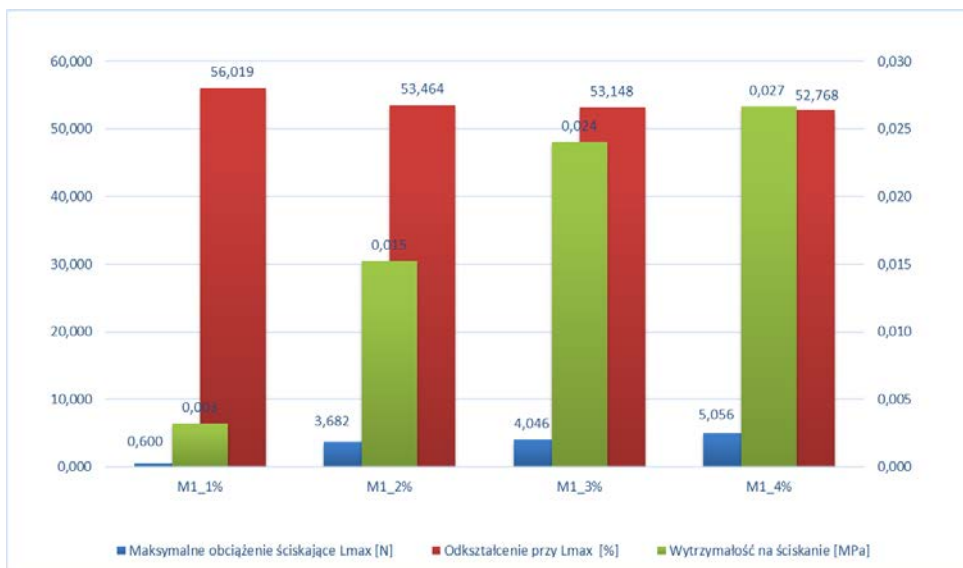
Zbadano zależność masy cząsteczkowej zastosowanego polimeru i jego stężenia od wybranych właściwości mechanicznych pianek. Aby ocenić tę zależność, opracowano metodę badania odporności na odkształcenie w oparciu o normę amerykańską: *Test Methods for Flexible Cellular Materials — Slab, Bonded, and Molded Urethane Foams, D 3574-03 - Test B1 — indentation force deflection tests — specified deflection*. Odchylenie siły wgniecenia mierzono jako siłę niezbędną do wytworzenia w piance oznaczonych wgnieceń. W badaniu maksymalne obciążenie ściskające (N) zostało zmierzone przy założonym 50% ugięciu. Pianki o jednolitych wymiarach 5 cm x 5 cm x 1 cm były analizowane pod kątem właściwości mechanicznych przy użyciu uniwersalnych systemów testowych INSTRON serii 5900 do badań wytrzymałości na rozciąganie, ściskanie i giętkość (Stany Zjednoczone).

Za każdym razem zastosowano jedną próbkę. Analiza pozwoliła obliczyć maksymalne obciążenie ściskające L_{max} , odkształcenie przy L_{max} oraz wytrzymałość na ściskanie (MPa), jak również średnie wartości odkształcenia i wytrzymałości na ściskanie. Odchylenie standardowe obliczono dla wielkości próby $n=25$. Do celu oceny wpływu porowatości pianek na ich właściwości mechaniczne wzięto pod uwagę porowatość całkowitą obliczoną stosując jako referencyjną (teoretyczną) gęstość obliczoną na podstawie zależności $\rho = m/V$ oraz jako eksperymentalnie określoną gęstość – gęstość polimeru obliczoną na podstawie pomiarów z wykorzystaniem kolumn gradientowych.

3. Wyniki i wnioski

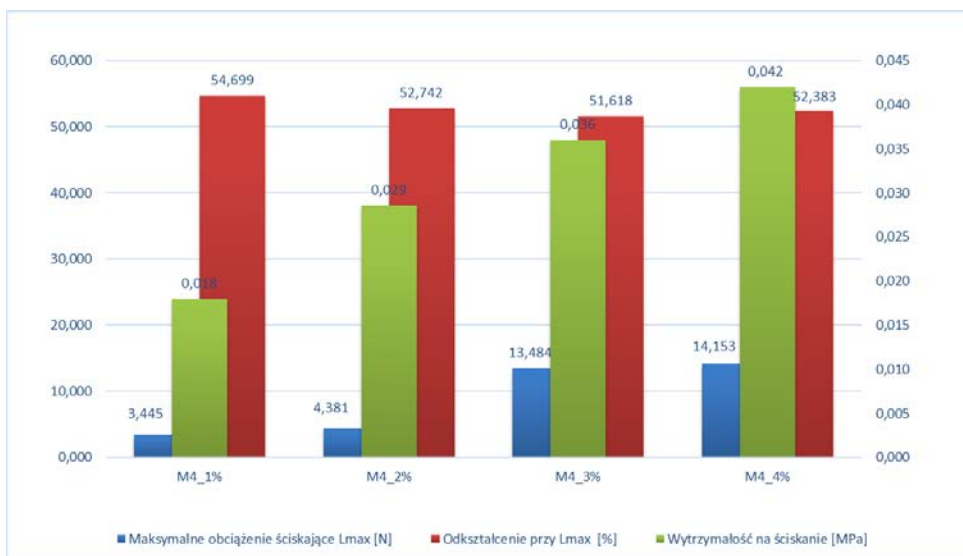
Z punktu widzenia projektowanego zastosowania oraz ze względu na specyfikę wytwarzanych struktur (porowatość, higroskopijność, kruchość pianek), jednym z bardzo istotnych parametrów mechanicznych, który może świadczyć o przydatności danej struktury do zastosowania w medycynie regeneracyjnej jest jego wytrzymałość na ściskanie rozumiana jako odkształcenie pod wpływem przyłożonej siły (maksymalnym obciążeniu ściskającym) lub jego wartość uśredniona.

Analiza pozwoliła na określenie następujących parametrów mechanicznych wytwarzanych pianek: maksymalne obciążenie ściskające, odkształcenie ściskające przy maksymalnym obciążeniu ściskającym i wytrzymałość na ściskanie, średnie odkształcenie przy ściskaniu i średnia wytrzymałość na ściskanie. Wyniki porównania właściwości mechanicznych wytworzonych pianek pod względem stężenia i wybranych mas cząsteczkowych polimeru: M_1 i M_4 przeprowadzono i przedstawiono na **Rysunkach 2 i 3**, a także w **Tabeli 1 i 2**.



Rys. 2. Porównanie wybranych właściwości mechanicznych dla pianek o masie cząsteczkowej M_1

Źródło: opracowanie własne.



Rys. 3. Porównanie wybranych właściwości mechanicznych dla pianek o masie cząsteczkowej M_4

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 1. Porównanie wybranych uśrednionych właściwości mechanicznych pianek wytworzonych z masy cząsteczkowej M_1 i M_4 w zakresie stężeń 1 – 4%.

Opis próbki	Stężenie [%]	Średnie odkształcenie przy ścisnaniu [%]	Odchylenie standardowe	Średnia wytrzymałość na ścisnienie [MPa]	Odchylenie standardowe
M1_1%	1%	54,739	3,065	0,003	0,001
M1_2%	2%	52,384	1,620	0,015	0,007
M1_3%	3%	51,981	1,161	0,025	0,007
M1_4%	4%	51,957	1,307	0,027	0,008
M4_1%	1%	54,933	3,470	0,018	0,005
M4_2%	2%	52,752	1,497	0,019	0,008
M4_3%	3%	51,406	1,039	0,042	0,022
M4_4%	4%	51,713	1,256	0,036	0,030

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 2. Porównanie wybranych uśrednionych właściwości mechanicznych pianek oraz ich porowatości całkowitej, wytworzonych w masy cząsteczkowej M_1 i M_4 o stężeniu 4%.

Opis próbki	Stężenie [%]	Średnie odkształcenie przy ścisnaniu [%]	Odchylenie standardowe	Średnia wytrzymałość na ścisnienie [MPa]	Odchylenie standardowe	Porowatość całkowita [%]
M1_4%	4%	51,957	1,307	0,027	0,008	64,36
M4_4%	4%	51,713	1,256	0,036	0,030	18,76

Źródło: opracowanie własne.

Z punktu widzenia oceny organoleptycznej, zastosowanie najwyższej masy cząsteczkowej i stężenia 4% pozwala na uzyskanie materiałów o znacznie większej trwałości w środowisku o wilgotności względnej $RH=40 - 60\%$ oraz o stosunkowo wysokiej kruchości. Na podstawie analizy **Rys. 1 i 2** oraz **Tab. 1 i 2** można wywnioskować, że:

1. Maksymalne obciążenie ściskające oraz wytrzymałość na ścisnienie rośnie wraz ze wzrostem poziomu stężenia w ramach tej samej masy cząsteczkowej polimeru. Poza tym, wartość tych dwóch parametrów jest zauważalnie wyższa dla zastosowania wyższej masy cząsteczkowej. Dla stężenia $C = 4\%$ możemy uzyskać prawie dwukrotnie wyższą wytrzymałość na ścisnienie wytworzonej pianki ($M_1 = 0,027$ MPa vs. $M_4 = 0,042$ MPa). Wyższa odporność wytworzonych pianek z wyższej masy

cząsteczkowej jest prawdopodobnie spowodowana zwielenieniem liczby wiązań wodorowych stabilizujących strukturę przestrzeni helis HANa. Ilość możliwych do powstania wiązań jest uzależniona m.in. od długości łańcucha oraz jego zdolności do tworzenia struktur przestrzennych, w których również tworzą się dodatkowe wiązania wodorowe stabilizujące strukturę. Przy zastosowaniu tego samego stężenia polimeru w roztworze, ale przy dłuższym łańcuchu prawdopodobieństwo powstania większej ilości wiązań wodorowych jest stosunkowo wyższe.

2. Odkształcenie ściskające przy maksymalnym obciążeniu ściskającym pozostawało na względnie podobnym poziomie zarówno w zakresie różnych stężeń, jak i przy porównaniu dwóch różnych mas cząsteczkowych. Pozwala to stwierdzić, że wytworzone struktury porowate na bazie tego biopolimeru, charakteryzują się względnie niską elastycznością niezależnie od stosowanego stężenia i masy cząsteczkowej.
3. Średnie odkształcenie przy ściskaniu nieznacznie spada wraz ze wzrostem stężenia polimeru w obrębie tej samej masy cząsteczkowej. Identyczną zależność zaobserwowano dla masy cząsteczkowej M_4 , przy czym próbki przygotowane z najniższego stężenia $C=1\%$ wykazywały się największymi wartościami odchylenia standardowego.
4. Średnia wytrzymałość na ściskanie rosła wraz ze wzrostem stężenia polimeru w roztworze, jak również wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej polimeru.
5. Teoretycznie wyliczona porowatość całkowita pianek wytworzonych z polimerów o niższej masie cząsteczkowej znacząco się różni od porowatości pianek z wyższej masy cząsteczkowej (64,36% vs. 18,76%). Nie wpłynęło to jednak znacząco na wartość uśrednioną odkształcenia przy ściskaniu i wytrzymałości na ściskanie.
6. Analiza właściwości mechanicznych nie wykazała znaczących różnic w zakresie wartości odkształceń przy maksymalnym obciążeniu ściskającym między próbkami.

4. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań określono zależności masy cząsteczkowej zastosowanego polimeru i jego stężenia na wybrane właściwości mechaniczne porowatych struktur otrzymanych za pomocą liofilizacji na bazie biozgodnego polimeru – soli sodowej kwasu hialuronowego. Stosowano dwa rodzaje masy cząsteczkowej oraz 4 stężenia procentowe (1 - 4%). Potwierdzono, że maksymalne obciążenie ściskające oraz wytrzymałość na ściskanie rośnie wraz ze wzrostem poziomu stężenia w ramach tej samej masy cząsteczkowej polimeru jak również wartość tych dwóch parametrów jest zauważalnie wyższa dla zastosowania wyższej

masy cząsteczkowej. Ponadto stwierdzono, że wytworzone struktury porowate charakteryzują się względnie niską elastycznością niezależnie od stosowanego stężenia i masy cząsteczkowej. Nie potwierdzono wpływu obliczonej porowatości pianek na wartości uśrednione odkształcenia przy ściskaniu i wytrzymałości na ściskanie, co może wskazywać na nieadekwatność wybranej metody obliczenia porowatości całkowitej pianek do tego typu materiałów piankowych.

Literatura

- [1] **Meyer K., Palmer J.W.**, *The polysaccharide of the vitreous humor*, Journal of Biological Chemistry 1934, vol. 107, ss. 629–634
- [2] **Tammi M.I., Day A.J., Turley E.A.**, *Hyaluronan and homeostasis: a balancing act*, Journal of Biological Chemistry 2002, vol. 277, ss. 4581–4584
- [3] **Olczyk P., Komosińska-Vassev K., Winsz-Szczotka K., Kuźnik-Trocha K., Olczyk K.**, *Hialuronian – struktura, metabolizm, funkcje i rola w procesach gojenia ran*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2008, vol. 62, ss. 651–659, e-ISSN 1732-2693
- [4] **Khabarov V.N., Boykov P.Y., Selyanin M.A., Polyak F.**, *Hyaluronic Acid - Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine*, Willey 2015, ISBN: 978-1-118-63379-3
- [5] **Hascall V.C., Majors A.K., De La Motte C.A., Evanko S.P., Wang A., Drazba J.A., Strong S.A., Wight T.N.**, *Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?*, Biochimica et Biophysica Acta 2004, nr 1673, ss.3–12
- [6] **Itano N., Atsumi F., Sawai T., Yamada Y., Miyaishi O., Senga T., Hamaguchi M., Kimata K.**, *Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002, vol. 99, ss. 3609–3614
- [7] **Głowacki A., Kozma E., Olczyk K., Kurzaj E.J.**, *Glikozaminoglikany – struktura i funkcja*, Postępy biochemii 1995, vol. 42, nr 2, ss. 139 -148
- [8] **Scott J.E.**, *Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues*, FASEB Journal 1992, vol. 6, nr 9, ss. 2639-2645
- [9] **Toole B.P.**, *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*, Nature Reviews Cancer 2004, nr 4, ss. 528–539

- [10] **Pabjańczyk-Włazło, E., Król P.**, *Rheological Properties of hyaluronic acid aqueous solutions*, V Wyjazdowa Sesja Naukowa Doktorantów Politechniki Łódzkiej, Rogów 9-12.04.2015, ISBN: 978-83-7283-655-7
- [11] **Radice M., Brun P., Cortive R., Scapinelli R., Battaliard C., Abatangelo G.**, *Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors*, Journal of Biomedical Materials Research 2000, vol. 50, ss. 101–109