

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 103

Numer 103

Volume XIV

Rok XIV

APRIL 2011

KWIECIEŃ 2011

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:

WYDAWCA:

**Polish Society
for Biomaterials
in Cracow**

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

**EDITORIAL
COMMITTEE:**

KOMITET
REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief

Redaktor naczelny
Jan Chłopek

Editor

Redaktor
Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial

Sekretarz redakcji

Design

Projekt
Katarzyna Trała
Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF

EDITORIAL OFFICE:

ADRES REDAKCJI:

AGH-UST

30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Cracow, Poland

Akademia
Górnictwo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków

Issue: 200 copies

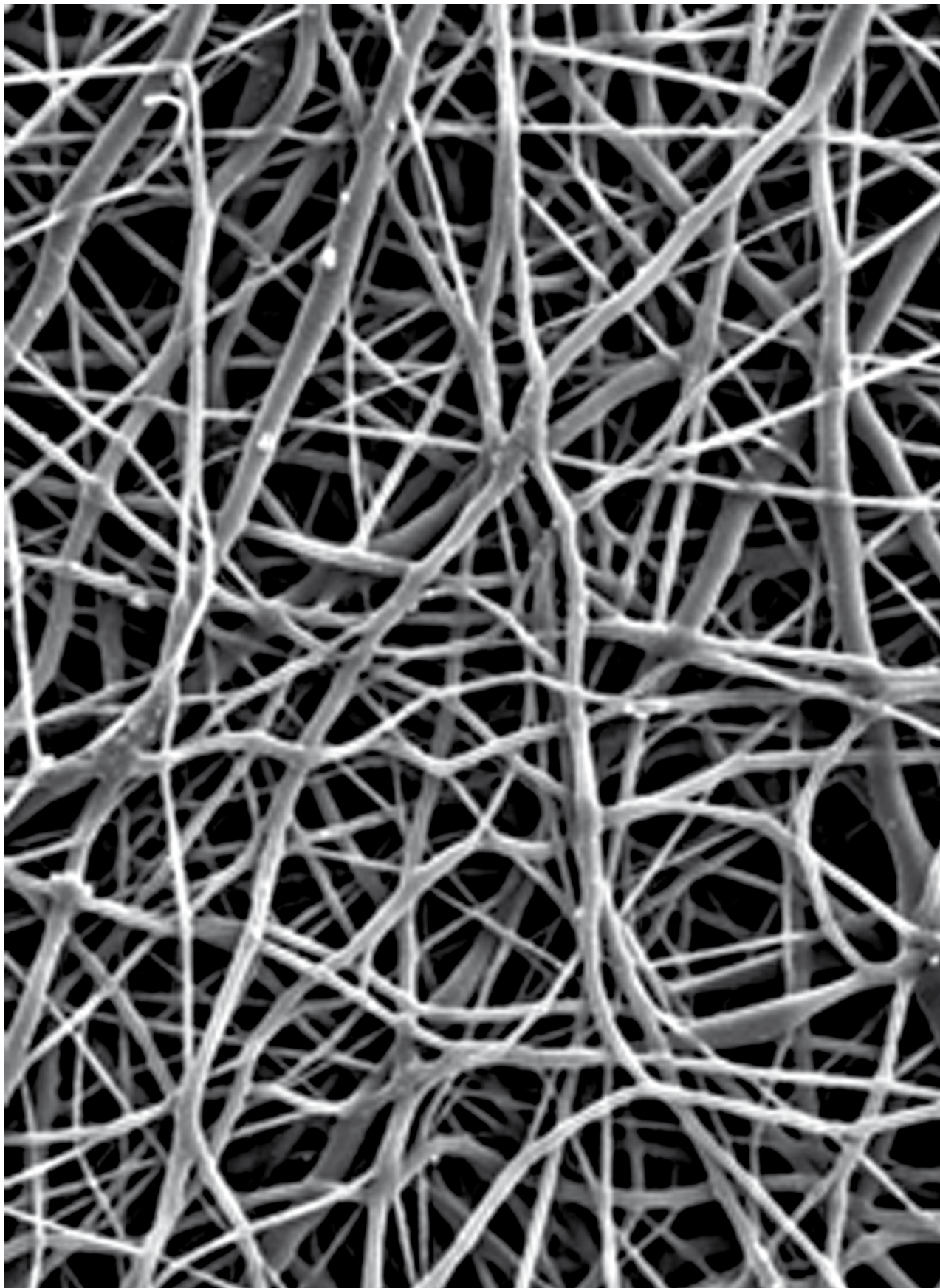
Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe

AKAPIT

e-mail: wn@akapit.krakow.pl



INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

Lucie Bacakova

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Romuald Będziński

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Marta Błażewicz

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Stanisław Błażewicz

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Maria Borczuch-Łączka

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Wojciech Chrzanowski

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Tadeusz Cieślik

ŚŁĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

Jan Ryszard Dąbrowski

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

Andrzej Górecki

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Robert Hurt

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Wojciech Maria Kuś

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Małgorzata Lewandowska-Szumieł

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Jan Marcinia

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Sergey Mikhalovsky

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

Roman Pampuch

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Stanisław Pielka

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

Vehid Salih

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

Jacek Składzień

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, CRACOW

Andrei V. Stanishevsky

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

Anna Ślósarczyk

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Tadeusz Trzaska

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

Dimitris Tsipas

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
 - TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach. Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38
tel./fax: (48 12) 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl,

www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41
Konto:
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
Bank Śląski S.A. O/Kraków,
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001
Opłaty: cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
 - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words)
 - Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...
6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.
11. Manuscripts should be submitted for publication to:

Journal
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
AGH University of Science and Technology
Faculty of Materials Science and Ceramics
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38
tel./fax: (48 12) 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates:
Cost of one number: 20 PLN
Payment should be made to:
Polish Society for Biomaterials
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Cracow, Poland
Bank Śląski S.A. O/Krakow
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

XXI Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE

*13-16 October 2011
Hotel "Perła Południa"
Rytro, Poland*

www.biomat.agh.edu.pl



SPIS TREŚCI

**HYDROLYTIC DECOMPOSITION IN A POLYAMIDE/
PDMS COMPOSITE FOR ORTHOPAEDIC USAGE**M. SOCHOR, K. BALÍK, Z. SUCHARDA,
T. SUCHÝ, R. SEDLÁČEK

2

**EVALUATION OF PCL AND PCL/HAP SCAFFOLDS
PROCESSED BY ELECTROSPINNING AND
POROGEN LEACHING TECHNIQUES**

IZABELLA RAJZER

4

**FENOMENOLOGICZNA OCENA DEGRADACJI
WYPEŁNIENIA Z KOMPOZYTU POLIMEROWEGO
I TKANKI ZĘBA W WARUNKACH CYKLICZNYCH
OBCIĄŻEŃ DYNAMICZNYCH**DANIEL PIENIAK, AGATA M. NIEWCZAS, TERESA BACHANEK,
JAROSŁAW BIENIAŚ

8

**WPŁYW POLI(ε-KAPROLAKTONU) NA EKSPRESJĘ
I AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY ALKALICZNEJ W
LUDZKICH KOMÓRKACH OSTEOGENNYCH**JOANNA LESZCZYŃSKA, JOANNA WÓJTOWICZ,
RADOSŁAW OŁKOWSKI, JUSTYNA KOMASA,
PIOTR ULAŃSKI, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

13

**CYTOKOMPATYBILNOŚĆ BIOMATERIAŁÓW
ZŁOŻONYCH Z PLGA/PLLA MODYFIKOWANYCH
KRZEMIONKĄ PRZEZNACZONYCH DO
REGENERACJI TKANKI KOSTNEJ**JOANNA LESZCZYŃSKA, JOANNA WÓJTOWICZ,
STANISŁAW SŁOMKOWSKI, STANISŁAW SOSNOWSKI,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

17

**BADANIA DZIAŁANIA CYTOTOKSYCZNEGO
MEMBRAN CHITOZANOWYCH
PRZEZNACZONYCH NA OPATRUNKI**

ZOFIA MODRZEJEWSKA, DANUTA PALUCH

23

*STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS
ABSTRACTED IN APPLIED MECHANICS REVIEWS*

CONTENTS

**HYDROLYTIC DECOMPOSITION IN A POLYAMIDE/
PDMS COMPOSITE FOR ORTHOPAEDIC USAGE**M. SOCHOR, K. BALÍK, Z. SUCHARDA,
T. SUCHÝ, R. SEDLÁČEK

2

**EVALUATION OF PCL AND PCL/HAP SCAFFOLDS
PROCESSED BY ELECTROSPINNING AND
POROGEN LEACHING TECHNIQUES**

IZABELLA RAJZER

4

**PHENOMENOLOGICAL EVALUATION OF
DEGRADATION OF POLYMER COMPOSITE FILLING
AND THE TOOTH TISSUE IN THE CONDITIONS OF
CYCLICAL DYNAMIC LOADS**DANIEL PIENIAK, AGATA M. NIEWCZAS, TERESA BACHANEK,
JAROSŁAW BIENIAŚ

8

**THE EFFECT OF POLY (ε-CAPROLACTONE) ON
THE EXPRESSION AND ACTIVITY OF ALKALINE
PHOSPHATASE IN HUMAN OSTEOGENIC CELLS**JOANNA LESZCZYŃSKA, JOANNA WÓJTOWICZ,
RADOSŁAW OŁKOWSKI, JUSTYNA KOMASA,
PIOTR ULAŃSKI, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

13

**CYTOCOMPATIBILITY OF SILICA-MODIFIED
PLGA/PLLA BIOMATERIALS FOR BONE
TISSUE REGENERATION**JOANNA LESZCZYŃSKA, JOANNA WÓJTOWICZ,
STANISŁAW SŁOMKOWSKI, STANISŁAW SOSNOWSKI,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

17

**INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC
ACTIVITY OF CHITOSAN MEMBRANES
TO BE USED AS DRESSING**

ZOFIA MODRZEJEWSKA, DANUTA PALUCH

23

*WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI
I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO**EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE
AND HIGHER EDUCATION*

HYDROLYTIC DECOMPOSITION IN A POLYAMIDE/PDMS COMPOSITE FOR ORTHOPAEDIC USAGE

M. SOCHOR^{1*}, K. BALÍK², Z. SUCHARDA², T. SUCHÝ^{1,2},
R. SEDLÁČEK¹

¹ CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
LABORATORY OF BIOMECHANICS, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

² INSTITUTE OF ROCK STRUCTURE AND MECHANICS,
CZECH ACADEMY OF SCIENCES,
DEPARTMENT OF COMPOSITES AND CARBON MATERIALS,
PRAGUE, CZECH REPUBLIC

* E-MAIL: MIROSLAV.SOCHOR@FS.CVUT.CZ

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 2-3]

Introduction

A successful tissue engineering product must necessarily result from combining several disciplines dealing with mechanical properties, the interaction of the implant with the surrounding tissue, and also practical clinical experience. With composites consisting of polymer reinforcement and a polymer matrix with the possibility of selecting the volume ratio of the fiber reinforcement to the matrix and also a suitable orientation, mechanical properties identical with those of human bone can be obtained [1]. The reason for their wide use in various medical applications is mainly the availability of materials with various properties in various forms and compositions as well as the fact that they can be hardened directly into the required shape or structure with the most suitable fiber orientation. Their biocompatibility and mechanical properties can also be enhanced by inserting a bioactive component into the matrix. Our study reported in [2] dealt with preparing fiber composites based on an aliphatic or aromatic polyamide and on a polydimethylsiloxane (PDMS) matrix modified by calcium phosphates. We also reported on their mechanical properties and moreover their biocompatibility [3].

In the case of polymeric composites, it is important to study their degradation upon exposure to environmental conditions. Moisture uptake can lead to reduction of mechanical properties and change of dimensions [4-5]. The hygroscopic nature of aramid fibers has to be taken into account. It has been concluded that poor resistance to moisture absorption is one of the drawbacks of aliphatic or aromatic polyamide fabric composites [4]. It is important to study their moisture absorption behavior in order to estimate not only its influence on the mechanical properties of the composites, but also how this moisture uptake can be minimized. The aim of this study was to investigate the moisture absorption behavior of an Aramid/PDMS composite as a result of short-term immersion in simulated body fluid (SBF) at 37°C for 28 days. A study was made of the influence of three kinds of chemical and thermal treatments of Aramid fabric on the moisture absorption and mechanical properties of the prepared composites.

Materials and methods

Four kinds of composite materials differing in the chemical treatment of the fabric were prepared. All composites were based on an Aramid reinforcement (55 vol.%, Aramid balanced fabric, based on aromatic polyamide fibers HM 215, Hexcel, FR) and a PDMS M130 matrix (Lucebni zavody Kolin, CR).

The Aramid fabric was chemically treated by immersion in three different media: i) by immersion in xylene for 24 hours (X) as a representative of organic solvents, ii) by immersion in 10 wt% HNO₃ and 33 wt% H₂O₂ solution at 110°C for 4 hours (K) as a representative of an acid environment, and iii) by immersion in 10 wt% KOH and 33 wt% H₂O₂ solution at 110°C for 4 hours (L) as a representative of an alkali environment. After these procedures, the fabrics were washed in deionized water several times until neutral pH was reached and then dried at 110°C for 4 hours. Treated and untreated (O) layers were impregnated and then placed into the curing mould ([0°/90°]) and finally cured under a pressure of 1.1 MPa at 225°C in an air atmosphere for 4.5 hours and postcured under a pressure of 1.1 MPa at 250°C for 4 hours. Moisture absorption and mechanical tests were performed on specimens of (60x6x2) mm (6 samples from each). Prior to the experiments, all specimens were dried until a constant weight was attained. The specimens were immersed in SBF (ISO 23317) at 37°C for 28 days. The moisture uptake was calculated as the weight gains related to the weight of the dry specimens. The ultimate strength in bending and the modulus of elasticity in bending in the direction of the fiber axis were determined by a four-point bending set-up using the Inspekt 100 HT material tester (Hagewald & Peschke, Germany), in accordance with ISO 14125. Unimmersed (dry), immersed, immersed and re-dried (until a constant weight was reached) samples were measured. A statistical analysis for all tests was carried out by nonparametric analysis of variance, at a significance level of 0.05 (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney as a post hoc test), and the confidence intervals for the mean values were calculated at a significance level of 0.05.

Results and discussion

The lowest moisture uptake values after 28 days of immersion in SBF were reached in the case of K composites (FIG. 1), where all the values display statistically significant differences. The flexural properties of the four composites upon moisture saturation were tested and compared with those of the corresponding dry and re-dried samples; the results are summarized in FIG. 2 and FIG. 3.

The strength in bending was shown in all cases to be a strong function of the moisture content of the sample. The results show that the moisture effects are substantial: losses of approx. 21% (K) < 31% (X) < 34% (O) < 46% (L) in the sample strengths were observed at their moisture saturation, in comparison with their dry condition. A comparison of the immersed and re-dried samples indicates that there is irreversibility of the acting mechanism in the case of samples K and L, probably just due to weakening of the reinforcement-matrix bond. In most cases, the modulus of elasticity in bending is also influenced by the moisture content. From this point of view, in the case of samples K, the modulus is not affected by moisture absorption.

The degradation of fiber reinforced polymeric composites is mainly caused by the deterioration in the load bearing ability at the interface resulting from failure of the interfacial bonds [4]. Matrix or fiber degradation and matrix cracking may also contribute to degradation of the composites. Our previous study (reported elsewhere [6]) on glass fibers/PDMS composites shows that PDMS is not prone to degradation in a tissue culture medium. In the case of aramid/PDMS composites, interface debonding was probably mostly responsible for the mechanical degradation. It is necessary to verify this assumption by further experiments, namely determining the extracted silicon (possible PDMS degradation) and determining the influence of immersion on the inner composite structure by image analysis.

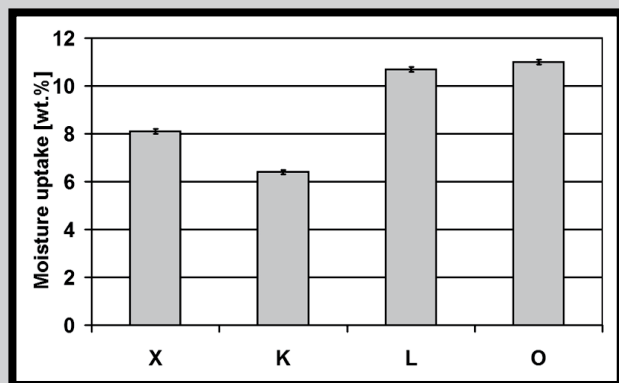


FIG. 1. Moisture uptake of the studied composites, all values show statistically significant differences (0.05).

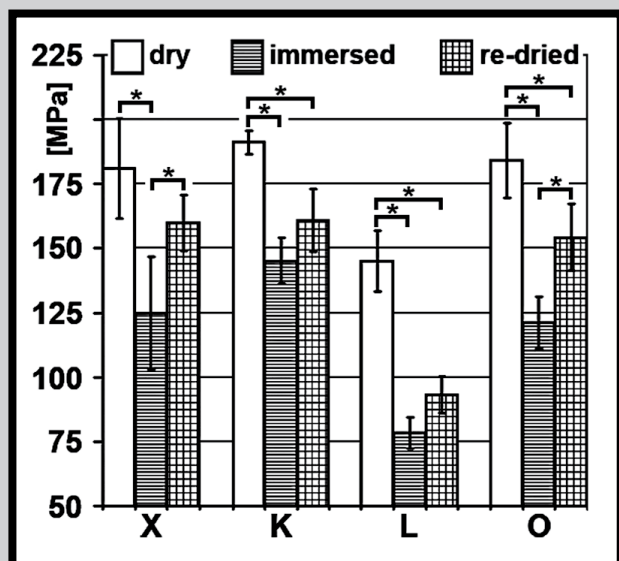


FIG. 2. Ultimate strength in bending of the studied composites. * denotes statistically significant differences (0.05).

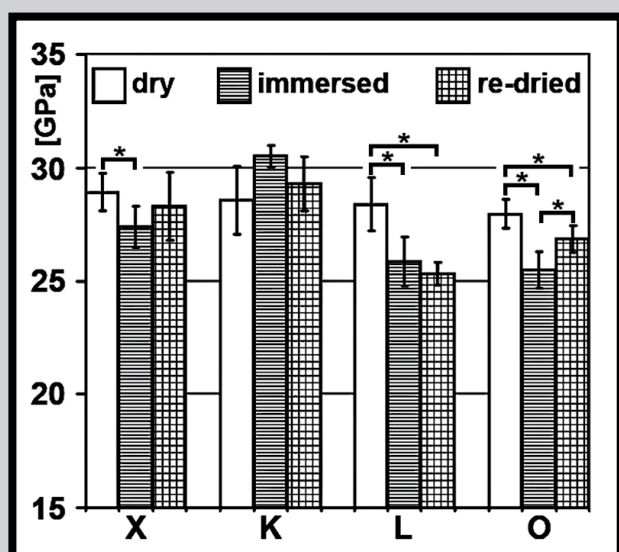


FIG. 3. Modulus of elasticity in bending of the studied composites. * denotes statistically significant differences (0.05).

Conclusions

This study has investigated the effect of three kinds of chemical and thermal treatments of aramid fabrics on the moisture absorption and mechanical properties of polymeric composites due to short-term immersion in SBF. The results have demonstrated that surface treatment of aramid fabric changes the moisture absorption trend. When the aramid fabric was immersed in 10 wt% HNO_3 and 33 wt% H_2O_2 solution at 110°C for 4 hours, both moisture sorption and mechanical degradation decreased with respect to the untreated composite.

Acknowledgements

This study was supported by the Czech Science Foundation under project No. P108/10/1457, and by Ministry of Education project Transdisciplinary Research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012.

References

- [1] Ramakrishna, S., Huang, Z.M., Kumar, G.V., Batchelor, A.W., Mayer, J.: 2004, An Introduction to Biocomposites, Vol.1, 1st ed., Imperial College Press, London.
- [2] Balík K, Suchý T, Sucharda Z, Černý M, Bačáková L, Sochor M, Šlouf M. Effect of nano/micro particles of calcium phosphates on the mechanical properties of composites based on polysiloxane matrix reinforced by polyamide. *Ceramics-Silikáty* 2008;52(4):260-67.
- [3] Balík K, Bačáková L, Sochor M, Černý M, Lisá V, Filová E, Grausová L, Sedláček R, Tichý P, Suchý T. Porous composite materials with polyamide reinforcement and siloxane matrix with nano-hydroxyapatite as biomaterials, *Acta Research Reports* 2009;18:1-9.
- [4] Wan YZ, Wang YL, Huang Y, Luo HL, He F, Chen GC. Moisture absorption in a three-dimensional braided carbon/Kevlar/epoxy hybrid composite for orthopaedic usage and its influence on mechanical performance. *Composites: Part A* 2006;37:1480-4.
- [5] Asaoka K, Hirano S. Diffusion coefficient of water through dental composite resin biomaterials. *Biomaterials* 2003;24:975-9.
- [6] Balík K, Sochor M, Hulejová H, Suchý T, Černý M. The influence of short-term tissue culture medium storage on the mechanical properties of composites based on glass fibers and polysiloxane. *Ceramics-Silikáty* 2007;51(4):198-201.

EVALUATION OF PCL AND PCL/HAP SCAFFOLDS PROCESSED BY ELECTROSPINNING AND POROGEN LEACHING TECHNIQUES

IZABELLA RAJZER

ATH, UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,
FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS,
DEPARTMENT OF POLYMER MATERIALS,
WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND
E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

Abstract

In order to improve the pore size of the polycaprolactone (PCL) and polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HAp) nanofibrous scaffolds, salt-leaching technique together with electrospinning method were applied. Salt particles were incorporated within the polymer nanofibrous matrix and then were leached out to generate some macropores. Microstructure, pore size distribution and average fibre diameter of the scaffold were investigated by scanning electron microscopy and PMI capillary flow porometer. Mechanical properties were determined by means of tensile test. Presence of hydroxyapatite and chemical characterization of the scaffold were done by FTIR analysis.

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 4-7]

Introduction

Although the electrospun nanofibrous structure generates a network of open-pores, limited pore size restricts its use in tissue engineering [1-2]. Pore size plays an important role in the ability of a cell to migrate and infiltrate the electrospun scaffolds. In this study electrospinning was combined with salt leaching technique in order to improve the pore size of electrospun nanofibrous scaffold.

Poly(caprolactone) (PCL) is biocompatible, biodegradable and non-toxic polyester. The good solubility of PCL, its low melting point (59-64°C), long-term degradation properties (>24 months to lose total mass) and exceptional blend-compatibility has stimulated extensive research into its potential application in the biomedical field [3]. The advantage in using PCL scaffolds in tissue engineering deals with its desirable biostability [4]. PCL exhibits more prolonged mechanical strength than other bioresorbable polymeric materials and degrades at a rate compatible with the bone regeneration [5]. However its poor hydrophilicity caused a reduction of cell adhesion, proliferation and differentiation. Electrospinning of PCL along with nanoparticles of hydroxyapatite can improve the cell attachment kinetics. Hydroxyapatite (HAp) particles due to its structural and compositional similarity to minerals of natural bone have been widely utilized in the fabrication of bone tissue engineering scaffold [6-9]. PCL/HAp composite scaffolds have an advantage of a more hydrophilic character than pure PCL scaffold, thus a better interaction with the biological environment can be achieved [3]. Beside the existence of bone-bioactive inorganic components within polymer biomaterials generally favors calcium phosphate mineralization followed by an osteogenic differentiation process [10].

This study describes the development and characterization of PCL and PCL/HAp fibrous meshes aimed at application in bone tissue engineering. The scaffolds were prepared by combining electrospinning method and a porogen-leaching technique. Using porogen particles (such as water-soluble inorganic salts) that will dissolve generating a porous structure with pore size depending on the size of porogen particles, an attempt to improve the scaffold porosity was made. The microstructure, porosity and mechanical properties of obtained scaffold were examined.

Materials

Polycaprolactone (PCL) was purchased from Sigma-Aldrich (Mn= 70 000-90 000 g/mol). Chloroform and methanol (POCH, Poland) were used as solvents. Hydroxyapatite was produced at the AGH-UST (Cracow, Poland). An average size of the HAp particles was 23 nm. Fine sodium chloride (POCH, Poland; particle size: 2.5-4.5 µm) was used as porogen.

Scaffold processing

In order to prepare PCL and PCL/HAp composite scaffolds, two types of manufacturing methods were applied: (1) electrospinning (for pure PCL and PCL/HAp composite scaffold) and (2) electrospinning mixed with porogen-leaching technique. The manufacturing began with dissolving 2.5 g of PCL in 40 ml of 1:1 chloroform/methanol solvent mixture at 50°C. PCL solution was mixed with 20 wt% of HAp using sonicator. The solutions were fed into 10 ml plastic syringe fitted with a stainless-steel blunt needle of 0.7 mm in diameter and an injection rate of 1.5 ml/h using an infusion pump. A high voltage of 30 kV was applied. The fibres were collected on a flat collector wrapped with a piece of baking paper sheet which was kept at a distance of 15 cm from the needle tip. In order to obtain PCL-salt (PCL/P) or PCL-salt-HAp (PCL/P/HAp) samples, salt was added over collector during electrospinning. After electrospinning the specimens were immersed in water for salt extraction, and after the salt extraction the samples were dried at 37°C.

Methods

For SEM analysis, the electrospun fibers were sputter-coated with gold (Jeol, JFC 1200 sputer) and observed with SEM (JSM 5500, JEOL). The mean fiber diameters were calculated by selecting 100 fibers randomly observed in the SEM images. Chemical characteristics of the electrospun nanofibrous scaffolds were evaluated by FTIR method using spectrophotometer Nicolet 6700. The spectra were recorded using fotoacoustic reflectance device (MTEC Photoacoustics 300 Thermo Nicolet) at the range of 400-4000 cm⁻¹ using at least 64 scans and 4 cm⁻¹ resolution. The mechanical properties of electrospun samples were measured by uniaxial testing machine (Zwick-Roell Z 2.5.) under the cross-head speed of 1 mm/min (n=3). From the stress-strain curves tensile strength was obtained. Pore size distribution was measured using PMI capillary flow porometer.

Result and Discussion

Porosity is a key factor in designing scaffold for tissue engineering since proper morphology is needed to promote tissue growth, cell infiltration and transportation of nutrients into the scaffold [5]. Electrospinning method allows to obtain a fibrous scaffolds with a high porosity due to the high ratio of surface area to volume.

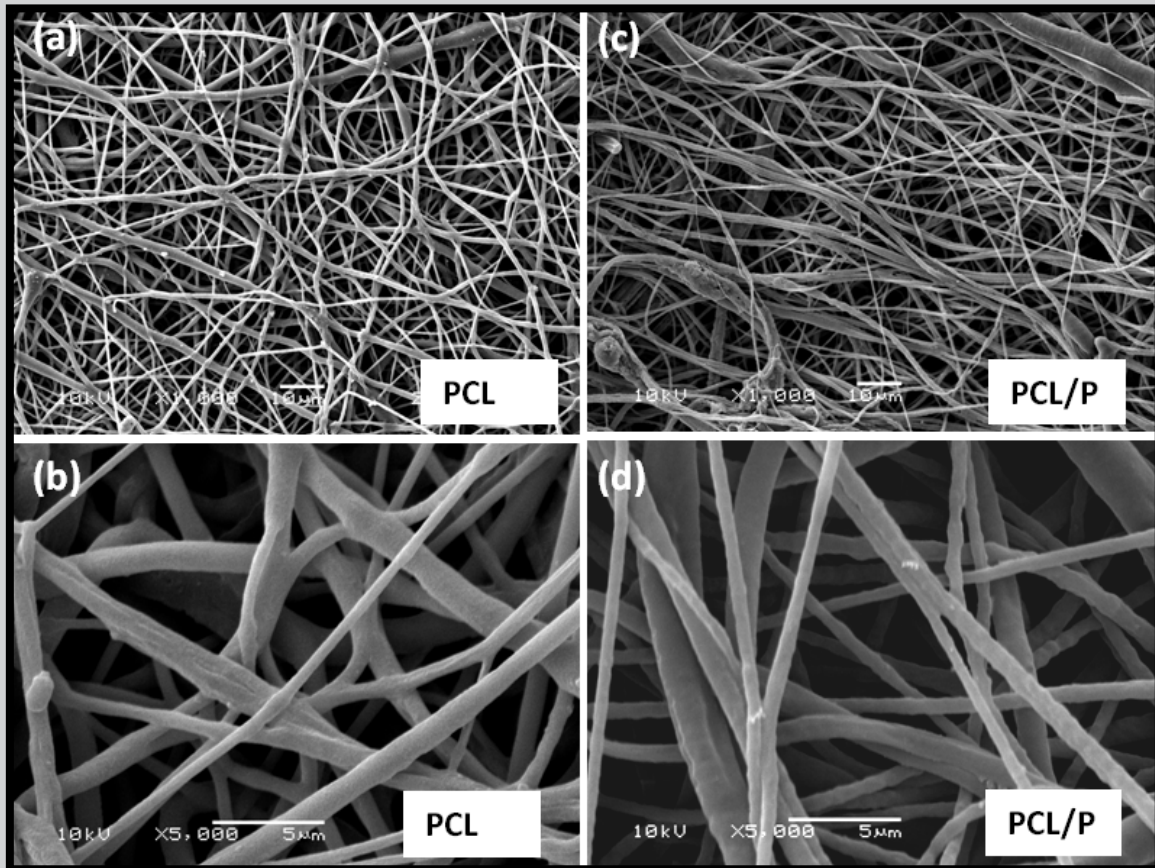


FIG. 1. SEM images of electrospun PCL scaffolds (a-b) and PCL/P scaffolds prepared by mixed electrospinning/particle leaching process (c-d).

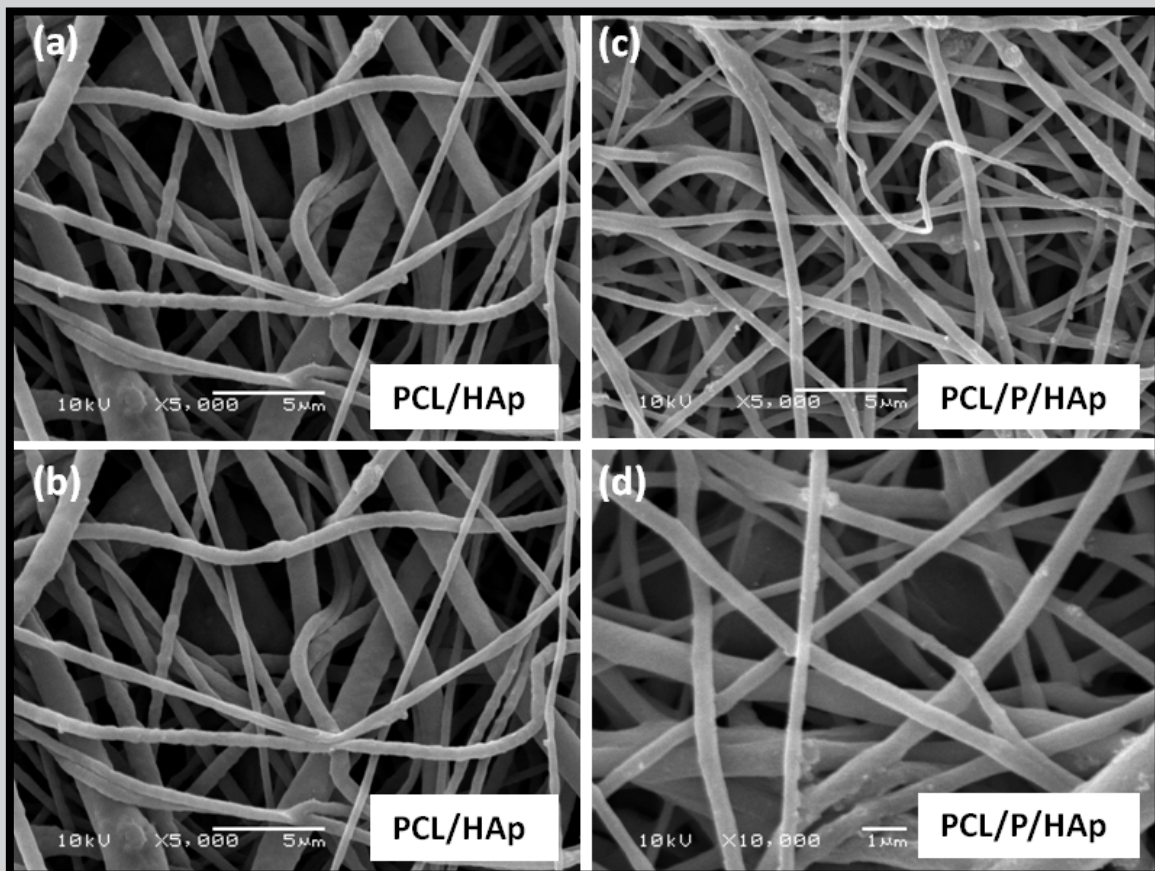


FIG. 2. SEM images of electrospun composite PCL/HAp scaffolds (a-b) and PCL/P/HAp scaffolds prepared by mixed electrospinning/particle leaching process (c-d).

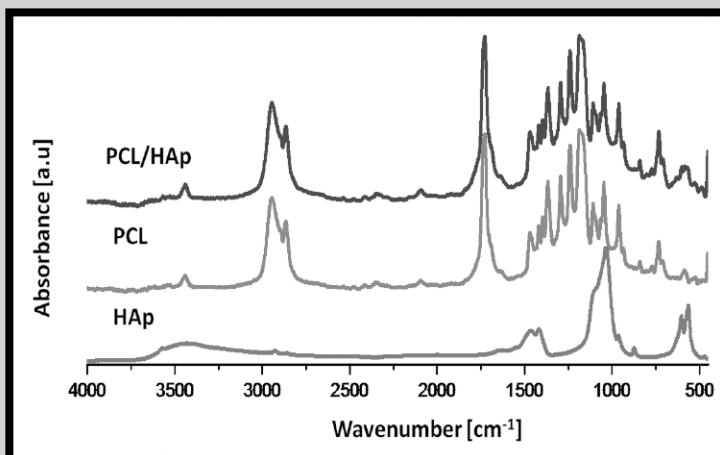


FIG. 3. FTIR spectra of PCL, PCL/HAp and HAp samples.

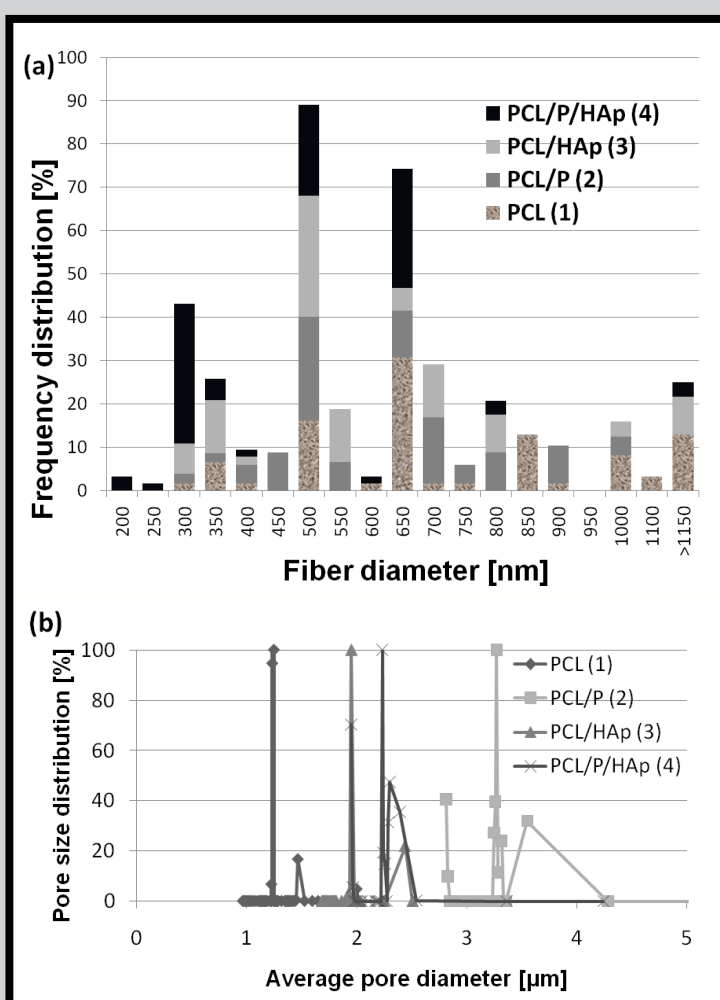


FIG. 4. Fibres diameter distribution for PCL nonwovens (a); Pore size distribution for PCL nonwovens (b).

Depending on the polymer/solvent used and various processing parameters a number of different pore size can be obtained, however the average pore size in scaffold obtained using electrospinning is insufficient.

FIGs 1-2 show the representative morphologies of nanofibers obtained from electrospinning of pure PCL solution (FIG. 1a-b), HAp modified solution (FIG. 2a-b) and samples prepared from the same solutions but obtained by mixed electrospinning/porogen leaching techniques. Pure PCL sample consisted of randomly oriented, smooth, uniform and bead-free nanofibers. The morphology of PCL/HAp sample has not been affected much by the addition of HAp. The FTIR analysis (FIG. 3) confirmed successful incorporation of HAp particles into PCL nonwoven, which was evidenced by the presence of phosphate groups peaks (associated with HAp). The average fiber diameter was about 770 ± 340 nm for pure PCL and $560 \text{ nm} \pm 170$ for modified PCL/HAp sample (FIG. 4a). It was found that addition of hydroxyapatite particles into PCL solution reduces the fiber diameter. Probably the addition of HAp into PCL solution can cause an increase in net charge density during electrospinning and hence a larger force of electrostatic repulsion. The massive increase in electrostatic repulsion tends to increase the surface area and leads to a decrease of fiber diameter. Therefore the average diameter of pure PCL fibers was higher than for PCL/HAp fibers. On the other hand HAp particles agglomerate easily therefore fibers' diameter distribution for both samples is in the range of 300-1150 nm. Porosity of nanofibrous scaffold depends of randomly oriented nature of the nanofibers. In the case of PCL/P and PCL/P/HAp samples, morphology was also slightly influenced by pore-forming agent. Addition of salt during electrospinning resulted in increase of pore size (FIG. 4b). The average diameter of the PCL/P and PCL/P/HAp fibers was about $590 \text{ nm} \pm 170$ and $560 \text{ nm} \pm 290$, respectively. All samples show bimodal distribution of pores size. Pure PCL sample exhibited a very narrow distribution of pore size centered at $1.25 \mu\text{m}$ and $1.5 \mu\text{m}$ whereas for HAp modified sample the main pore fraction was centered at $1.9 \mu\text{m}$ (FIG. 4b). PCL/P sample shows a bimodal distribution of pore size diameter with a significant fraction of porosity in the range of $3.3 \mu\text{m}$ and $3.5 \mu\text{m}$, which is twice higher than for electrospun PCL. In the case of PCL/P/HAp sample the main pore size diameter is in the range of $2.2\text{-}2.5 \mu\text{m}$. Stress-strain curves and tensile strength of electrospun nonwovens are shown in FIG. 5a-b, respectively. It should be considered that higher porosity of PCL/P and PCL/P/HAp nanofibrous scaffold are responsible for their lower mechanical properties as compared with pure PCL and PCL/HAp samples. Unfortunately the mechanical properties were also affected by the incorporation of HAp nanoparticles. Inorganic nanoparticles generally agglomerate easily and cannot be intermixed well. The addition of HAp serves as weak links in PCL. These weak links become stress concentrators in continuum matrix and thus reduce the tensile strength of the composite nanofibers. Therefore the tensile strength of pure PCL was higher than of PCL/HAp sample. Probably the use of dispersant in a further study will considerably reduce aggregation. The tensile strength decreased from 2.22 MPa for pure PCL nonwoven to 1.48 MPa for material obtained by mixed electrospinning/porogen-leaching technique and from 1.33 (PCL/HAp) to 0.92 (PCL/P/HAp).

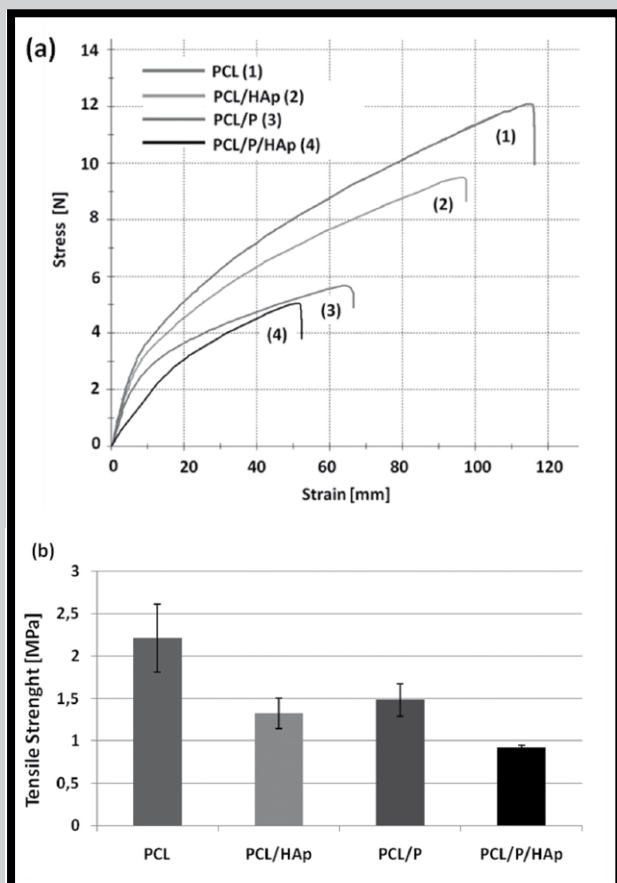


FIG. 5. Stress-strain curves obtained from tensile tests performed on electrospun samples (a). Tensile strength of electrospun nonwovens (b).

Conclusions

In order to mimic both the physical architecture and chemical composition of natural bone, a new method to fabricate porous PCL/HAp composite scaffold was developed in this study. Electrospinning technique has been widely used to fabricate nanofibrous scaffold that mimic native extracellular matrix (ECM), however the average pore size in scaffold obtained using electrospinning is insufficient. It was found in this study that the combined use of two techniques namely electrospinning and porogen-leaching, could be beneficial to fabricate desired pore size and final structure of scaffolds by varying the salt particle size. Pore size ranges of the scaffold could be controlled and the resulting nanofibrous scaffolds could have a predesigned microstructure. The success of a scaffold depends on its ability to provide a functional balance between mechanical strength, porosity and pore size. Therefore future study with the use of different size of porogen particles are needed to be carried out in order to optimize the process parameters.

Acknowledgements

This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education (2010-2013; project number: N N507550938).

References

- [1] L. Zhang, T.J. Webster. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 4 (2009) 66-80.
- [2] T.J. Sill, H.A. von Recum. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29 (2008) 1989-2006.
- [3] M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 1217-1256.
- [4] R. Sravanthi. Preparation and characterization of poly (ϵ -caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications. National Institute of Technology Rourkela (ORISSA). Thesis 2009.
- [5] P. Fabbri, F. Bondioli, M. Messori, C. Bartoli, D. Dinucci, F. Chiellini. Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 343-351.
- [6] H.J. Lee, S.E. Kim, H.W. Choi, C.W. Kim, K.J. Kim, S.C. Lee. The effect of surface-modified nano-hydroxyapatite on biocompatibility of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite nanocomposites.
- [7] X. Liu, L.A. Smith, J. Hu, P.X. Ma. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 30 (2009) 2252-2258.
- [8] A. Bianco, E.D. Federico, I. Moscatelli, A. Camaioni, I. Armentano, L. Campagnolo, M. Dottori, J.M. Kenny, G. Siracusa, G. Gusmano. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/Ca-deficient hydroxyapatite nanohybrids: Microstructure, mechanical properties and cell response by murine embryonic stem cells. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 2063-2071.
- [9] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49 (2008) 5603-5621.
- [10] J.H. Jang, O. Castano, H.W. Kim. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(12) (2009) 1065-1083.

FENOMENOLOGICZNA OCENA DEGRADACJI WYPEŁNIENIA Z KOMPOZYTU POLIMEROWEGO I TKANKI ZĘBA W WARUNKACH CYKLICZNYCH OBCIĄŻEŃ DYNAMICZNYCH

DANIEL PIENIAK¹, AGATA M. NIEWCZAS^{2*}, TERESA BACHANEK², JAROSŁAW BIENIAŚ³

¹ SZKOŁA GŁÓWNA SŁUŻBY POŻARNICZEJ, ZAKŁAD MECHANIKI STOSOWANEJ, UL. SŁOWACKIEGO 52/54, 01-621 WARSZAWA

² KATEDRA I ZAKŁAD STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, UL. KARMELICKA 7, 20-081 LUBLIN

³ KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA LUBELSKA, UL. NADBYSTRZYCKA 36, 20-618 LUBLIN

* E-MAIL: AGATA.NIEWCZAS@UMLUB.PL

Streszczenie

W artykule opisano metodę oceny degradacji struktury zęba ludzkiego poddanego regeneracji kompozytem polimerowym opartym na związkach metakrylanowych. Za miarę degradacji przyjęto stopień zaawansowania procesów zużycia fizyko-mechanicznego odniesiony do granicznego poziomu tego zużycia. Analizowano szczelinę brzeżną oraz mikropęknięcia w warstwie brzegowej twardych tkanek zęba i w materiale wypełnienia. Wykazano, że laboratoryjna obserwacja rozbudowy szczeliny w wybranych obszarach anatomicznej struktury zęba (powierzchnia żucia, wypełnienie-szklivo, wypełnienie-zębina) może być podstawą oceny stopnia degradacji całego układu zęb-wypełnienie. Przeprowadzono badania laboratoryjne, w których wykorzystano zęby ludzkie trzonowe i przedtrzonowe z wypełnieniami ubytków klasy I wg Blacka.

Słowa kluczowe: degradacja, szczelina brzeżna, kompozyt polimerowy, układ zęb-wypełnienie

[Inżynieria Biomateriałów, 103, (2011), 8-12]

Wstęp

Odzyskanie przez ząb leczony zachowawczo zdolności czynnościowej nie eliminuje w całości ryzyka ponownego pojawienia się próchnicy. Przyczyną tego jest między innymi zjawisko nieszczelności brzeżnej, którego konsekwencją jest proces mikroprecieku. Mikropreciek bakteryjny polega na penetracji mikroorganizmów i ich proliferacji w przestrzeni pomiędzy wypełnieniem a ścianą ubytku. Nieszczelność wypełnienia powodowana jest degradacją struktur tkanek zęba, w szczególności szkliva i zębiny oraz samego wypełnienia. Wszystkie te struktury są odmienne pod względem składu oraz właściwości fizyko-mechanicznych. Właściwości fizyko-mechaniczne struktur badanego układu są istotne dla charakterystyki degradacji. Niektóre z nich przedstawiono w TABELI 1.

PHENOMENOLOGICAL EVALUATION OF DEGRADATION OF POLYMER COMPOSITE FILLING AND THE TOOTH TISSUE IN THE CONDITIONS OF CYCLICAL DYNAMIC LOADS

DANIEL PIENIAK¹, AGATA M. NIEWCZAS^{2*}, TERESA BACHANEK², JAROSŁAW BIENIAŚ³

¹ DEPARTMENT OF APPLIED MECHANICS, MAIN SCHOOL OF FIRE SERVICE, 52/54 SŁOWACKIEGO ST., 01-621 WARSZAWA, POLAND

² DEPARTMENT OF CONSERVATIVE DENTISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 7 KARMELICKA ST., 20-081 LUBLIN, POLAND

³ DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING, LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 36 NADBYSTRZYCKA STR., 20-608 LUBLIN, POLAND

* E-MAIL: AGATA.NIEWCZAS@UMLUB.PL

Abstract

The article focuses on the method of degradation of the human tooth structure which was subjected to regeneration by polymer composite based on metacrylate compounds. The degree of advancement of physical and mechanical usage processes related to the limit level of this usage was considered as the measurement of degradation. The marginal fissure and micro-cracks in the border surface of the hard tooth tissues and in the filling material were analyzed. It was revealed that laboratory observation of the fissure expansion in selected areas of anatomical tooth structure (mastication surface, filling-enamel, filling-dentine) may constitute the basis of evaluation of degradation degree of the whole tooth-filling system. The laboratory tests were carried out in which human molars and premolars with the fillings qualified as class I according to Black were used.

Keywords: degradation, marginal fissure, polymer composite, filling-tooth system

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 8-12]

Introduction

Getting back the activity usefulness by a tooth treated preventively does not eliminate totally the risk of another occurrence of caries. One of the reasons of this is the phenomenon of marginal untightness resulting in the process of micro-leak. Bacterial micro-leak deals with microorganism penetration and their proliferation in the space between the filling and the defect wall. Filling untightness is caused by degradation of tooth tissues structures, particularly that of the dentine, enamel and filling. All these structures are different as it comes to their composition and physical and mechanical properties. Physical and mechanical properties of the studied system structures are crucial for characteristics of degradation. Some of them are presented in TABLE 1.

TABELA 1. Niektóre właściwości fizyko-mechaniczne systemu zęb-wypełnienie kompozytowe.
TABLE 1. Selected physical and mechanical properties of the tooth-composite filling system.

Parametr wytrzymałościowy Durability parameter	Struktura zęba Tooth structure			Wypełnienie kompozytowe Composite filling
	Szklivo Enamel	Zębina Dentine	Miazga Pulp	ELS
Moduł Sprężystości / Elasticity modulus [GPa]	48-84,1	14-18,6	2	9
Liczba Poissona / Poisson's factor	0,2-0,33	0,2-0,32	0,45	-
Gęstość / Density [g/cm ³]	2,9	2,1	-	2,08
Mikrotwardość / Micro-hardness [HK]	360-390	75	-	40
Wytrzymałość na zginanie / Bending strength [MPa]	-	-	-	93-132
Współczynnik intensywności naprężeń Coefficient of intensity of stresses [N•mm ^{-3/2}]	0,7-1,5	-	-	-
Skurcz polimeryzacyjny / Polymerization shrinkage [%]	-	-	-	1,64 lin.; 1,3 obj./vol.

Parametry wytrzymałościowe w wielu publikacjach uznawane są jako miary stopnia degradacji – poziomu resztkowych wartości użytkowych materiału [1]. W wielu publikacjach zakłada się, że odporność na wielokrotne mechaniczne obciążenia determinowana jest przez parametry materiału uzyskiwane w konwencjonalnych próbach wytrzymałościowych [2]. Jednakże trzeba zauważyć, że degradacja w rzeczywistych warunkach użytkowania jest wynikiem oddziaływania wymuszeń o charakterze cyklicznym na cały układ oraz interakcji struktur zęba i wypełnienia w wyniku tych wymuszeń.

W przypadku obciążeń siłami zgryzowymi wartości naprężeń maksymalnych uzyskanych metodą MES [3] wynosiły nawet 500 MPa. Występowały one w strefie styku wypełnienia z zębina, na dnie ubytku. Maksymalne pionowe siły zgryzowe (zgodne z kierunkiem osi długiej zęba) mogą wynosić nawet 1000 N [4], powierzchnia kontaktu przeciwnych zębów wynosi od 0,4-2,2 mm² [5], naprężenia w tych warunkach mogą wynosić nawet 0,45-2,5 GPa [4]. W warunkach żucia zęby ludzkie obciążone są dodatkowo siłami ścinającymi, których wektory przebiegają w płaszczyźnie poziomej i skierowane są równoległe do powierzchni żucia. W badaniach własnych prowadzonych przez autorów ustalono, że w przypadku zębów trzonowych, przy założeniu stałej siły zgryzowej równej 400 N ich wartości wynoszą od kilkunastu do kilkudziesięciu N [6].

Metoda

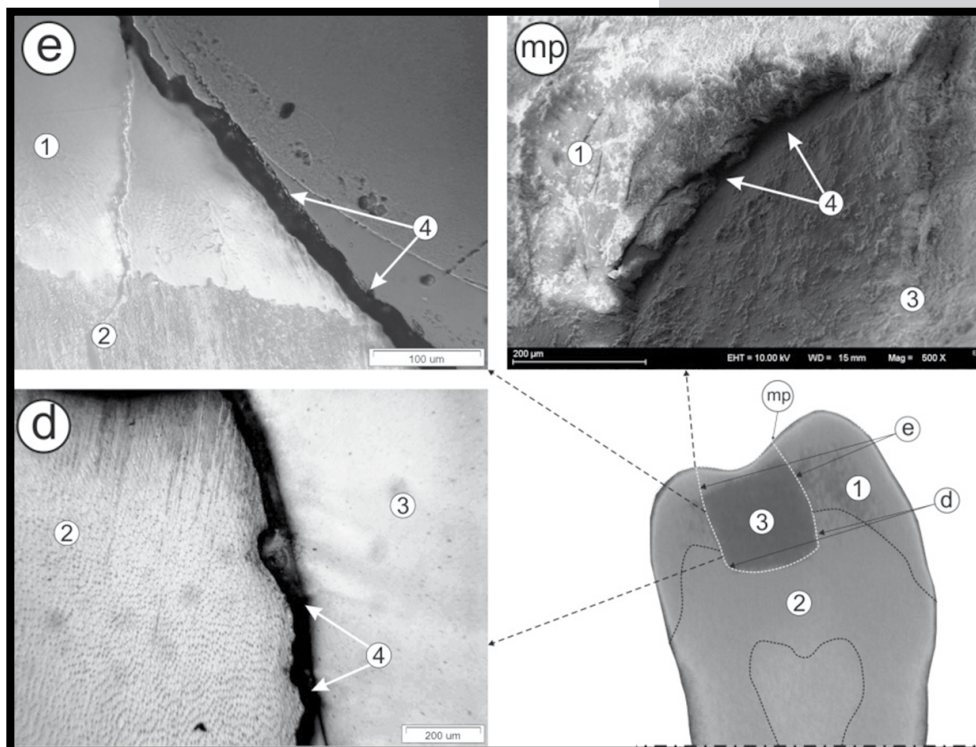
Do badań wykorzystano zęby ludzkie trzonowe i przedtrzonowe. Zęby te usunięto ze względów ortodontycznych i chirurgicznych. W zębach wypreparowano ubytki modelowe klasy I wg. Blacka o głębokości trzech milimetrów umożliwiającej kontakt ze szkliwem i zębina. W ubytkach założono wypełnienia z materiału kompozytowego ELS (Saremco AG) zgodnie ze wskazaniem producenta. Materiał kompozytowy zakładano do ubytku warstwami o grubości ok. 2 mm każda i naświetlano lampą halogenową przez 40 sek. Próbkę zębów przygotowane w sposób opisany powyżej poddano cyklicznym obciążeniom mechanicznym na specjalistycznym stanowisku badawczym symulującym akt żucia [7]. Degradację w obszarze styku tkanek zęba i wypełnienia oceniano za pomocą obserwacji mikroskopowych. W analizie mikroskopowej wyróżniono trzy anatomiczne obszary: powierzchnię żucia (mp), obszar styku wypełnienia ze szkliwem (e), obszar styku wypełnienia z zębina (d) (RYS. 1). Za pomocą mikroskopu SEM prowadzono obserwacje powierzchni żucia. Natomiast w celu oceny degradacji w płaszczyźnie zgodnej z kierunkiem długiej osi zęba (skrośnej) prowadzono obserwacje na mikroskopie optycznym. Przekroje zębów z wypełnieniem wykonano każdorazowo po serii cyklicznych obciążeń.

In numerous publications strength parameters are used as measurements of degradation degree – the level of residual use values of a material [1]. In a number of publications it is assumed that resistance to multiplied mechanical loads is determined by material parameters obtained in the course of conventional strength tests [2]. However, it shall be noticed that degradation in actual consumption conditions results from cyclical stimulation of the whole system as well as interaction of tooth structures and filling being an outcome of such stimulation.

In the case of occlusion forces loads, the values of maximum stresses obtained by MES method [3] amounted to even 500 MPa. They were noticed in the contact area of filling and dentine, at the bottom of the defect. Maximum vertical occlusion forces (compatible with direction of the long tooth axis) may even equal 1000 N [4], contact surface of the opposite teeth equals from 0.4 to 2.2 mm² [5], stresses in such conditions may be as high as 0.45-2.5 GPa [4]. In the conditions of mastication, human teeth are additionally loaded by shearing forces, the vectors of which run horizontally and are directed parallel to the mastication surface. Authors' studies showed that, in the case of molars, in the presence of constant occlusion force equal 400 N, their values amount from a few to tens of N [6].

Method

Human molars and premolars were used in the tests. They had been removed due to surgical and orthodontic reasons. Model defects of class I according to Black each 3 mm deep to enable the contact with the enamel and dentine were prepared. ELS (Saremco AG) composite material was applied to defects in accordance with manufacturer's instructions. Composite material was applied in layers, each 2 mm thick, and exposed to light curing lamp for about 40 seconds. Tooth specimens prepared in the above described manner underwent cyclical mechanical loads at the specially designed research station simulating a mastication act [7]. Degradation in the contact area between tooth tissues and filling was observed under a microscope. In the course of microscope analysis the three anatomical areas were distinguished: mastication surface (mp), contact area between filling and the enamel (e), contact area between filling and the dentine (d) (FIG. 1). Observation of the mastication surface was performed with the use of SEM microscope. In order to evaluate degradation on the surface compatible with the tooth long axis direction (through), optical microscope was used. Tooth sections with a filling were made each time following cyclic loads series.



RYS. 1. Obszary obserwacji mikroskopowych: mp – granica szkliwo-wypełnienie na powierzchni żującej, e – granica szkliwo-wypełnienie, d – granica zębina-wypełnienie, 1 – szkliwo, 2 – zębina, 3 – wypełnienie kompozytowe, 4 – szczelina brzeżna.

FIG. 1. Areas of microscopic observations: mp – border enamel - filling on mastication surface, e – border enamel-filling, d – border dentine-filling, 1 – enamel, 2 – dentine, 3 – composite filling, 4 – marginal crevice.

Wyniki

Miary degradacji mechanicznej

Stwierdzono, że obszar koncentracji największych naprężeń podczas eksploatacji zwykle znajduje się w obszarze styku bryły wypełnienia i tkanki twardej zęba [9,10], co skutkuje największą degradacją w tym obszarze, zainicjowaną skurczem polimeryzacyjnym materiału wypełnienia [8]. Umożliwia to ograniczenie obserwacji układu do tego obszaru i diagnozy stanu – poziomu zasobu użytkowego na podstawie kompleksowej miary stopnia degradacji. Jako miarę stopnia degradacji wybrano parametr diagnostyczny o najbardziej istotnym znaczeniu dla całego układu zęb-wypełnienie. Zgodnie z powyższym jako miarę degradacji mechanicznej układu zęb-wypełnienie przyjęto wymiary geometryczne szczeliny brzeżnej.

Wyniki pomiarów szerokości szczeliny brzeżnej w wyróżnionych strefach anatomicznych struktury zęba zostały poddane kompleksowej analizie statystycznej. Test „post hoc” przeprowadzono w celu oceny różnic między wynikami w kolejnych zakresach obciążenia. Wybrano test HSD Tukey’a dla nierównych licznosci bazujący na analizie kontrastów w analizowanych grupach wyników pomiarów. Nie zaobserwowano istotnych różnic między wynikami wewnątrz grup determinowanych liczbą cykli żucia (MC), we wszystkich anatomicznych strefach pomiaru. Nie wykazano również istotnych różnic między strefami pomiarowymi w próbkach nie poddanych obciążeniu oraz w próbkach po 30000 cykli żucia. Natomiast wyniki uzyskane po 60000 i 100000 cykli żucia różniły się istotnie od wyników uzyskanych we wcześniejszych przedziałach obciążenia oraz między sobą, we wszystkich anatomicznych strefach pomiaru. Następnie, przeprowadzono analizę poziomu uszkodzenia – degradacji *D* układu w oparciu o statystyki opisowe rozkładów szerokości szczeliny (średnią szerokość szczeliny w kolejnych zakresach obciążeń). Degradację układu z wypełnieniem określono wykorzystując zmodyfikowane równanie Hwanga i Hana pozwalające określić procentowo poziom degradacji w przyjętym zakresie obciążenia [11].

Results

Measurements of mechanical degradation

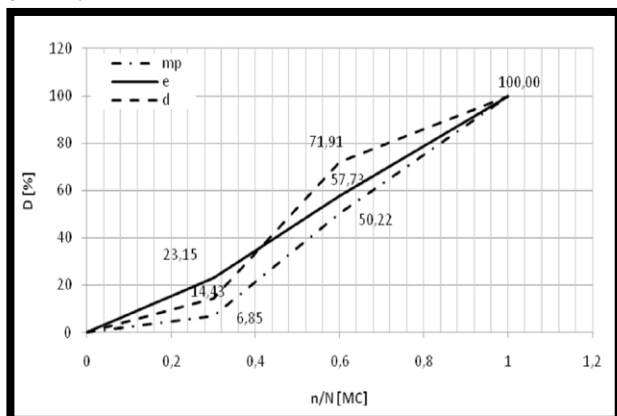
It was observed that the concentration area of the highest stresses during exploitation is usually situated in the contact area of the filling body and the tooth hard tissue [9,10], which results in the most visible degradation in this area, initiated by a polymerization shrinkage of the filling material [8]. This guarantees the limitation of observation of the system to this particular area and the diagnosis of the state – the level of consumption reserve on the basis of complex measurement of degradation degree. Diagnostic parameter of the most crucial significance for the whole tooth-filling system was chosen. In accordance with the above, geometrical sizes of the marginal fissure were accepted as the measurement of mechanical degradation of the tooth-filling system.

Measurement results of the marginal fissure width in the distinguished anatomical zones of the tooth structure were next submitted to the complex statistical analysis. Post hoc test was carried out in order to evaluate the differences between the results in subsequent load ranges. Tukey’s HSD test for unequal representations based on the analysis of contrasts in the analyzed groups of measurement results was chosen. No significant differences determined by a number of mastication cycles (MC) between the results inside the groups were observed in all anatomical zones of the measurement. The same was observed in the case of the specimens which did not undergo a load and in the specimens after 30000 mastication cycles. The results obtained after 60000 and 100000 mastication cycles significantly differed from the ones obtained in the previous load ranges and among each other individually, in all anatomical zones. Next, analysis of the damage degree was performed – degradation *D* of the system based on descriptive statistics of fissure width ranges (mean width of the fissure in subsequent load ranges). Degradation of the system with a filling was determined with the use of modified Hwang and Han’s equation which allows to establish percentage degree of degradation in an accepted load range [11].

$$D = \frac{(x_0 - x_n)}{(x_0 - x_N)}$$

gdzie: D – poziom uszkodzenia, x_0 – średnia szerokość szczeliny brzeżnej dla próbek nie poddanych obciążeniu, x_n – średnia szerokość szczeliny w kolejnych zakresach obciążenia, x_N – średnia szerokość szczeliny dla granicznej liczby cykli obciążeniowych, n – zakres obciążenia cyklicznego, N – graniczna wartość obciążenia cyklicznego.

Graniczną trwałość układu z wypełnieniem przyjęto na poziomie $N = 10^5$ MC. Przebieg funkcji uszkodzenia – degradacji przedstawiono na RYS. 2.



RYS. 2. Przebiegi funkcji degradacji układu w strefach: powierzchni żucia (mp), szkliva (e), zębiny (d).

FIG. 2. Function of degradation in the zones of: mastication surface (mp), enamel (e), dentine (d).

Przedstawione na wykresie przebiegi funkcji degradacji wskazują na stabilny przyrost ryzyka (lub prawdopodobieństwa) uszkodzenia układu zęb-wypełnienie w strefie szkliva (e). Najwyższą zmiennością charakteryzuje się przebieg krzywej degradacji w obszarze zębiny (d). Najniższym poziomem degradacji w kolejnych zakresach obciążenia charakteryzuje się obszar powierzchni żucia (mp). Przebiegi wszystkich krzywych wskazują na stosunkowo stabilny wzrost uszkodzenia. Nie obserwuje się zatrzymania przyrostu degradacji, co w tym konkretnym przypadku oznaczałoby zatrzymanie rozbudowy szczeliny brzeżnej. W przedmiotowych badaniach obserwacja dynamiki rozbudowy szczeliny brzeżnej w zależności od liczby cykli obciążeniowych umożliwia prognozowanie przebiegu procesu degradacji układu zęb-wypełnienie. W tym celu obliczono średnią prędkość propagacji szczeliny w kierunku równoległym do powierzchni żucia zęba [12].

$$v_x = \frac{dx}{dn}$$

gdzie: v_x – prędkość propagacji w kierunku równoległym do powierzchni żucia, x – szerokość szczeliny brzeżnej, n – liczba cykli obciążenia.

Charakterystyki prędkości propagacji (RYS. 3) uzyskane podczas próby cyklicznych obciążeń dynamicznych wykazują współbieżność w obszarze wypełnienie-zębina (d) oraz w obszarze powierzchni żucia (mp) w zakresie liczby cykli obciążeniowych od 0 do 60000 MC. W kolejnym etapie obserwacji (60000 do 100000 MC) występuje stabilizacja prędkości propagacji szczeliny.

$$D = \frac{(x_0 - x_n)}{(x_0 - x_N)}$$

where: D – damage, x_0 – mean value of marginal fissure width for specimens not subjected to load, x_n – mean value of marginal fissure width in subsequent load ranges, x_N – mean value of marginal fissure width for the limit number of load cycles, n – range of cyclical load, N – limit value of cyclical load.

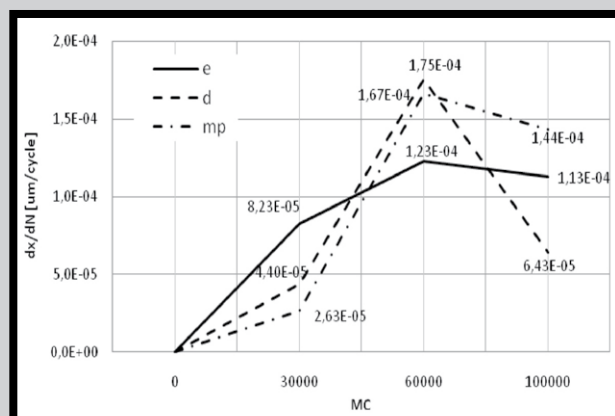
Limit durability of the system with a filling was accepted at the level $N=10^5$ MC. The course of damage – degradation function is presented in FIG. 2.

Degradation functions presented in the diagram point out to the stable risk (or probability) increase of the tooth-filling system damage in the zone of the enamel (e). The degradation curve in the dentine zone (d) can be characterized by the highest variability. The lowest degradation degree in the subsequent load ranges characterizes the area of mastication surface (mp). All curves indicate relatively steady damage increase. No stoppage of degradation degree can be observed, which, in this particular case would mean the retention of the marginal fissure expansion. In the subject studies, observation of the dynamics of the marginal fissure expansion in the relation to the number of load cycles allows for accurate prognosis of the course of the tooth-filling system degradation. In order to achieve this, mean speed of the fissure propagation in the direction parallel to the tooth mastication surface was calculated [12].

$$v_x = \frac{dx}{dn}$$

where: v – propagation speed in the direction parallel to the mastication surface, x – marginal fissure width, n – number of load cycles.

Characteristics of propagation speed (FIG. 3) obtained in the course of cyclic dynamic load tests point out to the existing concurrency in the filling-dentine (d) area and in the mastication area (mp) in the range of the number of load cycles from 0 to 60000 MC. Stabilization of the fissure propagation speed is observed between 60000 to 100000 MC.



RYS. 3. Prędkości propagacji szczeliny brzeżnej w strefach: powierzchni żucia (mp), szkliva (e), zębiny (d).

FIG. 3. Speeds of marginal fissure propagation in the zones of: mastication surface (mp), enamel (e), dentine (d).

1. Stwierdzono, że szczelina brzeżna w systemie zębokompozytowe wypełnienie stomatologiczne, powstająca na skutek skurczu polimeryzacyjnego, powiększa się systematycznie pod wpływem cyklicznych wymuszeń o charakterze dynamicznym.

2. Wykorzystując właściwe testy statystyczne wykazano, że wyniki pomiarów szerokości szczeliny w wybranych obszarach anatomicznej struktury zęba mogą być podstawą do obliczeń i analizy poziomu degradacji układu zęb-wypełnienie.

3. Stwierdzono, że dynamika degradacji wypełnienia oceniana na podstawie pomiarów szerokości szczeliny brzeżnej w warunkach próby obciążeń mechanicznych różni się w odmiennych obszarach anatomicznych zęba. W większości przypadków degradacja układu była większa w obszarze zębiny niż w obszarze szkliwa i na powierzchni żucia. Zjawisko to jest najprawdopodobniej spowodowane dużymi różnicami właściwości fizyko-mechanicznych struktur kompozytu polimerowego oraz zębiny, a w szczególności niekorzystnym rozkładem naprężeń w tej strefie dla wypełnień I klasy wg Blacka.

4. Degradacja wypełnienia kompozytowego w praktyce stomatologicznej nie powinna być oceniana jedynie na podstawie obserwacji powierzchni żucia ponieważ stan układu na powierzchni żucia nie zawsze jest reprezentatywny dla całego układu. Wnioskowanie o degradacji jedynie na podstawie obserwacji ograniczonych do powierzchni żucia układu może prowadzić do przeszacowania trwałości wypełnienia.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy.

Conclusions

1. It was revealed that the marginal fissure in the tooth-composite dental filling system which forms as a result of polymerization shrinkage systematically grows when exposed to cyclical load stimulation of dynamic nature.

2. With the use of relevant statistical tests, it was revealed that measurement results of the marginal fissure width in selected areas of the anatomical tooth structure may constitute the basis for calculations and analysis of the tooth-filling system degradation.

3. It was observed that the dynamics of the filling degradation assessed on the basis of the marginal fissure widths measurements in the conditions of mechanical load tests differs in diverse anatomical areas of the tooth. In majority of cases, the system degradation was greater in the dentine area as compared with the enamel and mastication areas. This is probably caused by big differences of physical and mechanical properties of polymer composite structures and those of the dentine and in particular, by a negative distribution of stresses in this zone for class I fillings according to Black.

4. Degradation of composite filling in dental practice should not be evaluated solely on the basis of the observation of the mastication surface because the state of the system in the mastication area is not always representative for the whole system. Conclusions concerning degradation made exclusively on the basis of observations limited to the system mastication surface may lead to overestimation of the filling durability.

Acknowledgements

Presented work was financed from the scientific funds in the years 2008-2011 as a research project.

Piśmiennictwo

- [1] Papadogiannis Y., Lakes R.S., Palaghias G., Helvatjoglu-Antoniades M., Papadogiannis D. Fatigue of packable dental composites. *Dental Materials* 23 (2007), s. 235-242.
- [2] Htang A., Ohsawa M., Matsumoto H. Fatigue resistance of composite restorations: effect of filler content. *Dental Materials* 11 (1995), s. 7-13.
- [3] Ausiello P., Apicella A., Davidson C.L. Effect of adhesive layer properties on stress distribution in composite restorations – a 3D finite element analysis. *Dental Materials* 18 (2002), s. 295-303.
- [4] Li Hong He, Swain M. V., Understanding the mechanical behavior of human enamel from its structural and compositional characteristics, *J Mech Behav of Biomed Mat* 1 (2008), 18-29.
- [5] Hayasaki, H., Okamoto, A., Iwase, Y., Yamasaki, Y., Nakata, M., 2004. Occlusal contact area of mandibular teeth during lateral excursion. *Int. J. Prosthodont.* 17, 72-76.
- [6] Niewczas A. M., Pieniak D., Bachanek T., Surowska B., Bienias J., Pałka K., Prognosing of functional degradation of bio-mechanical systems exemplified by the tooth-composite filling system, *Eksploatacja i Niezawodność - Maintenance and Reliability*, 2010, 1 (45), 23.

References

- [7] Hunicz J, Niewczas A. M., Kordos P, Pieniak D. Experimental test stand for analysis of composite dental fillings degradation. *Eksploatacja i Niezawodność - Maintenance and Reliability*, 2007, 2, 37-43.
- [8] Ausiello P., Apicella A., Davidson C.L., Rengo S. 3D – finite element analyses of cusp movements in human upper premolar, restored with adhesive resin – based composites; *Journal of Biomechanics*, 34 (2001), s. 1269-1277.
- [9] Davidson C.L., Davidson - Kaban S.S. Handling of mechanical stresses in composite restorations. *Dental Update* 25 (1998), s. 274-279.
- [10] Davidson C. L., Feilzer A. J. Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *Journal of Dentistry* 25 (1997), s.435-440.
- [11] Topoliński T. Zmęczenie tworzyw polimerowych. Mechanizmy zniszczenia, fenomenologiczne hipotezy procesu zmęczeniowego niszczenia; w *Metody doświadczalne w zmęczeniu materiałów i konstrukcji* red. J. Szala, wyd. ATR w Bydgoszczy, Bydgoszcz 2000.
- [12] Ochelski S. *Metody doświadczalne mechaniki kompozytów konstrukcyjnych*. wyd. WNT, Warszawa 2004.

WPLÝW POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) NA EKSPRESJĘ I AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY ALKALICZNEJ W LUDZKICH KOMÓRKACH OSTEOGENNYCH

JOANNA LESZCZYŃSKA¹, JOANNA WÓJTOWICZ¹,
RADOSŁAW OLKOWSKI¹, JUSTYNA KOMASA², PIOTR ULAŃSKI²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL^{1*}

¹ ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

² MIĘDZYRESORTOWY INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ,
WYDZIAŁ CHEMICZNY, POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

* E-MAIL: MALGORZATA.LEWANDOWSKA-SZUMIEL@WUM.EDU.PL

Streszczenie

Poli(ϵ -kaprolakton) jest materiałem wykorzystywanym jako rusztowanie dla komórek w inżynierii tkankowej kości. Na podstawie danych z literatury oraz naszych własnych badań nad reakcją komórek osteogennych na bezpośredni kontakt z poli(ϵ -kaprolaktonem) można przypuszczać, iż materiał ten może wpływać na poziom markerów różnicowania komórek w kierunku osteoblastów. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu poli(ϵ -kaprolaktonu) na ekspresję oraz aktywność wczesnego markera procesu różnicowania komórek osteogennych, jakim jest fosfataza zasadowa. Przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR) analizowano ekspresję genu fosfatazy zasadowej natomiast aktywność enzymu oznaczono kolorymetrycznym testem firmy Sigma. Otrzymane wyniki wskazują, iż kontakt ludzkich osteoblastów z powierzchnią poli(ϵ -kaprolaktonu) powoduje podwyższoną ekspresję genu fosfatazy zasadowej oraz podwyższoną aktywność tego enzymu. Fosfataza zasadowa nie jest specyficznym markerem osteoblastów, jednakże jej podwyższony poziom towarzyszy wczesnym etapom różnicowania w kierunku fenotypu komórek osteogennych. Uzyskane wyniki uzasadniają podjęcie dalszych badań nad możliwym wpływem poli(ϵ -kaprolaktonu) na różnicowanie osteoblastów.

Słowa kluczowe: poli(ϵ -kaprolakton), osteoblasty, fosfataza zasadowa, różnicowanie

[Inżynieria Biomateriałów, 103, (2011), 13-16]

Wprowadzenie

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest biodegradowalnym polimerem należącym do grupy poliestrów alifatycznych. Materiał ten ze względu na swoje właściwości stanowi obiecujące rusztowanie dla komórek w dziedzinie inżynierii tkankowej (TEP ang. Tissue Engineering Product). W ostatnich latach PCL stał się przedmiotem wielu badań mających na celu wykorzystanie go jako potencjalnego materiału w regeneracji kości [1-4]. W dziedzinie tej dąży się do otrzymania materiału, którego funkcja nie powinna ograniczać się tylko do tworzenia substytutu tkanki kostnej, ale który również posiadałby zdolności osteoindukcyjne.

THE EFFECT OF POLY (ϵ -CAPROLACTONE) ON THE EXPRESSION AND ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN HUMAN OSTEOGENIC CELLS

JOANNA LESZCZYŃSKA¹, JOANNA WÓJTOWICZ¹,
RADOSŁAW OLKOWSKI¹, JUSTYNA KOMASA², PIOTR ULAŃSKI²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL^{1*}

¹ DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004, WARSAW, POLAND

² INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY,
FACULTY OF CHEMISTRY, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 LODZ, POLAND

* E-MAIL: MALGORZATA.LEWANDOWSKA-SZUMIEL@WUM.EDU.PL

Summary

Poly(ϵ -caprolactone) is a material used as a scaffold for cells in bone tissue engineering. On the basis of data from literature as well as own research it was concluded that this material can influence the levels of markers of cell differentiation towards osteoblasts. The aim of this paper was to investigate the effect of poly(ϵ -caprolactone) on the expression and the activity of the early marker of the cell osteogenic differentiation process – alkaline phosphatase (ALP). Using the quantitative real time polymerase chain reaction (real-time PCR) gene expression of the alkaline phosphatase was analyzed; however, the activity of the enzyme was determined with colorimetric assay from the Sigma company. The obtained results indicated that the contact of human osteoblasts with the surface of poly(ϵ -caprolactone) causes an increased gene expression of alkaline phosphatase and an increased activity of this enzyme. Although a high level of ALP does not prove the PCL influence on the osteogenic differentiation of cells into mature osteoblasts, because this enzyme is a non-specific marker of the differentiation process. The obtained results justify undertaking further studies on the possible impact of poly(ϵ -caprolactone) on osteoblast differentiation.

Keywords: poly(ϵ -caprolactone), osteoblasts, alkaline phosphatase, differentiation

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 13-16]

Introduction

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biodegradable aliphatic polyester. Due to its properties, this material is a promising scaffold for cells in the field of tissue engineering (TEP – Tissue Engineering Product). In recent years, PCL has become the subject of many studies aimed at using it as potential material in bone regeneration [1-4]. In this field it is aspired to receive a material whose function would not be limited to creating a substitute of the bone tissue, but which would also have osteoinduction ability. The possibility of stimulating human mesenchymal cells, obtained from fat tissue, toward osteoblasts, on the surface of poly(ϵ -caprolactone) was demonstrated by Reed et al. [5].

Możliwość stymulowania ludzkich komórek mezenchymalnych otrzymywanych z tkanki tłuszczowej w kierunku osteoblastów, na powierzchni poli(ϵ -kaprolaktonu) wykazał Reed i wsp. [5]. Także wcześniejsze dotychczas nieopublikowane wyniki badań naszego zespołu, przeprowadzone z użyciem PCL, którego powierzchnię w różny sposób zmodyfikowano sugerują, iż materiał ten wpływa na podwyższenie aktywności wczesnego markera różnicowania komórek osteogennych, fosfatazy zasadowej (ALP) w hodowli ludzkich osteoblastów. Wskazują one między innymi, iż w przypadku komórek będących w bezpośrednim kontakcie z poli(ϵ -kaprolaktonem), którego powierzchnię trawiono wodorotlenkiem sodu, odnotowano aż 4-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do wartości otrzymanych na powierzchni standardowego naczynia hodowlanego. Dlatego też w niniejszej pracy postawiono sobie za cel ocenę wpływu poli(ϵ -kaprolaktonu) na ekspresję oraz aktywność fosfatazy zasadowej w ludzkich prawidłowych komórkach kościotwórczych, które z powodzeniem wykorzystywane są w inżynierii tkankowej kości [6-7].

Materiały i metody

Do doświadczeń użyto krążków wykonanych z poli(ϵ -kaprolaktonu) o średnicy 15 mm i wysokości 2 mm. Poli(ϵ -kaprolakton) (Aldrich, nominalna wartość $M_n = 80$ kDa, $M_w/M_n < 2$) oczyszczono przez rozpuszczenie w acetonie (6% w/v, 40°C, 24 h), wytrącenie przy intensywnym mieszaniu w wodzie destylowanej o temperaturze pokojowej, płukanie z ciągłym mieszaniem w wodzie destylowanej przez 48 h stosując częstą wymianę wody i suszenie próżniowe.

Krążki z PCL otrzymano za pomocą następującej procedury. Oczyszczony PCL zamrożono w ciekłym azocie i zmielono w młynku laboratoryjnym. Naważki polimeru (0,41 g) wsypało do cylindrycznych studzienek (średnica 15 mm, głębokość 2 mm) w teflonowej formie. Formę umieszczono w suszarce próżniowej, usunięto powietrze, po czym podniesiono temperaturę do 80°C (tj. około 20 stopni powyżej temperatury topnienia PCL) na czas niezbędny do stopienia polimeru i równomiernego wypełnienia studzienek. Po schłodzeniu formę rozebrano, krążki wyjęto z formy, zapakowano próżniowo i wysterylizowano promieniowaniem gamma (25 kGy).

W badaniach wykorzystywano ludzkie prawidłowe komórki osteogenne (HBDC z ang. Human Bone Derived Cells) izolowane z fragmentów kości pozyskiwanych podczas zabiegów chirurgicznych (Zakład posiada zgodę Komisji Etycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego) zgodnie z procedurą opisaną przez Gallaghiera [8] i zmodyfikowaną przez Kudelską-Mazur [9]. Komórki hodowano przez 21 dni na powierzchni poli(ϵ -kaprolaktonu) oraz standardowego naczynia hodowlanego (szalki 24-dołkowe (Nunc)), służącego jako materiał kontrolny. Pożywkę hodowlaną stanowił Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS) (Gibco), 1% L-glutaminy (Gibco), 1% mieszaniny antybiotyków (Gibco) i 100 μ M witaminy C (Sigma), wzbogacony czynnikami różnicującymi: 10 nM deksametazonem (Sigma), witaminą D3 oraz 10 mM beta-glicerofosforanem (Sigma). Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, przy kontrolowanej wilgotności względnej i 5-procentowej zawartości CO₂.

W wybranych punktach czasowych, tj.: 1, 7, 14 i 21 dnia oznaczano ilość kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), ekspresję oraz aktywność fosfatazy zasadowej w hodowli komórek osteogennych. Do pomiaru ilości DNA, pozwalającej uzyskać informacje o liczbie komórek, a tym samym o ich przeżywalności, posłużył test PicoGreen (Invitrogen), polegający na fluorescencyjnym barwieniu DNA.

Also, earlier findings of our team (unpublished data) carried out with use of PCL, with different surface modifications, suggested that this material influences the increase of the activity of the early marker of osteogenic cell differentiation – alkaline phosphatase (ALP) in the culture of the osteoblastic cellular line MG-63. These findings demonstrated that in the case of cells being in direct contact with poly(ϵ -caprolactone), whose surface was etched with sodium hydroxide, the activity of ALP was as much as 4 times higher in relation to the value received on the surface of the standard tissue culture dishes. Therefore, the present work aims to assessing the impact of poly(ϵ -caprolactone) on the expression and activity of alkaline phosphatase in human bone derived cells that have successfully been used in bone tissue engineering [6,7].

Materials and methods

The poly(ϵ -caprolactone) (Aldrich, nominal $M_n = 80$ kDa, $M_w/M_n < 2$) was purified by dissolving in acetone (6% w/v, 40°C, 24 h), precipitation in distilled water at R.T. upon intensive stirring, rinsing in distilled water at constant stirring for 48 h with frequent water exchange followed by vacuum drying.

PCL discs were prepared by the following procedure. The purified PCL was frozen in liquid nitrogen and ground in a laboratory mill. Pre-weighed amounts (0.41 g) of the polymer were poured into cylindrical wells (15 mm diameter, 2 mm depth) of a Teflon mould. The mould was placed in a vacuum oven, air was removed and the temperature was subsequently increased to 80°C (i.e. ca. 20 degrees above the melting point of PCL) for a short time necessary for the polymer to melt and fill the wells uniformly. After cooling, the mould was disassembled, the solidified PCL discs were removed from the mould, vacuum-packed and sterilized by gamma rays (25 kGy).

Human bone derived cells (HBDCs) isolated from the postsurgery trabecular bone chips which would otherwise be discarded were used in the study. All procedures were approved by the Local Ethics Committee of the Warsaw Medical University. The isolation procedure was based on the protocols described by Gallagher [8], with modification [9]. The cells were cultured for 21 days on the poly(ϵ -caprolactone) surface and standard tissue culture (24-well plate (Nunc)) surface to serve as a control material. The culture medium consisted of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco), 1% antibiotic-antimycotic mixture (Gibco), 100 μ M L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma) and differentiation factors, such as 10 nM dexamethazone (Sigma), vitamin D3 and 10 mM beta-glycerophosphate (Sigma). The cells were maintained in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

The amount of deoxyribonucleic acid (DNA), expression and the activity of alkaline phosphatase in the osteogenic cells were determined at selected time points: on 1, 7, 14 and 21 day of culture. For the measurement of the DNA content, which indicates the cell number and their survivability, PicoGreen assay (Invitrogen) was used, where DNA is subject to fluorescent staining.

Gene expression of alkaline phosphatase was analyzed using quantitative real time polymerase chain reaction (Real-time PCR). For this purpose, total RNA was isolated using the RNasy Micro Kit (Qiagen) and reverse transcribed into cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Gene amplification and detection was performed with Step One 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using FAM labeled primers for the qRT-PCR (Applied Biosystems). The internal control for the target RNA alkaline phosphatase (ALP; Hs01029144_m1) was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Hs99999905_m1).

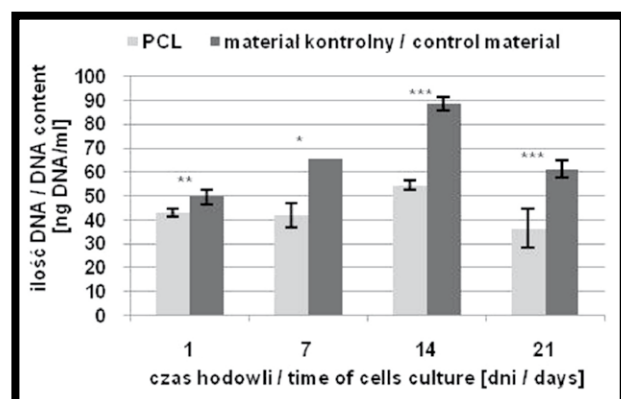
Ekspresję genu fosfatazy zasadowej analizowano z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR). W tym celu przy użyciu kitu RNasy Micro Kit (Qiagen) wyizolowano całkowite RNA, które następnie zostało przepisane na cDNA za pomocą High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją. Amplifikacja i detekcja genu została przeprowadzona w trakcie jednej reakcji z wykorzystaniem systemu Step One 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystem), zawierającego wyznaczone fluorescencyjnie (FAM) startery. Kontrolę endogenną dla ekspresji fosfatazy zasadowej (ALP; Hs01029144_m1) stanowiła dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH; Hs99999905_m1). W celu wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanego genu zastosowano metodę komparatywną ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Aktywność ALP oznaczano w lizatach, metodą kolorymetryczną, w której wykrywany jest barwny produkt reakcji, przy użyciu kitu Alkaline Phosphatase Activity assay (Sigma). Aktywność fosfatazy zasadowej została znormalizowana do ilości DNA w komórkach.

Wszystkie oznaczenia przeprowadzono niezależnie na komórkach pozyskanych od dwóch różnych dawców.

Wyniki i dyskusja

Zarówno na materiale testowanym – poli(ϵ -kaprolakton), jak i kontrolnym do 14 dnia następował przyrost ilości DNA, świadczący o wzroście liczby komórek, natomiast 21 dnia obserwowano spadek ilości DNA w hodowli (RYS. 1), co może świadczyć o zahamowaniu wzrostu liczby komórek związanym z ich przejściem w fazę różnicowania w kierunku dojrzałych osteoblastów. Faza ta charakteryzuje się zahamowaniem proliferacji komórek i wzrostem ekspresji markerów typowych dla fenotypu komórek będących w trakcie różnicowania, takich jak fosfataza zasadowa, kolagen typu I, osteopontyna czy osteokalcyna [10]. Na powierzchni PCL przeżywalność komórek była niższa w stosunku do wartości otrzymanych dla standardowego naczynia hodowlanego. Może to wynikać z faktu, iż mniejsza liczba komórek bezpośrednio po wysianiu zaadherowała do powierzchni poli(ϵ -kaprolaktonu) w porównaniu z podłożem kontrolnym.



RYS. 1. Ilość DNA w hodowli komórek osteogenicznych. Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

FIG. 1. DNA content in bone derived cells culture. The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

Changes in the relative expression of the target gene were calculated using $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

ALP activity was determined in cell lysates, using a colorimetric method that detected the color reaction product using the Alkaline Phosphatase Activity assay (Sigma). Alkaline phosphatase activity was normalized to the amount of DNA in the cells.

All assays were carried out independently on cells obtained from two different donors.

Results and Discussion

Both on the tested material – poly(ϵ -caprolactone) – and on the control material up to 14th day took place an increase in the DNA content, which indicates an increase in the cell number, however, on 21st day a decrease in the amount of DNA was observed in the cell culture (FIG. 1), suggesting a setback of the growth of the cell number associated with the *transition phase* from proliferation to *differentiation into mature osteoblasts*. The differentiation phase is characterized by an inhibition of cell proliferation and an increase of the expression of markers which are typical for the phenotype of cells that are in the process of differentiation, including alkaline phosphatase, type I collagen osteopontin and osteocalcin [10]. On the surface of PCL the survivability of cells was lower compared to the values obtained for the standard tissue culture dishes. It may have resulted from the fact that a lower number of cells adhered directly after seeding to the surface of the poly(ϵ -caprolactone) in comparison with the control material.

The ALP mRNA expression was higher in the cell culture on poly(ϵ -caprolactone) compared to the control material and reached the highest value on day 7 of culture (FIG. 2). In a similar way to the gene expression, the phosphatase activity in cells cultured on the surface of PCL was higher than the values received for the control material. In the case of cells cultured in direct contact with the poly(ϵ -caprolactone), there was observed an up to 10-fold increase in the ALP activity on day 14, compared to day 1, while on the tissue culture dish surface only a 5-fold increase in the enzyme activity was noted (FIG. 3). The increased expression and the activity of this early marker of osteogenic differentiation, the alkaline phosphatase, may attest to the fact that the cells entered the path of differentiation [11]. However, the ALP is a non-specific marker of differentiation [12] and only on the basis of its elevated level it cannot be clearly inferred about cell differentiation towards osteoblasts.

Conclusions

The contact of human osteoblasts with the surface of poly(ϵ -caprolactone) causes an increased gene expression of alkaline phosphatase and an increased alkaline phosphatase activity. The high level of ALP, both on the RNA level as well as on the protein, does not prove the impact of the PCL on the differentiation process of osteogenic cells into mature osteoblasts, because this enzyme is a non-specific marker of the differentiation process. However the obtained results justify undertaking further studies on the possible impact of poly(ϵ -caprolactone) on osteoblast differentiation.

Acknowledgments

This study was supported by a research grant No. WB1/2010 financed by the Medical University of Warsaw and by a grant No 3 T08A 001 30 financed by the Polish Ministry of Science and Higher Education.

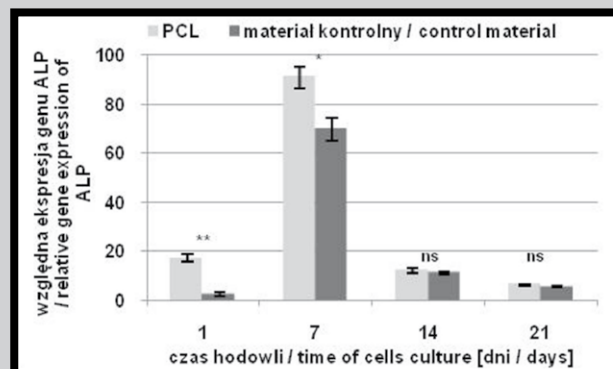
Ekspresja mRNA ALP była wyższa w hodowli na poli(ϵ -kaprolaktonie) w stosunku do podłoża kontrolnego i największą wartość osiągnęła 7 dnia hodowli (RYS. 2). Analogicznie do ekspresji genu, aktywność fosfatazy dla komórek hodowanych na powierzchni PCL przewyższała wartości otrzymane dla kontroli. W przypadku komórek hodowanych w bezpośrednim kontakcie z poli(ϵ -kaprolaktonem) 14 dnia obserwowano aż 10-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do dnia 1, zaś na podłożu standardowym odnotowano tylko 5-krotny wzrost aktywności enzymu (RYS. 3). Podwyższona ekspresja oraz aktywność tego wczesnego markera różnicowania osteogennego jakim jest fosfataza zasadowa mogą świadczyć o tym, iż komórki weszły na drogę różnicowania [11]. ALP nie jest jednak specyficznym markerem różnicowania [12] i tylko na podstawie jej podwyższonego poziomu nie można jednoznacznie wnioskować o różnicowaniu komórek w osteoblasty.

Wnioski

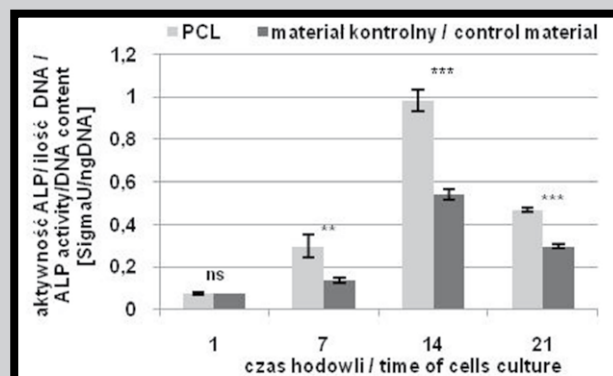
Kontakt ludzkich komórek izolowanych z tkanki kostnej z powierzchnią poli(ϵ -kaprolaktonu) powoduje podwyższoną ekspresję genu fosfatazy zasadowej oraz podwyższoną aktywność tego enzymu. Fosfataza zasadowa nie jest specyficznym markerem osteoblastów, jednakże jej podwyższony poziom towarzyszy wczesnym etapom różnicowania w kierunku fenotypu komórek osteogennych. Uzyskane wyniki uzasadniają podjęcie dalszych badań nad możliwym wpływem poli(ϵ -kaprolaktonu) na różnicowanie osteoblastów.

Podziękowania

Praca zrealizowana w ramach projektu WB1/2010 finansowanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny oraz badawczego projektu własnego MNiSzW Nr 3 T08A 001 30.



RYS. 2. Ekspresja genu fosfatazy zasadowej (ALP). Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).
FIG. 2. Gene expression of alkaline phosphatase (ALP). The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).



RYS. 3. Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP). Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).
FIG. 3. Alkaline phosphatase activity (ALP). The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

Piśmiennictwo

- [1] Roosa S.M., Kempainen J.M., Moffitt E.N., Krebsbach P.H., Hollister S.J.: The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *Journal of Biomedical Materials Research* 92 (2010) 359-68.
- [2] Schuckert K.H., Jopp S., Teoh S.H.: Mandibular Defect Reconstruction Using Three-Dimensional Polycaprolactone Scaffold in Combination with Platelet-Rich Plasma and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: De Novo Synthesis of Bone in a Single Case. *Tissue Engineering* 15 (2009) 493-499.
- [3] Aronin C.E., Cooper J.A., Sefcik L.S., Tholpady S.S., Ogle R.C., Botchwey E.A.: Osteogenic differentiation of dura mater stem cells cultured in vitro on three-dimensional porous scaffolds of poly (ϵ -caprolactone) fabricated via co-extrusion and gas foaming. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1187-1197.
- [4] Zreiqat H., Ramaswamy Y., Wu C., Paschalidis A., Lu Z., James B., Birke O., McDonald M., Little D., Dunstan C.R.: The incorporation of strontium and zinc into a calcium-silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31 (2010) 3175-3184.
- [5] Reed C.R., Han L., Andrady A., Caballero M., Jack M.C., Collins J.B., Saba S.C., Lobo E.G., Cairns B.A., Aalst J.A.: Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds. *Annals of Plastic Surgery* 62 (2009) 505-512.
- [6] Woźniak P., Bil M., Ryszkowska J., Wychowański P., Wróbel E., Ratajska A., Hoser G., Przybylski J., Kurzydowski K.J., Lewandowska-Szumieł M.: Candidate bone-tissue-engineered product based on human-bone-derived cells and polyurethane scaffold. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2484-2493.

References

- [7] Causa F., Netti P.A., Ambrosio L., Ciapetti G., Baldini N., Pagani S., Martini D., Giunti A.: Poly- ϵ -caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *Journal of Biomedical Materials Research* 76A (2006) 151-162.
- [8] Gallagher J.A., Gundle R., Beresford J.N.: Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblasts) from human bone. *Methods in Molecular Medicine* 2 (1996) 233-62.
- [9] Kudelska-Mazur D., Lewandowska-Szumieł M., Mazur M., Komender J.: Osteogenic cell contact with biomaterials influences phenotype expression. *Cell and Tissue Banking* 6 (2005) 55-64.
- [10] Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S.: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology* 143 (1990) 420-430.
- [11] Quarles L.D., Yohay D.A., Lever L.W., Caton R., Wenstrup R.J.: Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research* 7 (1992) 683-692.
- [12] Whited B.M., Whitney J.R., Hofmann M.C., Xu Y., Rylander M.N.: Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. *Biomaterials* 32 (2011) 2294-2304.

CYTOKOMPATYBILNOŚĆ BIOMATERIAŁÓW ZŁOŻONYCH Z PLGA/PLLA MODYFIKOWANYCH KRZEMIONKĄ PRZEZNACZONYCH DO REGENERACJI TKANKI KOSTNEJ

JOANNA LESZCZYŃSKA¹, JOANNA WÓJTOWICZ¹,
STANISŁAW SŁOMKOWSKI², STANISŁAW SOSNOWSKI²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL^{1*}

¹ ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA

² CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH I MAKROMOLEKULARNYCH,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. SIENKIEWICZA 112, 90-363 ŁÓDŹ, POLSKA

* E-MAIL: MALGORZATA.LEWANDOWSKA-SZUMIEL@WUM.EDU.PL

Streszczenie

Zastosowanie rusztowań poliestrowych jako biomateriałów dla regeneracji tkanki kostnej jest szeroko podejmowanym tematem badawczym. Udowodniono, że zastosowanie ceramicznych napelnaczy wpływa na poprawę cytokompatybilności, wytrzymałości mechanicznej oraz możliwości kontroli degradacji materiałów poliestrowych. W niniejszej pracy poddano obserwacjom *in vitro* kopolimer poli(kwasu-D,L-mlekowego-ko-glikolowego) (PLGA/PLLA) z domieszką poli(L,L-laktydu) (PLLA) modyfikowany krzemionką – jako potencjalny materiał na rusztowania do regeneracji tkanki kostnej. W siódmym dniu hodowli na badanym materiale zaobserwowano wysoką przeżywalność ludzkich komórek osteogennych oraz podwyższoną aktywność fosfatazy zasadowej w stosunku do hodowli kontrolnej, tj. na powierzchni standardowego polistyrenowego naczynia hodowlanego. Prawidłową adhezję i rozplaszczanie komórek na badanym podłożu potwierdzono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. Długotrwała obserwacja *in vitro* została przerwana w trzynastym dniu hodowli ze względu na nagłe uwolnienie kwaśnych produktów końcowych degradacji materiału, które spowodowało śmierć komórek.

Należy zatem brać pod uwagę, że ze względu na specyfikę hydrolizy poliestrów w przypadku litych podłoży może następować nagromadzenie produktów degradacji wewnątrz materiału, a następnie ich erupcja skutkująca gwałtownym zakwaszeniem pożywki. Biorąc pod uwagę możliwość uniknięcia tego efektu przy zastosowaniu odpowiedniej architektury rusztowań z badanego materiału i zadowalające wyniki uzyskane w niniejszej pracy, postulujemy, iż materiał PLGA/ PLLA modyfikowany krzemionką może służyć jako odpowiednie podłoże dla ludzkich komórek osteogennych w warunkach *in vitro*.

Słowa kluczowe: poliestry, krzemionka, degradacja, regeneracja tkanki kostnej

[Inżynieria Biomateriałów, 103, (2011), 17-22]

CYTOCOMPATIBILITY OF SILICA-MODIFIED PLGA/PLLA BIOMATERIALS FOR BONE TISSUE REGENERATION

JOANNA LESZCZYŃSKA¹, JOANNA WÓJTOWICZ¹,
STANISŁAW SŁOMKOWSKI², STANISŁAW SOSNOWSKI²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL^{1*}

¹ DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
CHALUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW, POLAND

² CENTRE OF MOLECULAR AND MACROMOLECULAR STUDIES,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
SIENKIEWICZA 112, 90-363, ŁÓDŹ, POLAND

* E-MAIL: MALGORZATA.LEWANDOWSKA-SZUMIEL@WUM.EDU.PL

Abstract

Polyester scaffolds are widely investigated as biomaterials for bone tissue regeneration. Several ceramic fillers were proved to improve their cytocompatibility, mechanical strength and the control over their degradation. In this study, poly(L-lactide) mixed with poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA/PLLA), modified with silica filler, was investigated as a candidate material for scaffolds for bone tissue regeneration. Human bone derived cells were observed in a culture on solid disks prepared from the examined material. Cell number and viability was found to be satisfying and alkaline phosphatase activity was even higher comparing to the control (cells cultured on tissue culture polystyrene) after 7 days of culture. Cell adhesion and spreading was confirmed with a scanning electron microscope. The prolonged *in vitro* culture was inhibited on day 13 due to a sudden release of acidic end-products of the material degradation, which was lethal for the cells.

It is postulated that silica modified PLGA/PLLA may serve as a satisfactory support for human bone cells *in vitro*. However, if the material is used in bulk form, the accumulation of the degradation products within the material, followed by a rapid acidification of the culture medium, should be taken into account. This phenomenon is harmful for the cells, but it may probably be avoided by using appropriate scaffold architecture.

Keywords: polyesters, silica, degradation, bone tissue regeneration

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 17-22]

Introduction

Synthetic polyesters, particularly poly(D,L-lactic acid) (PDLLA) and polyglycolic acid (PGA), as well as their copolymer poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid), attracted much attention as bone regeneration biomaterials [1-3]. Some polyester-based materials have already been approved for clinical use and they were assessed as biocompatible and efficient in tissue regeneration [4,5]. The main advantage is their bioresorbability, which means that with time the biomaterials vanish completely, since their degradation end-products – lactic and glycolic acids – enter the physiological metabolic pathways [6]. On the other hand, polyester degradation rate is difficult to be controlled after implantation *in vivo*.

Syntetyczne poliestry, w szczególności poli(kwas-D,L-mlekowy) (PDLLA) i poli(kwas glikolowy) (PGA) oraz ich kopolimer poli(kwas-D,L-mlekowy-ko-kwas glikolowy) są atrakcyjnymi materiałami mogącymi posłużyć jako narzędzie w regeneracji tkanki kostnej [1-3]. Niektóre z poliestrowych biomateriałów zostały już zaakceptowane do użycia klinicznego i ocenione jako materiały biokompatybilne i skuteczne w regeneracji tkanek [4,5]. Główną zaletą tych materiałów jest ich bioresorbowalność, oznaczająca ich całkowity zanik w czasie, dzięki włączeniu ich produktów degradacji, czyli kwasu mlekowego i glikolowego, w fizjologiczne szlaki metaboliczne [6]. Trudne jest jednakże kontrolowanie tempa degradacji poliestrów po implantacji *in vivo*. W konsekwencji ograniczone są możliwości przewidywania stopnia zakwaszenia tkanek w okolicy wszczepu [7-9] oraz zmian właściwości mechanicznych materiału w czasie, co jest szczególnie istotne przy zastosowaniu polimerów do regeneracji tkanki kostnej. Obecnie wiele uwagi poświęca się zastosowaniu dodatków w postaci różnych napełniaczy ceramicznych, mających na celu polepszenie funkcjonalności polilaktydów/poliglikolidów. Na przykład potwierdzono, że dodatek hydroksyapatytu poprawia cytokompatybilność poliestrów [10-13]. Częsteczki hydroksyapatytu, a także innych trójfosforanów wapnia czy też szkła biologicznego, poprawiały wytrzymałość mechaniczną [14-18]. Także na stopień degradacji poliestrów można wpływać poprzez dodatek buforujących cząstek nieorganicznych, np. trójfosforanów wapnia [19,20] lub, nawet z większą wydajnością, węglianów wapnia [21,22].

Celem niniejszej pracy jest ocena reakcji ludzkich komórek osteogennych na podłoże złożone z mieszaniny PLGA/PLLA z domieszką PLLA, modyfikowanej mikrocząstkami krzemionki. Materiał został poddany wstępnej ocenie cytotoxyczności jako potencjalne rusztowanie dla inżynierii tkankowej kości.

Materiały i metody

Otrzymywanie próbek PLGA/PLLA

Kwas poli(L-mlekowy) (PLLA) zsyntetyzowano z L,L-dilaktydu (Boehringer–Ingelheim) na drodze polimeryzacji pseudo-anionowej inicjowanej dietyloetoksyglinem, prowadzonej w suchym 1,4-dioksanie. PLLA wytrącono do metanolu i suszono pod próżnią. Surowy polimer rozpuszczono w dichlorometanie i wytrząsano z 0,1 N HCl w celu usunięcia glinu. Po zobojętnieniu 0,1 N roztworem NaHCO_3 i przemyciu wodą destylowaną polimer wytrącono dwukrotnie do metanolu i suszono w próżni. Ciężar cząsteczkowy scharakteryzowano metodą SEC-MALLS. Otrzymano wartość $M_n = 25\,400$ i $M_w/M_n = 1,11$ [23].

Poli[(kwas mlekowy)-ko-(kwas glikolowy)] (PLGA), handlowa nazwa Resomer RG504H, przeznaczony do zastosowań medycznych (Boehringer–Ingelheim, Germany), używano bez obróbki. Resomer GR504H jest statystycznym kopolimerem D,L-dilaktydu i glikolidu o składzie molowym 49:51, odpowiednio. Ciężar cząsteczkowy M_n wyznaczony metodą SEC-MALS wynosił 12 400, a współczynnik dyspersji $M_w/M_n = 1,24$. Przed użyciem PLGA przesiano przez sito 200-mesh.

Napełniacz krzemionkowy o ziarnie 10 mikrometrów z powierzchnią pokrytą kowalencyjnie związanym modyfikatorem otrzymano analogicznie jak nanokrzymionkę [24]. W pierwszym etapie krzymionkę (99,5%, Aldrich) inkubowano przez trzy godziny z 2% (obj./obj.) roztworem 3-glycidoksypropylotrimetoksylanu (GPS) (Aldrich) w toluenie, aby związać z powierzchnią pierścieni oksiranowy. Następnie krzymionkę przemycano toluenem i suszono w próżni.

In consequence, accumulated acidic end-products may lead to an inflammatory response [7-9]. Additionally, the mechanical properties of the material are unpredictable in time. The latter is of particular importance for the applications of polyesters in bone tissue regeneration. The addition of various ceramic fillers is currently widely investigated in order to improve the functionality of polylactides/polyglycolides. For example, filling polyesters with hydroxyapatite enhanced their cytocompatibility [10-13]. Hydroxyapatite, other tricalcium phosphates or bioglass particles, enhanced their mechanical strength [14-18]. Also, the degradation rate of polyester can be influenced by adding buffering inorganic particles of e.g. tricalcium phosphates [19,20] or, even more efficiently, calcium carbonates [21,22].

The aim of this study is an examination of human bone derived cells' response toward the PLGA/PLLA modified with silica microparticle filler. The material is intended to be used as candidate scaffold for bone tissue engineering. Particular attention has been paid to the cell response in the culture prolonged to the stage of the advanced degradation of the material.

Materials and methods

Polymer disks preparation

The poly(L-lactic acid) (PLLA) was synthesized by pseudoanionic polymerization of L,L-dilactide (Boehringer–Ingelheim, Germany). The polymerization, initiated with diethoxyethyl-aluminum, was carried out in dry 1,4-dioxane. The resulting polymer was precipitated into cold methanol and dried in vacuum. Then, it was dissolved in dichloromethane and the alumina from the initiator was removed by shaking the solution with 0.1 N HCl. After neutralization with a 0.1 N solution of NaHCO_3 and washing with distilled water, the polymer was precipitated twice into cold methanol and dried under high vacuum. The polymer was characterized by SEC-MALLS, which gave $M_n = 25\,400$ and $M_w/M_n = 1.11$. A more detailed description has been published elsewhere [23].

Poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)] (PLGA), with the commercial name Resomer RG504H, of medical grade (Boehringer–Ingelheim, Germany), was used as received. The polymer was a random copolymer of D,L-dilactide and glycolide with a molar ratio of comonomers equal to 49:51, respectively. Its molecular weight was determined by SEC and gave $M_n = 12\,400$ and $M_w/M_n = 1.24$. Prior to use the copolymer powder was sieved by a 200-mesh grid.

The micron-sized silica filler with a polymer-coated surface was prepared in the same manner as reported for nanosilica [24]. The modification consisted of several steps. First, silicon dioxide particles (99.5%, Aldrich) were incubated for three hours with a 2% (v/v) solution of 3-glycidoxypyl trimethoxysilane (GPS) (Aldrich) in toluene in order to bind an oxirane ring with the surface of silica. The modified silica was purified by several centrifugations and redispersions in pure toluene. Then, the dried silica was added to the solution of living polyoxirane in THF, which did react with the oxirane ring attached to the surface. The reaction generated anionic active centers on the silica surface used for subsequent polymerization of L,L-lactide.

10 g portions of each polymer (Resomer RG504H and PLLA) and 4.52 g of the silica particles (20% v/v) were placed in a flask and the flask was rotated horizontally overnight at 2 rev/s in order to mix all components. Portions of 255 mg of the stock mixture were pressed in a stainless steel form (at r.t., 240 MPa, 4 min). The obtained pellets were 1.5 mm thick and 13 mm in diameter to fit the bottom of the 24-well dish.

The materials were sterilized by electron beam (25 kGy) before cell culture.

Zmodyfikowaną krzemionkę dodano do roztworu żyjącego polioksiranu w THF, w wyniku czego polioksiran przyłączył się do pierścienia oksiranowego związanego z powierzchnią, generując anionowe centrum aktywne, użyte następnie do polimeryzacji L,L-laktydu.

Porcje 10 g obu polimerów (Resomer RG504H i PLLA) oraz 4,52 g modyfikowanej krzemionki (20% wag.) mieszano przez noc w kolbie obracającej się horyzontalnie z szybkością 2 obr./s. 255 mg mieszanki umieszczano w stalowej formie i formowano płytki w temp. otoczenia pod ciśnieniem 240 MPa, przez 4 min. Otrzymano płytki o grubości 1,5 mm i średnicy 13 mm, mieszczące się w dołkach 24-studzienkowych płytek hodowlanych.

Próbki sterylizowano radiacyjnie dawką 25 kGy.

Hodowla ludzkich komórek izolowanych z tkanki kostnej

Do doświadczeń użyto ludzkich komórek izolowanych z fragmentów tkanki kostnej (HBDCs – od ang.: human bone derived cells) przy użyciu metody opisanej przez Gallaghera [25]. Autorzy posiadają zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na wykorzystanie komórek pochodzących z ludzkich tkanek, które po zabiegach operacyjnych przeznaczone są do utylizacji.

Komórki wysiano na powierzchnię kształtek polimerowych, umieszczonych uprzednio w studzienkach 24-dołkowych płytek hodowlanych, w liczbie 250 000 komórek na próbkę materiału do oznaczeń ilościowych oraz 50 000 komórek na próbkę materiału do oceny mikroskopowej. 24 godziny po wysianiu komórek podstawową pożywkę hodowlaną Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (FBS), 1% L-glutaminy, 1% antybiotyku oraz 120 mM 2-fosforanu L-kwasu askorbinowego wzbogacono w czynniki różnicujące, tj.: 10 nM witaminę D3, 10 nM deksametazon oraz 10 nM β -glicerofosforan (Sigma). Zastosowano DMEM zawierający czerwień fenolową dla kontroli zmian pH (kolor czerwony oznaczał pH obojętne, zaś kolor żółty zakwaszenie pożywki).

Pożywkę różnicującą wymieniano w hodowlach co 2 lub 3 dni. Kontrolę w testach ilościowych stanowiły komórki wysiane w liczbie 500 000 na powierzchnię polistyrenowych butelek hodowlanych.

Hodowlę prowadzono przez 2 tygodnie w inkubatorze CO₂ (37°C, 5% CO₂). Oznaczenia ilościowe planowano wykonać w 7 i 14 dniu hodowli. Ze względu na nagłe zakwaszenie medium hodowlanego, które wystąpiło w 13 dniu hodowli, odstąpiono od wykonania oznaczeń w dniu 14.

Oznaczanie przeżywalności komórek (test XTT)

Test XTT służy do oceny efektywności przekształcania żółtego, rozpuszczalnego w wodzie substratu XTT (pochodna tetrazolu) przez mitochondrialne dehydrogenazy do rozpuszczalnego w wodzie formazanu. Ilość kolorowego produktu jest proporcjonalna do liczby komórek oraz ich aktywności metabolicznej [26].

Kształtki umieszczone w płytkach hodowlanych przepłukiwano roztworem PBS. Następnie do każdej studzienki dodawano roztwór XTT (0,45 mM) z dodatkiem metatarsianu fenazyny (7,5 μ M). Po 4 godzinach inkubacji w 37°C zebrano supernatanty i w czytniku płytek ELISA przy długości fali 450 nm odczytano wartość absorbancji barwnego produktu. Test wykonano w 7 dniu hodowli ludzkich komórek osteogennych osadzonych na powierzchni badanych kształtek. Planowano przeprowadzenie oznaczenia także w 14 dniu hodowli, jednak ze względu na nagłe zakwaszenie medium 13 dnia, powodujące obumieranie komórek, zrezygnowano z testów w tym punkcie czasowym (zob. wyniki). Ludzkie komórki osteogenne hodowane na podłożu polistyrenowych naczyń hodowlanych posłużyły jako kontrola.

Human bone derived cell culture

Human bone derived cells (HBDCs) were used in the experiments described. The cells were isolated from bone chips by a method described by Gallagher [25]. The authors obtained an approval of the Bioethics Committee of the Medical University of Warsaw for the experimental use of human cells from tissues harvested during surgery and which would otherwise be discarded.

The cells were seeded on the disks placed tightly in a 24-well culture dish in the number of 250 000 per scaffold for quantitative assays and 50 000 per disk for microscopic observations. After 24 h the culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM medium (Gibco) supplemented with foetal bovine serum (FBS) (10%), L-glutamine (1%), antibiotic-antimycotic mixture (1%) and L-ascorbic acid 2-phosphate (120 mM)) was supplemented with osteoblastic differentiating agents: vitamin D3 (10 nM), dexametazone (10 nM) and β -glycerophosphate (10 mM) (Sigma). Phenol red-containing DMEM was used in order to control the pH changes (red color means neutral pH, yellow – aciditation).

The differentiating medium was changed every 2 or 3 days. Cells in the number of 500 000 were cultured on tissue culture polystyrene bottles as a control for each quantitative assay and time point.

After cell seeding the dishes were maintained in an incubator (37°C, 5% CO₂) for 2 weeks. After 7 and 14 days, quantitative assays were planned to be performed. Due to the sudden culture medium aciditation, which occurred on the 13th day of culture, quantitative assays planned for day 14 were not performed.

Cell viability testing (XTT assay)

The XTT assay is based on the on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzymes in living cells to convert the yellow water-soluble substrate (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carboxyl]-2H-tetrazolium hydroxide) into a highly colored water-soluble formazan product. The amount of the colored product is proportional to the number of cells and their metabolic activity [26].

The disks were washed with PBS in a 24-well culture dish. 1.020 ul of XTT (0.45 mM) and phenazine methosulphate (7.5 μ M) solution in DMEM was added to each well. After 4-hour incubation in 37°C, the supernatants (120 ul) were collected and the absorbances of orange formazan product dyes were directly read in microplate ELISA reader at 450 nm. The assay was performed on day 7 in the HBDC culture on the solid disks. It was planned to be done also on day 14, but this was abandoned due to the rapid material degradation on day 13 (see results) which was lethal for cells. HBDCs cultured on tissue culture polystyrene (TCPS) served as a control.

Alkaline phosphatase activity (ALP)

Alkaline phosphatase activity was quantified by ALP Assay Kit (Sigma) on day 7 in the HBDC culture on the solid disks. The cell lysates were prepared by adding 1 ml of 10 mM TrisHCl-0.1% Triton X-100 into a well of 24-well dish. The conversion of parantrophenyolphosphate to para-nitrophenol by ALP lasted 30 minutes in room temperature and the absorbance was measured in a microplate ELISA reader at 405 nm. HBDCs cultured on tissue-culture-polystyrene (TCPS) served as a control.

DNA quantity (PicoGreen assay)

ALP activity was normalized to the DNA quantity of each culture. The DNA was measured in the fluorescent assay PicoGreen (Invitrogen). The cell lysates, described above, were used according to the protocol provided by the producer.

Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP)

Aktywność fosfatazy zasadowej oznaczano przy użyciu zestawu ALP Assay Kit (Sigma) w 7 dniu hodowli ludzkich komórek osteogennych osadzonych na powierzchni kształtek polimerowych. Lizaty komórkowe przygotowano poprzez dodanie roztworu 10 mM TrisHCl-0,1% Triton X-100 do każdej studzienki płytki 24-dółkowej. Hydrolizę paranitrofenylofosforanu do para-nitrofenolu przez fosfatazę zasadową prowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie wykonywano pomiar absorbancji w czytniku ELISA przy długości fali 405 nm. Hodowla ludzkich komórek osteogennych na powierzchni polistyrenowego naczynia hodowlanego posłużyła jako kontrola.

Oznaczenie ilości DNA (test PicoGreen)

Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP) znormalizowano do ilości DNA. Ilość DNA oznaczono fluorescencyjnie za pomocą zestawu PicoGreen (Invitrogen). Lizaty komórkowe przygotowano według procedury opisanej powyżej i następnie użyto ich do oznaczeń, które prowadzono według protokołu producenta.

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Próbki materiału z osadzonymi na nich komórkami utrwalaono roztworem glutaraldehydu. Powierzchnie biomateriałów obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Hitachi SEM) w 7 i 13 dniu hodowli.

Wyniki i dyskusja

Przeżywalność komórek (test XTT)

Przeżywalność komórek oznaczoną w 7 dniu hodowli przedstawiono na RYS. 1. Wartość absorbancji mierzona testem XTT była niższa w hodowlach na badanych materiale w stosunku do kontroli (komórki hodowane na podłożu polistyrenowego naczynia hodowlanego), aczkolwiek jej poziom przekraczał 70% wartości uzyskanej w kontroli. Oznaczenia nie wykonano w 14 dniu doświadczenia ze względu na nagłe zakwaszenie pożywki hodowlanej, zaobserwowane w dniu 13, które skutkowało śmiercią komórek. Na podstawie obserwacji morfologicznej oceniono, że stan komórek w dniu poprzedzającym był dobry (RYS. 3).

Degradacja poliestrów o wymiarach ponad 1 mm przebiega heterogenicznie [27]. Powolna dyfuzja kwaśnych produktów degradacji jest przyczyną ich akumulacji wewnątrz próbki i autoakceleracji procesu. Przy znaczącym postępie degradacji zewnętrzna warstwa próbki także ulega zniszczeniu i następuje gwałtowne uwolnienie produktów degradacji prowadzące do zakwaszenia medium hodowlanego. Szybkie zakwaszenie medium może być szkodliwe dla komórek w hodowli [28]. Możliwe jest jednak jego kontrolowanie przez dobór wielkości i struktury próbek [29].

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że badany materiał może stanowić odpowiednie podłoże dla ludzkich komórek osteogennych, aż do czasu nagłej dezintegracji materiału. Zjawisko nagłej dezintegracji litych kształtek zbudowanych z PLGA/PLLA powinno być brane pod uwagę w czasie hodowli żywych komórek.

Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP)

Na RYS. 2 przedstawiono aktywność enzymatyczną fosfatazy zasadowej (ALP) oznaczoną w 7 dniu hodowli. Wartości aktywności enzymu znormalizowano do ilości DNA, oznaczonej testem PicoGreen. Testu nie wykonywano w 14 dniu, ze względu na nagłe zakwaszenie pożywki hodowlanej, które zaobserwowano w 13 dniu hodowli.

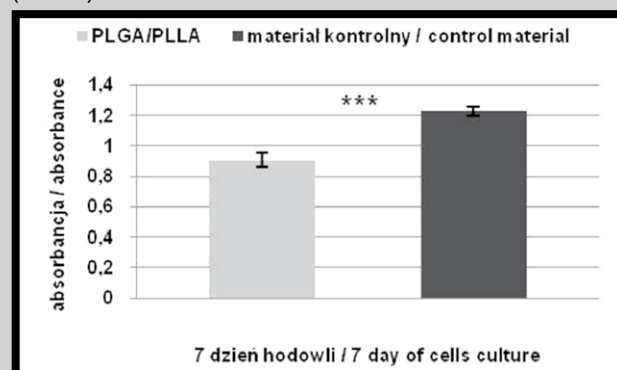
Scanning Electron Microscope (SEM) observations

The control disks (without cells) and the disks with cell culture were fixed with glutaraldehyde. The surfaces of the biomaterials were observed in SEM (Hitachi) on day 7 and on day 13.

Results and Discussions

Cell viability (XTT assay)

Cell viability measured on day 7 is presented on FIG. 1. XTT absorbance in the culture on the investigated materials is lower than in the control (tissue culture polystyrene), but still at the level of more than 70%. The assay was not performed on day 14 due to a sudden culture medium acidification, which was observed on day 13. This was accompanied by rapid cell death in the whole population, although the condition of the cells estimated on the basis of morphological observation on the previous day was fine (FIG. 3).



RYS. 1. Przeżywalność ludzkich komórek osteogennych mierzona 7 dnia hodowli przy użyciu testu XTT. Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; * $p < 0.0005$).**

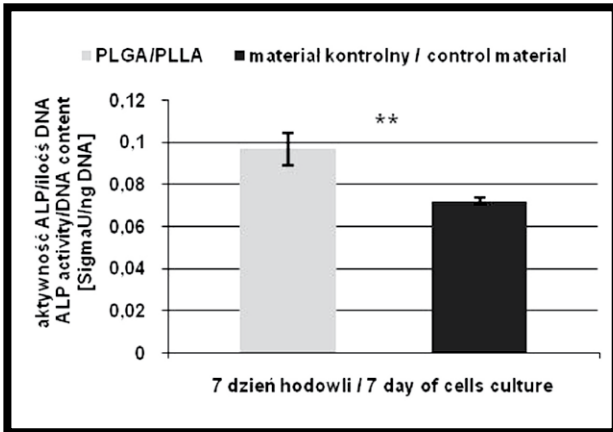
FIG. 1. Human bone derived cells' viability measured on day 7 of culture using the XTT assay. The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; * $p < 0.0005$).**

The mechanism of degradation of macroscopic devices made from aliphatic polyesters is heterogenous [27]. It was established that the degradation is more rapid inside the sample than at the surface because of the accumulation of acidic products inside. The advancement of the degradation process causes a disintegration of the outer layer and a sudden release of a large amount of acidic compounds. The rapid acidification may be harmful for cells in the culture [28]. The scale of the eruption of the acidic degradation products may be controlled by the size and architecture of the samples [29].

The obtained results confirm that the investigated material might serve as a satisfactory support for human bone derived cells up to the sudden disintegration of the material – a phenomenon which should be taken into account when PLGA/PLLA-based materials are put in contact with living cells.

Alkaline phosphatase activity (ALP)

Alkaline phosphatase (ALP) enzymatic activity of the cells on Day 7 is presented in FIG. 2. The results are normalized to the DNA quantity measured in a PicoGreen assay. The assay was not performed on day 14, due to a sudden acidification of the culture medium, which was observed on the 13 day of culture.



RYS. 2. Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP) znormalizowana do ilości DNA w 7 dniu hodowli. Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; * $p < 0.0005$). FIG. 2. Alkaline phosphatase activity (ALP) normalized to the DNA content on day 7 of cell culture. The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).**

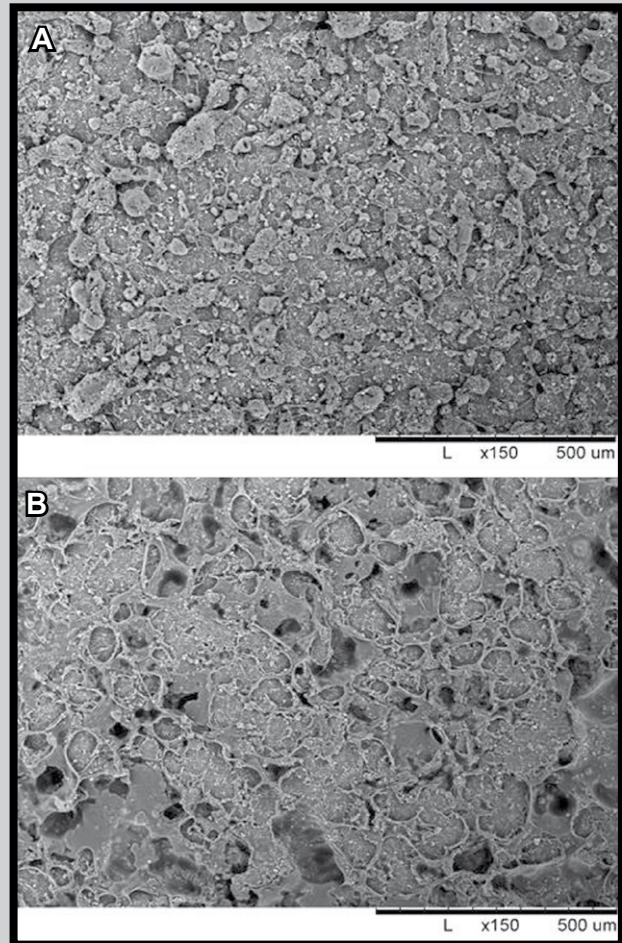
Fosfataza zasadowa jest uznawana za dobry, choć niespecyficzny marker wczesnej fazy różnicowania w kierunku osteoblastów [30,31]. Otrzymano zadowalający wynik wskazujący, iż aktywność ALP była wyższa w hodowlach na powierzchni polimerów modyfikowanych krzemionką niż w kontroli.

Obserwacje mikroskopowe (SEM)

Obraz komórek na powierzchni badanych materiałów przedstawiono na RYS. 3. Pomimo trudności w obserwacji wynikającej z rozwinięcia powierzchni podłoża, w obu punktach czasowych widoczne są komórki rozpląszczone na powierzchni materiału. W 13 dniu widoczne jest większe zagęszczenie komórek, tworzących sieć na badanej powierzchni.

Wnioski

Kopolimer PLGA/PLLA z domieszką PLLA zmodyfikowany dodatkiem krzemionki jest materiałem dobrze tolerowanym przez ludzkie komórki osteogenne w warunkach in vitro. Potwierdza to wysoki stopień przeżywalności komórek na materiale oraz wysoka aktywność fosfatazy zasadowej w hodowli ludzkich komórek osteogennych. W czasie przedłużonej hodowli należy brać pod uwagę ryzyko nagłego uwolnienia kwaśnych produktów degradacji do pożywki hodowlanej, co wywołuje efekt letalny. Ponieważ przebieg procesu degradacji zależy do wielkości fragmentów litego materiału poliestrowego, w zastosowaniach, w których takie materiały mają stanowić podłoże dla hodowli lub transplantacji komórek, należy właściwie dobrać strukturę rusztowania.



RYS. 3. Zdjęcia SEM ludzkich komórek osteogennych osadzonych na powierzchni badanych materiałów w 7 dniu hodowli (A) i w 13 dniu hodowli (B).

FIG. 3. SEM images of human bone derived cells seeded on the surface of the investigated materials on day 7 (A) and on day 13 (B).

Alkaline phosphatase is considered a good although not specific marker of the early stages of osteoblast differentiation [30,31]. The activity of ALP was higher in the culture on the silica-modified disks than in the control, which is advantageous.

Scanning Electron Microscope (SEM)

The cells spread on the surface of the investigated samples are presented in FIG. 3. The cell network is more dense on day 13.

Conclusions

PLGA/PLLA modified with silica filler is well tolerated by human bone derived cells in vitro, which was confirmed by the satisfactory cell viability, as well as by the alkaline phosphatase activity, which was found of a higher value than in the positive control. However, if such material is planned to be used as a scaffold for cell transplantation, a rapid release of the acidic end-products of the material degradation into the culture medium should be expected after a prolonged culture. This phenomenon has a lethal effect on the cells. In view of the fact that the intensity of the acid eruption would depend on the size of the bulk polyester pieces – due to the nature of the polyesters degradation process – it is postulated that the scaffold architecture should be carefully selected.

Praca zrealizowana w ramach projektu R13 01901 finansowanego przez MNiSW.

This scientific work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education, grant R13 01901.

Piśmiennictwo

- [1] Hutmacher, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000. 21(24): p. 2529-43.
- [2] Ishaug, S.L., et al., Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 1997. 36(1): p. 17-28.
- [3] Widmer, M.S., et al., Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials*, 1998. 19(21): p. 1945-55.
- [4] Yu, N.Y., et al., Biodegradable poly(alpha-hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010. 93(1): p. 285-95.
- [5] Athanasiou, K.A., G.G. Niederauer, and C.M. Agrawal, Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 1996. 17(2): p. 93-102.
- [6] Barrett, D.G. and M.N. Yousaf, Design and applications of biodegradable polyester tissue scaffolds based on endogenous monomers found in human metabolism. *Molecules*, 2009. 14(10): p. 4022-50.
- [7] Bostman, O., et al., Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br*, 1990. 72(4): p. 592-6.
- [8] Lu, L., et al., In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactide-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, 2000. 21(18): p. 1837-45.
- [9] Kim, M.S., et al., An in vivo study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA- and/or porcine small intestinal submucosa-based scaffolds. *Biomaterials*, 2007. 28(34): p. 5137-43.
- [10] Kim, S.S., et al., Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006. 27(8): p. 1399-409.
- [11] Aboudzadeh, N., et al., Fabrication and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 2010. 94(1): p. 137-45.
- [12] He, J., D.C. Genetos, and J.K. Leach, Osteogenesis and trophic factor secretion are influenced by the composition of hydroxyapatite/poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(1): p. 127-37.
- [13] Calandrelli, L., et al., Biocompatibility studies on biodegradable polyester-based composites of human osteoblasts: a preliminary screening. *J Biomed Mater Res*, 2002. 59(4): p. 611-7.
- [14] Bleach, N.C., et al., Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate-poly(lactide) composites. *Biomaterials*, 2002. 23(7): p. 1579-85.
- [15] Flahiff, C.M., et al., Analysis of a biodegradable composite for bone healing. *J Biomed Mater Res*, 1996. 32(3): p. 419-24.
- [16] Zhang du, J., et al., Preparation and characterization of biodegradable poly(D,L-lactide) and surface-modified bioactive glass composites as bone repair materials. *J Mater Sci Mater Med*, 2009. 20(10): p. 1971-8.

References

- [17] Thomson, R.C., et al., Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials*, 1998. 19(21): p. 1935-43.
- [18] Damadzadeh, B., et al., Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *J Mater Sci Mater Med*, 2010. 21(9): p. 2523-31.
- [19] Ara, M., Watanabe, M., Imai, Y., Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactide-co-glycolic acid). *Biomaterials*, 2002. 23(12): p. 2479-83.
- [20] Zheng, X., et al., Effect of in vitro degradation of poly(D,L-lactide)/beta-tricalcium composite on its shape-memory properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008. 86(1): p. 170-80.
- [21] Schiller, C., Epple, M., Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. *Biomaterials*, 2003. 24(12): p. 2037-43.
- [22] Cotton, N.J., M.J. Egan, and J.E. Brunelle, Composites of poly(DL-lactide-co-glycolide) and calcium carbonate: in vitro evaluation for use in orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A*, 2008. 85(1): p. 195-205.
- [23] Gadzinowski, M., Sosnowski, S., Slomkowski, S., Poly(L,L-lactide) and poly(L,L-lactide-co-glycolide) microparticles by dialysis. *e-Polymers*, 2005. 084.
- [24] Wozniak, P., Sosnowski, S., Slomkowski, S., Reinforced polymer for scaffolds for bone tissue regeneration. *Polish J. Appl. Chem.*, 2009. 53(195-2001).
- [25] Gallagher, J.A., R. Gundle, and J.N. Beresford, Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblasts) from human bone. *Methods Mol Med*, 1996. 2: p. 233-62.
- [26] Scudiero, D., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, Anneerney, Siobhan, et al., Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res*, 1988. 48(17): p. 4827-4833.
- [27] Grizzi, I., et al., Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactide) size-dependence. *Biomaterials*, 1995. 16(4): p. 305-11.
- [28] Garric, X., et al., Growth of various cell types in the presence of lactic and glycolic acids: the adverse effect of glycolic acid released from PLGA copolymer on keratinocyte proliferation. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2002. 13(11): p. 1189-201.
- [29] Shive, M.S. and J.M. Anderson, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997. 28(1): p. 5-24.
- [30] Quarles, L.D., et al., Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*, 1992. 7(6): p. 683-92.
- [31] Whited, B.M., et al., Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. *Biomaterials*, 2011. 32(9): p. 2294-304.

BADANIA DZIAŁANIA CYTOTOKSYCZNEGO MEMBRAN CHITOZANOWYCH PRZEZNACZONYCH NA OPATRUNKI

ZOFIA MODRZEJEWSKA¹, DANUTA PALUCH²

¹ POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ I OCHRONY ŚRODOWISKA,
UL. WÓLCZAŃSKA 213, 90-924 ŁÓDŹ

² ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU,
UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW

Streszczenie

W pracy przedstawiono badania dotyczące cytotoksycznego działania hydrożelowych membran chitozanowych wytwarzanych metodą inwersji faz. Hydrożelowe membrany stanowiąc mogą potencjalny materiał na opatrunki. Badania przeprowadzono na referencyjnej linii komórkowej, fibroblastach mysich 3T3/Balb. Membrany chitozanowe po 24, 48 i 72 h kontaktu, nie wykazują działania toksycznego. Plastyfikacja membran w glicerynie wpływa niekorzystnie przeżywalność komórek.

Słowa kluczowe: hydrożel, membrana, działanie cytotoksyczne

[Inżynieria Biomateriałów, 103, (2011), 23-28]

Wstęp

W technologii tzw. nowej generacji opatrunków istotne znaczenie zajmują hydrożele. Spełniają one podstawowe wymagania stawiane opatrunkom najwyższej 3 klasy. Zgodnie z nimi opatrunek powinien wykazywać dużą chłonność, zatrzymywać wydzielinę wraz z zarażkami, stanowić barierę zewnętrzną dla drobnoustrojów oraz przepuszczać gazy i parę wodną, nie może podrażniać rany i reagować z substancjami stosowanymi miejscowo, powinien utrzymywać odpowiednią temperaturę rany (zbliżoną do temperatury ciała), a ponadto być łatwy w użyciu.

Duża popularność matryc hydrożelowych wynika z ich korzystnych właściwości a mianowicie: obecności wody w strukturze, biogodności i biodegradowalności. Preferowana w leczeniu ran wilgotna terapia przyspiesza bowiem ziarninowanie, angiogenezę i reepitalizację. Czas gojenia rany leczonej w wilgotnym środowisku jest krótszy o ok. 50%. Hydrożele wytwarzają w obszarze rany środowisko zbliżone do fizjologicznego, pobudzając naturalne zdolności komórek do proliferacji i odbudowy uszkodzonej tkanki. Do wytwarzania hydrożeli wykorzystuje się polimery naturalne (agar, żelatyna, pektyna) i syntetyczne poli(alkohol winylowy), poli(winylopirolidon), poli(kwas akrylowy), poli(glikol etylenowy) [1-7].

Duże zainteresowanie budzi również pochodna chityny - chitozan. Chityna (N-acetylo D-glukozaamina), jest po celulozie najbardziej rozpowszechnionym polimerem w przyrodzie. Z uwagi jednak na trudną rozpuszczalność jej zastosowanie jest ograniczone. Stąd zainteresowanie jej pochodną zwaną chitozanem. Chitozan powstaje przez hydrolizę grup acetyloaminowych.

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF CHITOSAN MEMBRANES TO BE USED AS DRESSING

ZOFIA MODRZEJEWSKA¹, DANUTA PALUCH²

¹ TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
FACULTY OF PROCESS AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING,
UL. WÓLCZAŃSKA 213, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

² WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY,
DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY
AND BIOMATERIALS RESEARCH,
UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW, POLAND

Abstract

Investigations of cytotoxic activity of chitosan hydrogel membranes produced by the phase inversion method are presented in the paper. Hydrogel membranes can be used potentially as a dressing material. Experiments were carried out on a reference cell line, mouse fibroblasts Balb/C 3T3. Chitosan membranes after 24, 48 and 72 h exposure did not reveal any toxic activity. Plastification of the membranes in glycerin had a negative effect on cell survival.

Keywords: hydrogel, membrane, cytotoxicity

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 23-28]

Introduction

In the so-called new-generation dressing technology, hydrogels occupy an important place. They meet basic requirements which the highest 3rd class dressings should satisfy. According to these requirements, dressings should have high absorbability towards wound exudate and microbes, constitute an external barrier for microorganisms and should be permeable for gases and water vapor. They cannot irritate wound or react with locally administered substances. They should retain appropriate wound temperature (close to body temperature), and finally, they should be easily applied.

Great popularity of hydrogel matrices is a result of their advantageous properties, namely the presence of water in the structure, biocompatibility and biodegradability. Wet therapy preferred in wound healing enhances growth of granulation tissue, angiogenesis and reepithelialization. The time of wet wound healing is shortened by about 50%. In the wound region hydrogels form an environment similar to the physiological one, stimulating natural cell ability to proliferate and reconstruct damaged tissues. Natural (agar, gelatin, pectin) and synthetic (polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, polyacrylic acid, polyethylene glycol) polymers are used for hydrogel production [1-7].

Chitin derivative, chitosan, arouses also significant interest. After cellulose, chitin (N-acetyl-D-glucosamine) is the most popular polymer in nature. However, due to hampered solubility, its application is limited. This is why its derivative called chitosan appears so interesting. Chitosan is formed as a result of hydrolysis of acetyl amino groups. The presence of amino groups in the molecule causes that this polymer has better solubility and can be transformed into useful forms (microspheres, membranes, sponges, hydrogels).

Obecność w cząsteczce grup aminowych powoduje, że jest polimerem o lepszej rozpuszczalności i istnieje możliwość przeprowadzenia go w formy użyteczne (mikrosfery, membrany, gąbki, hydrożele). Z wielu badań na zwierzętach wiadomo, że chitozan przyspiesza gojenie ran poprzez: zwiększenie napływu do miejsca zakażenia komórek fagocytujących (granulocyty segmentowane i makrofagi), stymulację migracji i proliferacji komórek naczyń śródbłonna i fibroblastów, a według niektórych badaczy również keratynocytów. Wykazano również, że chitozan działa statycznie, a nawet bójczo na komórki bakterii oraz grzybów drożdżoidalnych. Hydrożele chitozanowe wytwarzane są metodą inwersji faz poprzez neutralizację soli chitozanu w zasadowym roztworze wodnym bądź wodno-alkoholowym, w układzie polikation (sól chitozanu) – polianion (tri, heksa-fosforan sodu, alginian sodu,) oraz żele formujące się w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego (przy użyciu β -glicerofosforanu sodu, polialkoholu winylowego bądź wykorzystując aktywność enzymatyczną ureazy w temperaturze 37–40°C). W otrzymane struktury wprowadzać można dodatkowe środki. Obecność grup $-OH$ i NH_2 dzięki którym dane środki są unieruchamiane powoduje stabilność układu uzależnioną od warunków, w których się znajduje (np. pH, temperatura), co z kolei umożliwia kontrolowaną desorpcję unieruchomionych środków. Hydrożele chitozanowe badane są w kierunku wykorzystania ich jako nośniki leków, opatrunki (w tym również opatrunki hybrydowe zawierające wybrane środki farmakologiczne np. przeciwbólowe, antybiotyki czy inne wspomagające proces gojenia rany) oraz scaffoldy do hodowli komórkowej [8–22]. Wykorzystanie hydrożeli w inżynierii biomedycznej wymaga określenia w pierwszym rzędzie ich własności cytotoksycznych.

W pracy przedstawiono badania działania cytotoksycznego membran chitozanowych wytwarzanych metodą inwersji faz.

Material

Do badań cytotoksyczności wytypowano hydrożelowe membrany chitozanowe wytworzone metodą inwersji faz z chitozanu o stopniu deacetylacji SD = 83% i 97%. Te ostatnie poddano dodatkowo plastyfikacji w 20% roztworze wodnym glicerolu. W dalszej części pracy przyjęto następujące oznaczenia:

- hydrożele chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; - (b)
- hydrożele chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; - (c)
- hydrożele chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowane w glicerynie - (d)

Membrany wytworzono z octanu chitozanu. Stężenie polimeru w roztworze wynosiło 8%. Roztwór soli chitozanowej rozprowadzono na wypoziomowanej płaskiej powierzchni za pomocą aplikatora o wysokości szczeliny 0,8 mm, po czym bezpośrednio płytkę umieszczano w kąpeli neutralizującej (10% roztworze wodnym NaOH). Czas trwania neutralizacji wynosił 24 h. Następnie próbki odmywano wodą zdejonizowaną do uzyskania pH obojętnego przy powierzchni membrany. Przed oznaczeniem cytotoksyczności membrany sterylizowano radiacyjnie wykorzystując kobaltowe źródło promieniowania $\gamma^{60}Co$, przy dawce promieniowania 25 kGy.

Struktura i własności fizykochemiczne hydrożelowych membran chitozanowych przedstawione zostały w publikacjach [24–27]. Membrany te charakteryzują się stosunkowo wysoką wytrzymałością (w zależności od stężenia polimeru wynosi ona od 1–3 N/mm²) [24]. Struktura jest rozwinięta na co wskazuje obraz powierzchni (membran po wysuszeniu liofilizacyjnym) pod mikroskopem scanningowym (RYS. 1) [25].

Many experiments on animals show that chitosan can enhance wound healing by increasing the supply of phagocytic cells (segmented granulocytes and macrophages) to the place of infection and by stimulating migration and proliferation of the cells of endothelium vessels and fibroblasts, and according to some researchers, also keratinocytes. It has been proved that chitosan has a static and even bactericidal and fungicidal effect on yeast. Chitosan hydrogels are formed by phase inversion method through chitosan salt neutralization in basic water solution or water-alcohol solution, in the system of polycation (chitosan salt) – polyanion (tri, hexa sodium phosphate, sodium alginate) and gels formed at body temperature (with the use of β -sodium glycerophosphate, polyvinyl alcohol or employing enzymatic activity of urease at the temperature 37–40°C). Additional substances can be introduced into the formed structures. The presence of $-OH$ and NH_2 groups, due to which the substances are immobilized, causes stability of the system irrespectively of the conditions in which it occurs (e.g. pH, temperature), which in turn enables controlled desorption of the immobilized substances. Chitosan hydrogels are investigated in respect to their applicability as drug carriers, dressings, including hybrid dressings which contain selected pharmacological agents, e.g. pain-killers, antibiotics or adjuvants on wound healing, and scaffolds for cell cultures [8–22]. The use of hydrogels in biomedical engineering requires primarily the determination of their cytotoxic properties.

Investigations of cytotoxic activity of chitosan membranes produced by the phase inversion method are discussed in the paper.

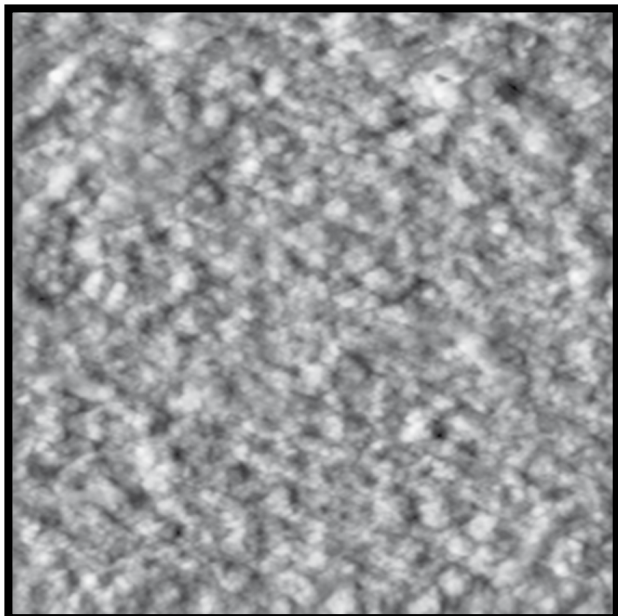
Experimental material

In cytotoxicity investigations chitosan hydrogel membranes formed by the phase inversion method from chitosan with the degree of deacetylation (DD) = 83% and 97% were used. The latter membranes were additionally plastified in 20% water solution of glycerol. In following part of paper the following marks are applied:

- chitosan hydrogels from chitosan with 83% DD - (b)
- chitosan hydrogels from chitosan with 97% DD - (c)
- chitosan hydrogels from chitosan with 97% DD plastified in glycerin - (d)

The membranes were made from chitosan acetate. Polymer concentration in the solution was 8%. The chitosan salt solution was distributed on a leveled flat surface by means of an applicator with slot height 0.8 mm. After that the plate was placed immediately in a neutralizing bath (10% water solution of NaOH). The time of neutralization was 24 h. Next, the samples were washed with deionized water to reach neutral pH at the membrane surface. Prior to cytotoxicity determination, the membranes were sterilized by radiation using a cobalt radiation source $\gamma^{60}Co$, at radiation dose 25 kGy.

Structure and physico-chemical hydrogel chitosan membranes were presented in publications [24–27]. These membranes are characterized by relatively high strength (depending on the polymer concentration range from approximately 1–3 N/mm²) [24]. The structure is developed as indicated by the image of the surface (membrane after drying, lyophilization) under the scanning microscope (FIG. 1) [25]. Structure organization depends on the concentration of polymer in solution and molecular weight of the polymer. Having the proper concentration of 8% and a specific molecular weight (500 kDa) the membrane with a high degree of order (crystallinity) can be obtained [26]. Water fills the spaces in the structure of pores and occurs as a partly related. Quantity of water bounded in the structure depends on the degree of crystallinity [27].



RYS. 1. Obraz membran pod mikroskopem sił atomowych [24].
FIG. 1. Membrane image under atomic force microscope [24].

Uporządkowanie struktury zależy od stężenia polimeru w roztworze membranotwórczym i masy cząsteczkowej polimeru. Przy odpowiednim stężeniu 8% i określonej masie cząsteczkowej (500 kDa) uzyskuje się membrany o wysokim stopniu uporządkowania (krystaliczności) [26]. Woda w strukturze wypełnia przestrzeń porów oraz występuje w postaci częściowo związanej. Związanie wody w strukturze zależy od stopnia uporządkowania [27].

Metoda badań

Badania wykonano w Pracowni Hodowli Komórkowych, Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii AM we Wrocławiu. Badanie przeprowadzono zgodnie z PN-EN ISO 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoxyczności: metody *in vitro*” – marzec 2001. Badania przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu.

Linia komórkowa

Badania przeprowadzono na referencyjnej linii komórkowej, fibroblastach mysich 3T3/Balb otrzymanych z Banku Tkanki, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Hodowlę komórek prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej (30 min, 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki przeszczepiano stosując roztwór 0,25% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

Badanie działania cytotoxycznego metodą bezpośredniego kontaktu

Komórki fibroblastów mysich zostały założone na 12-dłokowych płytkach firmy NUNC w ilości 5×10⁶ każda. Po 24 godzinach komórki przykleiły się do podłoża i podzieliły, pokrywając około 60% powierzchni płytki. Po tym czasie pożywkę hodowlaną usunięto, a do każdego z naczyń dodano nowe medium. Na hodowlę komórkową nałożono próbki materiałów o wymiarach 10×10 mm i inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Każdy materiał oceniano w 3 powtórzeniach.

Experimental method

Experiments were made in the Cell Culture Laboratory of the Department of Histology and Embryology, Wrocław Medical University. Tests were carried out according to the standard PN-EN ISO 10993-5 “Biological evaluation of medical products. Cytotoxicity tests: *in vitro* methods” – March 2001. The tests were performed by the direct contact method.

Cell line

The experiments were carried out on a reference cell line, mouse fibroblasts Balb/C 3T3 supplied by the Tissue Bank of the Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences in Wrocław.

Cells were grown in culture in Eagle's medium supplemented with 10% inactivated (30 min, 56°C) fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at the temperature 37°C, in the atmosphere of 5% CO₂. The cells were inoculated using a 0.25% solution of trypsin with 0.02% EDTA in PBS, at pH 7.2.

Investigation of cytotoxicity by the direct contact method

Mouse fibroblast cells in the amount 5×10⁶ were placed on NUNC 12-well plates each. After 24 hours the cells adhered to the substrate and were divided covering about 60% of the plate surface. After that time the culture medium was removed and to each vessel a new medium was added. Next, the cell cultures were covered with 10×10 mm material samples and incubated at 37°C, in the atmosphere of 5% CO₂. Every material sample was evaluated in 3 replications.

Cytotoxicity evaluation

Quantitative and morphological changes after contacts with the tested materials were evaluated after 24, 48 and 72 h under a reverse phase-contrast microscope, at a magnification of 10x. Trypan blue staining was used to specify the number of dead cells. For a drop of cell suspension was added 1 drop of 0.4% trypan blue in PBS. After 1 minute drop of suspension was introduced to counting chambers Bürker and calculated the average of five squares each half of the chamber and the percentage of dead cells. Toxicity of the material samples was evaluated based on changes in cell morphology, survival and ability to proliferate.

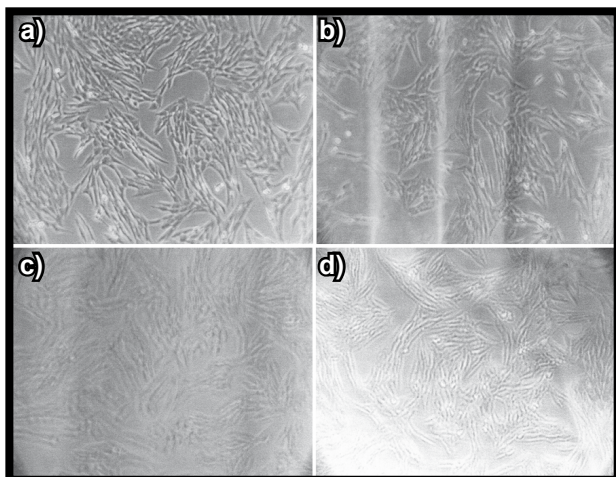
Statistical calculations

A statistical analysis was made using the t-Student test. It was assumed that correlation coefficients were significant at *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Results and discussion

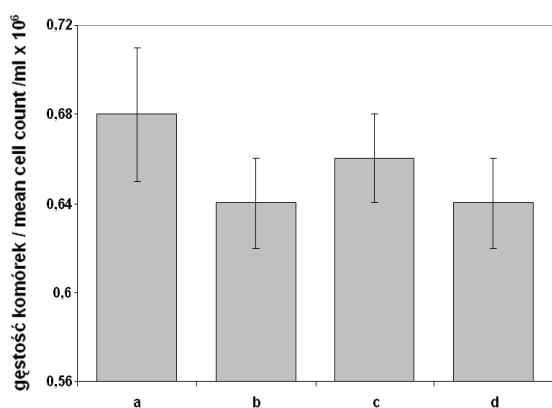
After 24 h, in the cultures which were in contact with all tested samples of hydrogel chitosan membranes no morphological changes in the cells were observed. Cell proliferation in the cultures with the samples was comparable and insignificantly lower as compared to control cultures. No dead cells were found in any culture (FIG. 2,3).

After 48 h, in the cultures which were in contact with all tested samples of chitosan hydrogel membranes no morphological changes of cells were observed. Cell proliferation in the cultures with membranes made from chitosan with 83% and 97% degrees of deacetylation without plastification in glycerol was slightly higher, and in the cultures with membranes plastified in glycerol slightly lower as compared to control cultures. No dead cells were found in any culture (FIG. 4,5).



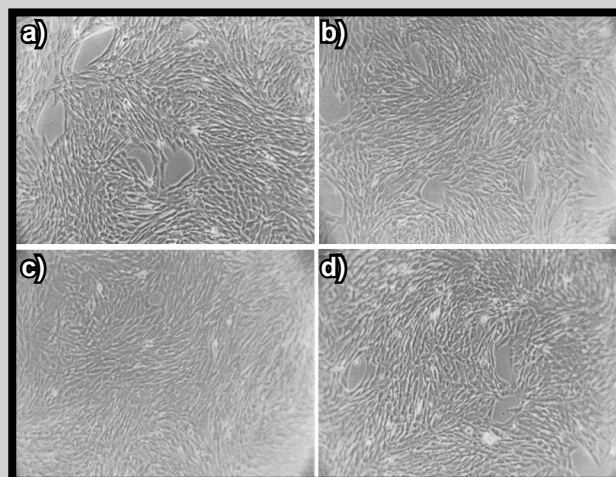
RYS. 2. 24 h hodowla fibroblastów mysich 3T3Balb/C: a - kontrola; b - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; c - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; d - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowaną w glicerolu. Fotografie b, c, d wykonane poprzez próbki membran chitozanowych.

FIG. 2. 24 h culture of mouse fibroblasts Balb/C 3T3: a - control; b - after contact with the membrane made from chitosan with 83% DD; c - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD; d - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD plastified in glycerol. Photographs b, c and d were taken through the sample.



RYS. 3. Proliferacja fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 24 h w hodowlach z membranami chitozanowymi.

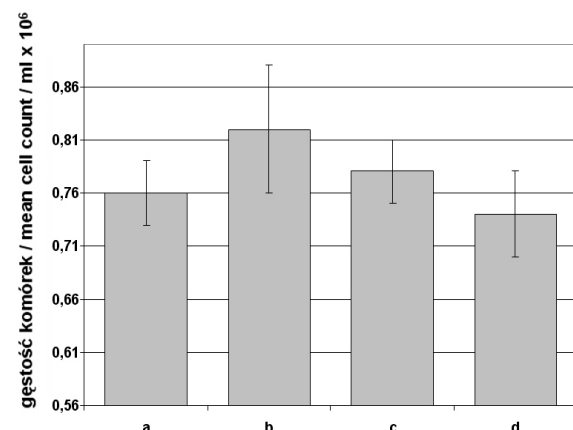
FIG. 3. Proliferation of mouse fibroblasts Balb/C 3T3 after 24 h in the cultures with chitosan membranes.



RYS. 4. 48 h hodowla fibroblastów mysich 3T3Balb/C: a - kontrola; b - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; c - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; d - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowaną w glicerolu.

FIG. 4. 48 h culture of mouse fibroblasts Balb/C 3T3: a - control; b - after contact with the membrane made from chitosan with 83% DD; c - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD; d - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD plastified in glycerol.

Photographs b, c and d were taken through the sample.



RYS. 5. Proliferacja fibroblastów mysich 3T3 Balb po 48 h w hodowlach z membranami chitozanowymi.

FIG. 5. Proliferation of mouse fibroblasts Balb/C 3T3 after 48 h in the cultures with chitosan membranes.

Ocena działania cytotoksycznego

Zmiany ilościowe i morfologiczne, po kontakcie z badanymi materiałami oceniono po 24, 48 i 72 h w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym, w powiększeniu 10x. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu. Do 1 kropli zawiesiny komórek dodawano 1 kroplę 0,4% błękitu trypanu w PBS. Po 1 minucie wprowadzano kroplę zawiesiny do komory Bürkera i obliczano średnią z pięciu kwadratów każdej połowy komory oraz procent komórek martwych. Stopień toksyczności materiałów oceniono na podstawie zmian w morfologii komórek, ich przeżywalności i zdolności do proliferacji.

Obliczenia statystyczne

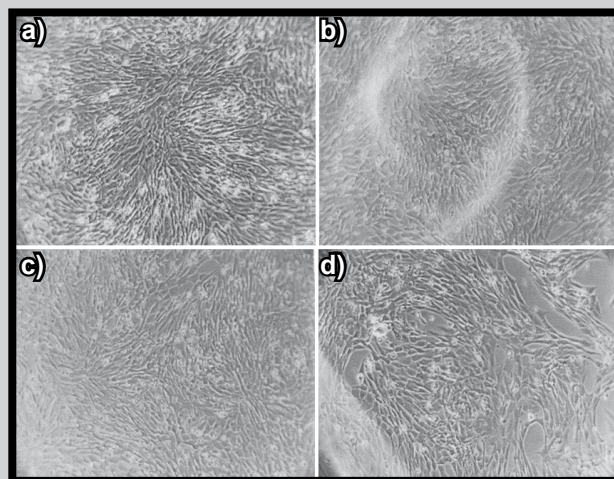
Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem testu t-Studenta. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Wyniki badań

Po 24 h, w hodowlach po kontakcie z wszystkimi badanymi próbkami hydrożelowych membran chitozanowych nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Proliferacja komórek w hodowlach z próbkami była porównywalna i nieistotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych. W żadnej hodowli nie stwierdzono komórek martwych (RYS. 2,3).

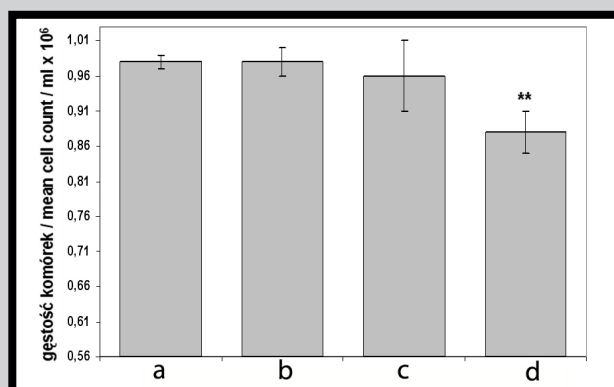
Po 48 h, w hodowlach po kontakcie z wszystkimi badanymi próbkami hydrożelowych membran chitozanowych nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Proliferacja komórek w hodowlach z membranami z chitozanu o stopniu deacetylacji 83% i 97% bez plastyfikacji w glicerolu była nieistotnie wyższa, a w hodowlach z membranami plastyfikowanymi w glicerolu nieistotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych. W żadnej hodowli nie stwierdzono komórek martwych (RYS. 4,5).

Po 72 h, w hodowlach po kontakcie z wszystkimi badanymi próbkami hydrożelowych membran chitozanowych nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Proliferacja komórek w hodowlach z membranami z chitozanu o stopniu deacetylacji 83% była identyczna, a w hodowlach z membranami z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% nieistotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych. W hodowlach z membranami plastyfikowanymi w glicerolu stwierdzono istotnie niższą proliferację komórek ($p = 0.0054$) w porównaniu do hodowli kontrolnych. W hodowlach kontrolnych i w hodowlach z membranami chitozanowymi nieplastyfikowanymi stwierdzono 2% komórek martwych. W hodowlach z membranami plastyfikowanymi stwierdzono 5% komórek martwych (RYS. 6 i 7).



RYS. 6. 72 h hodowla fibroblastów mysich 3T3Balb/C: a - kontrola; b - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; Fotografia wykonana poprzez próbkę; c - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; d - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowaną w glicerolu. W lewym dolnym rogu widoczna próbka.

FIG. 6. 72 h culture of mouse fibroblasts Balb/C 3T3: a - control; b - after contact with the membrane made from chitosan with 83% DD; the photograph was taken through the sample; c - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD; d - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD plastified in glycerol. The sample is visible on the bottom left.



RYS. 7. Proliferacja fibroblastów mysich 3T3 Balb po 72 h w hodowlach z membranami chitozanowymi.

FIG. 7. Proliferation of mouse fibroblasts Balb/C 3T3 after 72 h in the cultures with chitosan membranes.

After 72 h, in the cultures which were in contact with all tested samples of chitosan hydrogel membranes no morphological changes in cells were found. Cell proliferation in the cultures with membranes made from chitosan with 83% DD was the same, and in the cultures with membranes made from chitosan with 97% DD it was insignificantly lower as compared to the control culture. In the cultures with membranes plastified in glycerol, cell proliferation was significantly lower ($p = 0.0054$) as compared to the control cultures. 2% dead cells were found in the control cultures and in the cultures with non-plastified chitosan membranes. In the cultures with plastified membranes 5% dead cells occurred (FIG. 6,7).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

1. Membrany chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 83 i 97% (nieplastyfikowane) po 24, 48 i 72 h kontaktu, nie wykazują działania toksycznego.
2. Membrany chitozanowe plastyfikowane w glicerolu, po 24 i 48 h kontaktu, nie wykazują działania toksycznego na fibroblasty mysie 3T3/ Balb, a po 72 h słabe działanie toksyczne.
3. Hydrożelowe membrany chitozanowe stanowić mogą potencjalny materiał na opatrunki.

Piśmiennictwo

- [1] Szymonowicz M., Pielka S., Marcinkowska A., Żywicka B., Gamian A., Haznar D., Pluta J.: Cellular response after stimulation of the gelatin-alginate matrixes. *Macromol. Symp.* 272 (2008) 58-62.
- [2] Winter G.D.: Formation of the scab and rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 193 (1962) 293-294.
- [3] Benbow M., Burg G., Comacho Martinez F., Erikson E.: Guidelines for the outpatient treatment of chronic wounds and burns (1999) 12-21.
- [4] Sopota M., Łuczak J.: Profilaktyka i leczenie zachowawcze odleżyn (cz. I), *Zakażenia* 4 (2003) 81-88.
- [5] Szewczyk M.T., Jawień A.: Zachowawcze leczenie ran przewlekłych. *Zakażenia* 3(2004) 85-90.
- [6] Tyliczszak B., Pielichowski K.: Charakterystyka matryc hydrogelowych – zastosowania biomedyczne, *Czasopismo Techniczne, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej*, Z. 1, 2007, ISSN 0011-4561.
- [7] Jachowicz R.: *Farmacja Praktyczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2010, ISBN: 978-83-200-4181-1.
- [8] Okamoto Y., Tomita T., Minami S., Matsuhashi A., Kamazawa N.H., Tanioka S., Shigemasa S.: Effects of chitosan on experimental abscess with *Staphylococcus aureus* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 57 (1995) 765-767.
- [9] Usami Y., Minami S., Okamoto Y., Matsuhashi A., Shigemasa Y.: Influence of chain length of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine residues on direct and component-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells. *Carbohydrate Polymers* 32 (1997) 115-122.
- [10] Mori T., Okumura M., Matsuura M., Ueno K., Tokura S., Okamoto Y., Minami S., Fujinaga T.: Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 18 (1997) 947-951.
- [11] Kojima K., Okamoto Y., Miyatake K., Kitamura Y., Minami S.: Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan, *Carbohydrate Polymers* 37 (1998) 109-113.
- [12] Ueno H., Yamada H., Tanaka I., Kaba N., Matsuura M., Okumura M., Kadosawa T.: Fujinaga T., Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* 20 (1999) 1407-1414.
- [13] Cho Y., Cho Y., Chung S., Yoo G., Ko S.: Water-soluble chitin as wound healing accelerator *Biomaterials*, 20 (1999) 2139-2145.
- [14] Mi F., Shyu S., Wu Y., Lee S., Shyong J., Huang R.: Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as wound dressing, *Biomaterials* 22 (2001) 165-173.
- [15] Ueno H., Nakamura F., Murakami M., Okumura M., Kadosawa T., Fujinaga T.: Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblast and the growth factors production by macrophages, *Biomaterials* 22 (2001) 2125-2130.

Conclusions

The experiments lead to the following conclusions:

1. The membranes made from chitosan with 83 and 97% DD (non-plastified) after 24, 48 and 72 h exposure do not reveal toxic activity.
2. Chitosan membranes plastified in glycerol, after 24 and 48 h exposure do not show toxic activity on mouse fibroblasts Balb/C 3T3, and after 72 h they reveal weak toxic effect.
3. Chitosan hydrogel membranes can be used as a potential dressing material.

References

- [16] Howling G.I., Dettmar P.W., Goddard P.A., Hampson F.C., Dornish M., Wood E.J.: The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 22 (2001) 2959-2966.
- [17] Ishihara M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Kikuchi M., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Uenoyama M., Kurita A., Photocross-linkable chitosan as dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials* 23 (2002) 833-840.
- [18] Okamoto Y., Watanabe M., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S.: Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium. *Biomaterials* 23 (2002) , 1975-1979.
- [19] Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., Okamoto Y.: Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate Polymers* 67 (2007) 640-644.
- [20] Keong L.C., Halim A.S.: *In vitro* in biocompatibility assessment for biomedical grade chitosan derivatives in wound management. *International Journal of Molecular. Sciences* 10 (2009) 1300-1313.
- [21] Spindola H., Fernandes J., De Sousa V., Tavaría F., Pintado M., Malcata X., Carvalho J.E.: Anti-inflammatory effect of chitosan oligomers. *New Biotechnology* 25 (2009) S9.
- [22] Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Furuike T., Tamura H.: *Novel Chitin and Chitosan Materials in Wound Dressing*, Edited by Anthony N. Laskovski, ISBN: 978-953-307-513-6, Publisher: InTech, January 2011.
- [23] Kumirska J., Weinhold M.X., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P.: *Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials on Their Biomedical Activity* Source: *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, Edited by Anthony N. Laskovski, ISBN: 978-953-307-513-6, Publisher: InTech, 2011.
- [24] Wylon E., Modrzejewska Z., Owczarż P., Zarzycki R.: Ocena właściwości fizykochemicznych błon chitozanowych. *Assessment of physicochemical properties of chitosan membranes*, *Engineering of Biomaterials* (2004) 129-131.
- [25] Stawczyk J., Modrzejewska Z., Sheng Li, Jankowska A.: Structural characteristics of atmospheric freeze-dried chitosan granules and membranes. *Chemical and Process Engineering* 28 (2007) 673-681.
- [26] Modrzejewska Z., Maniukiewicz W.: Determination of hydrogel chitosan membrane structure. *Advances in Chitin Science*, V VIII, Poznań (2005) 253-257.
- [27] Modrzejewska Z.: Characterization of water state in chitosan hydrogel membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 2011 in press.