ENGINEERING OF BIOMATERIALOW

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 104 Numer 104 Volume XIV Rok XIV

JULY 2011 LIPIEC 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 Górniczo-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



ENGINEERING OF

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

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 czarnobiałe 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 przesyłać 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 Ślaski 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 Slaski S.A. O/Krakow account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

XXI Conference on

BIOMATERIALS IN MEDICINE

VETERINARY MEDICINE

AND

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

www.biomat.agh.edu.pl







ENGINEERING OF BI MATERIALS

SPIS TREŚCI

CONTENTS

2	PROPERTIES OF BILAYER GELATIN/ POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS Izabella Rajzer	2
5	PLA MELT-BLOWN FIBROUS STRUCTURES FOR POTENTIAL BIOMEDICAL APPLICATIONS Monika Rom, Joanna Grzybowska-Pietras, Janusz Fabia, Janusz Jarzębowski, Jarosław Janicki	5
8	MANUFACTURING AND CHARACTERIZATION OF RESORBABLE PLGA MEMBRANES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS Małgorzata Krok, Carolina Ferreira, Soraia Fernandes, Dorota Kościelniak, Piotr Dobrzyński, Elżbieta Pamuła	8
14	SECRETION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES BY HUMAN CHONDROCYTES CULTURED ON BIODEGRADABLE POLYMERS Joanna Wawszczyk, Arkadiusz Orchel, Katarzyna Jelonek, Piotr Paduszyński, Joanna Orchel, Piotr Dobrzyński, Janusz Kasperczyk, Ireneusz Bielecki	14
23	INCREASING OF MARGINAL GAP IN THERMOCYCLED RESTORATION SYSTEM Krzysztof Pałka, Monika Gruszecka, Agata Niewczas	23
	2 5 8 14 23	 PROPERTIES OF BILAYER GELATIN/ POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS IZABELLA RAJZER PLA MELT-BLOWN FIBROUS STRUCTURES FOR POTENTIAL BIOMEDICAL APPLICATIONS MONIKA ROM, JOANNA GRZYBOWSKA-PIETRAS, JANUSZ FABIA, JANUSZ JARZĘBOWSKI, JAROSŁAW JANICKI MANUFACTURING AND CHARACTERIZATION OF RESORBABLE PLGA MEMBRANES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS MAŁGORZATA KROK, CAROLINA FERREIRA, SORAIA FERNANDES, DOROTA KOŚCIELNIAK, PIOTR DOBRZYŃSKI, ELŻBIETA PAMUŁA SECRETION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES BY HUMAN CHONDROCYTES CULTURED ON BIODEGRADABLE POLYMERS JOANNA WAWSZCZYK, ARKADIUSZ ORCHEL, KATARZYNA JELONEK, PIOTR PADUSZYŃSKI, JOANNA ORCHEL, PIOTR DOBRZYŃSKI, JOANNA ORCHEL, PIOTR DOBRZYŃSKI, JANUSZ KASPERCZYK, IRENEUSZ BIELECKI INCREASING OF MARGINAL GAP IN THERMOCYCLED RESTORATION SYSTEM KRZYSZTOF PAŁKA, MONIKA GRUSZECKA, AGATA NIEWCZAS

1

STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS Abstracted in Applied Mechanics Reviews WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE AND HIGHER EDUCATION

PROPERTIES OF BILAYER GELATIN/POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS

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-Biała, Poland e-mail: irajzer@ath.bielsko.pl

Abstract

In this study, nanofibrous composite scaffolds have been fabricated in order to mimic the physical architecture of native extracellular matrix. Gelatin is a good candidate to mimic the chemical composition of natural collagen. It has many integrin-binding sites for cell adhesion and differentiation, which are found in collagen. However, electrospun scaffold made of gelatin had very poor mechanical properties. Therefore, in this study, bilayer nanofibrous scaffolds made of gelatin and poly(caprolactone) were produced by sequential electrospinning. The microscopic morphology, mechanical properties and porosity of electrospun bilayer gelatin/polycaprolactone scaffold were investigated.

[Engineering of Biomaterials, 104, (2011), 2-4]

Introduction

In tissue engineering, scaffold are designed to serve as a temporary, artificial extracellular matrix (ECM) in order to provide an optimal environment for cells adhesion, proliferation and differentiation. Moreover the matrix should provide mechanical support and regulate cell activities. Gelatin as well as gelatin/synthetic polymers, have been gaining interest as a tissue engineering scaffold [1-5]. Gelatin exhibits similar properties to collagen, excellent biodegrability, non-antigenicity and cost efficiency [6]. Beside gelatin can promote cell adhesion, migration, differentiation and proliferation [7]. However, poor mechanical properties and water solubility have restricted gelatin's applications as nanofibrous scaffold in tissue engineering field. Recent studies have shown that combination of

natural origin polymers (such as gelatin) within synthetic polymers would optimize the physico-chemical and biological properties [8-9]. Polycaprolactone (PCL) is a bioresorbable polymer with excellent mechanical properties [10]. However PCL has an intrinsic hydrophobic chemical nature, and its poor surface wetting and poor interaction with biological fluids make cell adhesion and proliferation less intensive [11-12].

In order to produce bilayer gelatin/polycaprolactone scaffold, an electrospinning technique has been applied. Electrospinning is an easy and effective method that has been used to produce nanofibrous scaffolds out of wide range of materials. A number of processing parameters such as: applied voltage, polymer flow rate, and capillary-collector distance can greatly influence the properties of the generated fibres. By combining mentioned above parameters we can tailor the final microstructure of scaffolds [13-14].

In this study electrospinning of bilayer gelatin/polycaprolactone was found to be an efficient technique to modify PCL scaffolds. The incorporation of gelatin improved the hydrophilicity of gelatin/PCL nanofibrous scaffold and PCL provided a mechanical support.

Materials and methods

Gelatin (type A, from porcine skin) was purchased from Sigma-Aldrich. To prepare spinning solutions, 3 g of gelatin were dissolved in 30 ml of trifluoroethanol. Polycaprolactone (PCL) was purchased from Sigma-Aldrich (Mn= 70 000 - 90 000 g/mol). Chloroform and methanol 1:1 (POCH, Poland) were used as solvents for this polymer.

Scaffold fabrication

The electrospinning system (made by Institute of Textile Engineering and Polymers Materials, ATH, Bielsko-Biała) consisted of a high-voltage power supply, an infusion pump, a stainless-steel blunt-ended needle, a 10 ml plastic syringe and a custom-made rotating collecting drum. For electrospinning each sample of the prepared solutions was stocked in a 10 ml plastic syringe with a needle whose inner diameter was 0.7 mm and the filled syringe was set up in the electrospinning apparatus. Both solutions were electrospun at a fixed voltage of 30 kV and distance (15 cm) between needle tip and collector. Baking paper sheet wrapped on a rotating metal drum was used as the collecting device. In order to obtain bilayer gelatin/PCL scaffold, first PCL solution was electrospun and then gelatin was e-spun over PCL nanofibrous substrate (FIG. 1). In addition two other scaffolds made of PCL and gelatin were obtained as reference materials.

Characterization of scaffolds

The surface morphology of the composites scaffolds was examined using scanning electron microscopy (SEM, Jeol JSM 5500). Pore size distribution was determined using PMI capillary flow porometer [15]. Mechanical properties of the electrospun gelatin, gelatin/PCL and PCL scaffolds were determined using uniaxial testing machine (Zwick-Roell Z 2.5.) under a cross-head speed of 1.0 mm/min. All samples were cut into strips of 20 x 100 mm (weight x length). At least three samples were tested for each of electrospun fibrous scaffold. The thickness of samples was measured with a Thickness Tester (TILMET 73). A pressure of 2 kPa was applied for all of the thickness measurements.



FIG. 1. The electrospinning process of bilayer samples.

Results and Discussion

In order to mimic the physical architecture of natural extracellular matrix, a method to fabricate nanofibrous gelatin/PCL composite scaffold was developed in this study. FIG. 2 shows the SEM micrographs of composite bilayer gelatin/PCL scaffolds (both sides: FIG. 2c-d), as well as pure gelatin (FIG. 2a) and pure PCL (FIG. 2b) as reference samples. The microstructures of both sides of composite scaffold were similar to those of proper reference materials. The ribbon shaped fibers of gelatin nonwoven scaffold had a thickness of 200-700 nm and a width up to 5 μ m. Rapid solvent removal from the surface of the jet tended to form a skin on the jet as dried. As the evaporation progressed, the skin remained as a hollow tube, which collapsed into flat ribbon. Small branches between fibers were observed in the case of gelatin fibers as well as on the gelatin side of composite scaffold.



FIG. 2. SEM micrograph of (a) gelatin nanofibers, (b) PCL nanofibers, (c-d) bilayed gelatin/PCL scaffold.

The SEM images of PCL and PCL side of composite scaffold showed smooth and bead free surfaces of the nanofibers. The diameter of electrospun PCL fibers ranges from 300 nm to 1.2 µm. The pore size and interconnectivity between pores are also important parameters of the scaffolds. Pore size of the pure PCL scaffold were measured to be in the range of 1-2 μ m whereas for pure gelatin scaffolds 2-16 µm (FIG. 3). Addition of gelatin onto PCL scaffold increased the average pore diameter of nanofibrous composite scaffold. Fiber structure, geometrical arrangement of the fibers, individual fiber properties and interaction between fibers greatly influence the mechanical properties of nanofibrous scaffold. Representative stress-strain curves for gelatin, PCL and gelatin/PCL scaffolds are shown in FIG. 4. Compared with gelatin/PCL and pure PCL electrospun scaffolds, the gelatin nanofibrous sample showed relatively low mechanical properties. The addition of PCL greatly increased the strength and elastic behavior of the composite fibrous scaffold. The enhanced properties of finer diameter fibers (PCL) are attributed to the gradual ordering of the molecular chains and modest increase in the crystallinity of the fibers.

Since the gelation temperature of gelatin is very close to cell culture temperature (37°C) the gelatin scaffold must be crosslinked to improve its thermal and mechanical stabilities prior to its tissue engineering applications [12]. Further study will be focus on physical and chemical crosslinking methods for gelatin and on the incorporation of bioactive inorganic nanoparticles within the gelatin/PCL phase reaping up the combinatory roles of bone–bioactivity and rigidity of inorganic phase, degrability and hydrophilicity of gelatin and optimal mechanical properties of PCL.



FIG. 3. Pore size distribution of electrospun gelatin, PCL and gelatin/PCL scaffolds.

Conclusions

A significant amount of research has been directed to electrospinning nanofibrous scaffolds targeted for bone tissue regeneration. Moreover there is increasing research on the surface modifications in order to regulate cell functions from the initial cell adhesion to osteogenic stimulation of cells. In this work nanofibrous gelatin/PCL scaffolds have been successfully fabricated by electrospinning technique. Obtained results clearly showed that electrospun bilayer gelatin/polycaprolactone composite had better mechanical properties and pore size distribution than pure gelatin scaffold. The enhanced strength and porosity of obtained electrospun material would be very beneficial for tissue engineering applications. The cross-linking study of the composite and analysis of their in vitro behavior are in progress in our laboratory.



Acknowledgements

This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education (luventus Plus, project number: IP2010034270).

FIG. 4. Stress-strain curves obtained from tensile tests performed on electrospun samples (1) PCL, (2) gelatin/PCL, (3) gelatin.

References

[1] Z.X. Meng, Y.S. Wang, C. Ma, W. Zheng, L. Li, Y.F. Zheng. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. Materials Science and Engineering C 30 (2010) 1204-1210.

[2] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, S. Ramakrishna, C.T. Lim. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. Polymer 45 (2004) 5361-5368.

[3] L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatine nanofibrous scaffold for nerve tissue engineering. Biomaterials 29 (2008) 4532-4539.

[4] X. Liu, P.X. Ma. Phase separation, pore structure and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. Biomaterials 30 (2009) 4094-4103.

[5] A. Kejing, L. Haiying, G. Shidong, D.N.T. Kumar, W. Qingqing. Preparation of fish gelatin/poly(L-lactide) nanofibers by electrospinning. International Journal of Biological Macromolecules 47 (2010) 380-388.

[6] S.A. Sell, M.J. MacClure, K. Garg, P.S. Wolfe, G.L. Bowlin. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews 61 (2009) 1007-1019.

[7] J.P. Chen, C.H. Su. Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tisse engineering. Acta Biomaterialia 7 (2011) 234-243.

[8] J. Lee, G. Tae, Y.H. Kim, I.S. Park, S.H. Kim, S.H. Kim. The effect of gelatin incorporation into electrospun poly(L-lactideco-ε-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility. Biomaterials 29 (2008) 1872-1879. [9] S. Panzavolta, M. Gioffre, M.L. Focarete, C. Gualandi, L. Foroni, A. Bigi. Electrospun gelatin nanofibers: optimization of genipin crosslinking to preserve fiber morphology after exposure to water. Acta Biomaterialia 7 (2010) 1702-1709.

[10] L. Shor, S. Guceri, R. Chang, J. Gordon, Q. Kang, L. Hartsock, Y. An, W. Sun. Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering. Biofabrication 1 (2009) 1-9.

[11] 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.

[12] 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.

[13] N. Bhardwaj, S.C. Kundu. Electrospinning: A fascinating fibre fabrication technique. Biotechnology Advances 28 (2010) 325-347.

[14] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner. Use of electrospinning technique for biomedical applications. Polymer 49 (2008) 5603-5621.

[15] I. Rajzer, W. Chrzanowski, W. Binias, E. Sarna, J. Janicki. Biomimetic fibrous composite membranes for bone tissue engineering. Engineering of Biomaterials 93 (2010) 2-5.

• • • • • • • • • • • • • • •

PLA MELT-BLOWN FIBROUS STRUCTURES FOR POTENTIAL BIOMEDICAL APPLICATIONS

Monika Rom^{1*}, Joanna Grzybowska-Pietras¹, Janusz Fabia¹, Janusz Jarzębowski², Jarosław Janicki¹

¹ ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA, INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS, WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND ² POLMATEX-CENARO RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER OF TEXTILE MACHINERY, WOLCZANSKA 55/59, 90-608 LODZ, POLAND * E-MAIL: MROM@ATH.BIELSKO.PL

Abstract

The paper presents results of experiments on formation of nonwoven fabrics from PLA biopolymer. Fibrous structures with parameters advantageous for application as a scaffold for tissue engineering were prepared from polylactide by melt-blown technology. Process optimization enables to obtain ultra-fine fibers. Sizes of pores formed in the material during melt-blown process can be tailored by formation of fibers of defined diameters.

Keywords: melt-blown, fibers, PLA, nonwoven

[Engineering of Biomaterials, 104, (2011), 5-7]

Introduction

Fibrous structures due to the advantageous high surface to volume ratio are good materials for tissue scaffolding purposes. When engineering fibrous scaffolds not only fibers diameters but also distances between fibers, forming pores should be taken into account, to ensure cells migration into the fibrous network and cells mobility within this network. In order to do this one need to remember is that the average size of cell can be at the range of 10-50 μ m in the case of osteoblast, fibroblast or chondrocyte [1], so that the pores of sufficient diameters are indispensible to avoid shearing of cells during their migration within the fibrous network [2].

Ultra-thin polymer fibers have great potential for applications in a wide variety of fields, including sensors, filtration and separation membranes or biomedical applications, however the final application strongly depends on polymer composition used for fibers spinning. Conventional methods of fiber formation based on fiber drawing allow to obtain fibers of diameters at the level of 10-100 µm. In order to obtain fibers of smaller diameters one has to apply more complicated methods, including bi-component spinning of two different polymers, melt-blown or electrospinning [3-5]. Each of those methods has advantages and drawbacks. Bi-component spinning of two different polymers allows to obtain continuous bunches of parallel, long micro fibers, however it is a multi-step process. The electrospinning is a versatile method of formation on ultra-thin fibers both from the melt and the solutions, however is still a challenge to scale-up of the process up to quantities of kg/h. The third method, melt-blown is a method capable of formation ultra-fine fibers in form of nonwoven in a one stage, but it is limited only to thermoplastic polymers [3,5]. In melt-blown process molten polymer is extruded from the die holes, and then streams of high velocity hot air attenuate the polymer streams to form microfibers, which are subsequently laid randomly on the collecting screen forming self-bonded nonwoven web.

Fibers' thickness depends on combination of parameters including melt-temperature and viscosity as well as velocity and temperature of hot air. The schematic draw of the process is presented in FIG. 1. Even though polypropylene has been so far the most popular polymer used in melt-blow processes, the other thermoplastic polymers, including polylactide, can be used in this process as well [6]. In this work we will discuss morphology and selected physical properties of 3D structures obtained by melt-blown spinning of polylactide which indicate that melt-blown spinning of PLA can be potentially useful for fabrication of biodegradable polymeric scaffolds for tissue engineering.



FIG. 1. Schematic drawing of melt-blown process.

Materials and methods

Nonwoven samples were fabricated from commercial grade NatureWorks®PLA 3051D using lab-scale melt-blown setup WX34 based on single screw extruder (d=25 mm) and flat die head with 80 orifices (diameter 0.5 mm) which enable formation of nonwoven web of 80-100 mm width. The efficiency of WX34 setup is up to 10 kg/h which can be reached in the case polypropylene with high melt-flow index, but in presented case nonwovens were formed with efficiency of 0.4; 0.6; 0.8 and 1 kg/h. Air velocity which attenuated the molten polymer stream into the fiber was at the range of 50-150 m/s. Other processing parameters such as temperatures, pressure, output and conveyor velocity were registered automatically and are given in TABLE 1. Processing temperatures were evaluated from DSC experiments (TA Instruments 5100). In order to prevent viscosity changes due to hydrothermal degradation nonwovens were formed form polymer dried previously to the water content of 0.025% (250 ppm), according to producer's recommendation.

Diameters of fibers were estimated based on SEM analysis (Jeol JSM 5500LV). Basis weight of fibrous webs was measured according to standard (PN-83/P-04602). Timlet-73 setup was used to measure the thickness. Density of nonwoven was calculated from samples geometry. Mean pore size and pore sizes distribution were estimated using PMI capillary flow porometer.

TABLE 1. Processing parameters of melt-blown PLA nonwovens formation.

Temperature of beating	I	195
		240
20103 [0]		255
Temperature of pump [°C]	-	255
Temperature of spinret [°C]	-	250
Melt temperature [°C]	-	268
Tomporature of air [0C]	at heater	250
	at the air outflow	215
Distance from spinret to conveyor [mm]	-	110

BI MATERIALS

Results and Discussions

6

According do DSC analysis (FIG. 2) NatureWorks PLA 3051D should be processed at temperature above 160°C. The polymer is stable at least to 250°C, however TGA (not shown here) confirmed stability up to at least 280°C. The temperature of molten polymer during the process was established experimentally, that is at registered melt temperature of 268°C process was stable and quality of obtained nonwovens was satisfactory (organoleptic estimation).

As observed from SEM microphotographs presented in FIG. 3 diameters of fibers depend on process efficiency and air velocity. The thinnest fibers with diameters at the level of up to 5 µm were obtained in the case of spinning with medium air velocity (100 m/s) and the lowest efficiency. Too high air velocity (150 m/s) resulted in breaking of polymer streams before they were attenuated into thin fibers. As the effect relatively thick entangled fibers were formed. Due to the intensive contraction of the solidifying broken fibers there can be observed characteristic structures on the fibers' surface (FIG. 3 b1, c1), which were not observed in the case of fibers solidified by air of lowest velocity (50 m/s) (FIG. 3 a1). On the other hand when the air velocity is too low (~50 m/s) the drawing forces are not enough to form thin fibers, however the fibers are relatively straight and smooth. The surface roughness which is the result of uneven radial solidification resulting in shrinkage of polymer can be beneficial as it potentially could enhance cells attachment.

Melt blown process allows to fabricate materials of controlled porosity, dependent mainly on the diameters of entangled fibers, as only thickness of fibers crossing each other limits distances between them [7]. Results of porosimetric studies (TABLE 2) have confirmed that the lower were diameters of fibers the smaller were average pores sizes. The same was observed in the case of pore sizes distribution, which was much more narrow in the case of the thinnest fibers. The knowledge of processing parameters is critical for the sake of construction of 3D structure, which can be formed by subsequent formation of layers composed of fibers of different diameters and porosity. The example of such possible structure is presented in FIG. 4.



FIG. 2. DSC scan of raw PLA 3051D; estimation of processing temperatures, glass transition region and melting region.



FIG. 3. SEM microphotographs of melt-blown PLA microfibers spun at variable air velocity: a) 50 m/s; b) 150m/s; c) 100 m/s.

TABLE 2. Parameters of nonwovens obtained by melt-blown process.

Sample	Basis weight [g/m²]	Thickness of nonwoven [mm]	Average pore sizes [µm]	Main fraction of pores [µm]	"Bubble point" (*) [µm]
а	270	3.05	45.1	41.8-47.4	412
b	120	1.25	82.5	79.2-86.2	420
С	30	0.38	13.8	13.4-14.3	23
(*) Bubble point - material's largest through-pore					

.....

15 к. Х. Х. АВУ ТЭмт 25/№0/89

FIG. 4. An example of layer-by-layer structure of PLA melt-blown nonwoven composed of fibers of different diameters.

Conclusions

Melt-blown technology was applied to obtain microfibrous nonwoven structures from polylactide. Pore sizes of the nonwoven and their distribution suggest that the process can be appropriate to fabricate fibrous scaffolds for tissue engineering. Process parameters enable to tailor diameters of fibers and density of nonwoven structures. Moreover the efficiency of the process is high as it is possible to take advantage of existing textile technologies.

Acknowledgments

Research was supported by National Centre for Research and Development project N° PBZ-MNISW-O1/II/2007.

References

[1] Alberts B., et all, Molecular Biology of the Cell, 4th edition; New York: Garland Science; 2002.

[2] Yim E.K., Leong, K.W. Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold, J Biomater Sci Polym Ed 16 (10) (2005), pp. 1193-1217.

[3] Ellison Ch.J., Phatak A., Giles D. W., Macosko Ch.W., Bates F.S., Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup; Polymer 48 (2007) 3306-3316.

[4] Reneker D.H., Chun I., Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, Nanotechnology 7 (1996), pp. 216-223.

[5] Wadsworth, L. C., Malkan, S. R., A Review of Melt Blowing Technology, INB Nonwovens, p. 2, 1991.

[6] Gupta B., Revagade N., Hilborn J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. Prog. Polym. Sci. 32 (2007) 455-482.

[7] Eichhorn, S. J.; Sampson, W. W., Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. Journal of the Royal Society Interface 2005, 2, (4), 309-318.

MANUFACTURING AND CHARACTERIZATION OF RESORBABLE PLGA MEMBRANES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Małgorzata Krok¹, Carolina Ferreira², Soraia Fernandes², Dorota Kościelniak³, Piotr Dobrzyński⁴, Elżbieta Pamuła^{1*}

¹AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials, al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Krakow, Poland ²FEUP – University of Porto, Faculty of Engineering, Rua Dr. Roberto Frias, s/n 4200-465 Porto, Portugal ³Jagiellonian University, Collage of Medicine, Department of Pedodontics, ul. Montelupich 4, 31-155 Krakow, Poland ⁴Polish Academy of Sciences,

CENTER OF POLYMER AND CARBON MATERIALS

UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE, POLAND * E-MAIL: EPAMULA@AGH.EDU.PL

Abstract

Porous poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) membranes were prepared by solvent-casting/porogen leaching method. Poly(ethylene-glycol) (PEG) with two molecular weights was used as a pore former. Mechanical properties of the membranes were analyzed in tensile test. Topography, pore size and surface roughness were characterized by atomic force microscopy on both sites of the membranes. PEG leached out percentage, thickness and wettability were also measured. Osteoblast-like cells were cultured on the membranes for 24 h and 6 days, and morphology, distribution and number of adhered cells as well as secretion of proteins and nitric oxide were measured. The results show that PEG molecular weight affected size and distribution of pores on both surfaces of the membranes. It resulted also in different mechanical characteristics of the membranes. In vitro experiments show that the membranes support adhesion and growth of osteoblast-like cells suggesting their usefulness for guided tissue regeneration (GTR).

Keywords: PLGA, PEG, porous membrane, phaseseparation method, GTR

[Engineering of Biomaterials, 104, (2011), 8-13]

Introduction

Membranes are widely used in medical applications, e.g. for separation and purification purposes, as scaffolds for tissue engineering, in drug delivery systems, artificial organs, diagnostic devices and guided tissue regeneration (GTR)[1-4]. GTR, a biological treatment concept, is aimed to ensure that cells with capacity to regenerate a particular type of lost or diseased tissue are allowed to colonize the defect/wound during healing using a barrier membrane [5]. This procedure was developed particularly for the treatment of dental bone defect to ensure that periodontal ligament cells, bone cells,

and cementoblasts selectively repopulate the periodontal wound area and protect the unwanted re-growth of the gingival epithelium and connective tissue [6,7].

Membranes can be prepared by different methods such as electrospinning [8], sintering [2] and freeze-gelation method [9]. Another method that is of great interest because of the simplicity and cost efficiency is phase separation [10,11]. In this method, usually there are two types of polymers present: one of them remains in the end-use and the other is removed as a pore former [12]. Phase separation was used to produce porous poly(L-lactide) membranes with PEG as a porogen by Nakane et al. [13] and Tsuji et al. [14].

PLGA is an interesting synthetic polymer to produce barrier membranes for GTR in periodontology, because of their biodegradability and biocompatibility [15,16]. Moreover its advantage is degradation by hydrolysis resulting in release of non-toxic degradation products, i.e. lactic acid and glycolic acid. These compounds are produced naturally in the human body in different physiological pathways and eliminated by Krebs cycle as water and carbon dioxide, so their toxicity is minimal [17].

PEG is a polymer widely used in several biotechnological and biomedical applications. For example, it prevents protein adsorption, facilitates formation of multi-phase polymeric systems; it is also non-immunogenic and non-antigenic. With its low reactivity and high solubility in water it has attracted much attention to be used as a pore former [13-14,18].

It was shown that depending on the molecular weight and concentration of the porogen, solvent type and weight ratios of the polymers, it is possible to control the microstructure of the resulting membranes [2,4,10]. Owen *et al* [19] studied cell behavior in PLGA/PEG blends, and concluded that these membranes have a great potential to be used in clinic, more specifically in GTR.

The goal of this study was to produce PLGA porous membranes by using PEG with two different molecular weights to obtain specific porous microstructures. The pores were created by leaching out water-soluble PEG from PLGA/PEG blends. A physical and mechanical characterization of the membranes was performed to study their applicability in GTR. Moreover, a biological experiment was conducted in order to provide information about biocompatibility and interaction between osteoblast-like cells and the membranes.

Experimental

Materials

PLGA with 85:15 molar ratio of L-lactide and glycolide and molecular weights M_n =100 kDa and M_w =210 kDa was synthesized in bulk by ring-opening polymerization using low toxic zirconium compound as an initiator [16]. As a pore former, PEG purchased from Aldrich, Germany (molecular weight M_n =1450 Da and M_n =200 Da) was used.

Membrane preparation

PLGA was dissolved in dichloromethane (POCh, Gliwice, Poland) (10% wt/vol.) with magnetic stirring overnight. Then 60 wt% of PEG was added to the PLGA solution and left under stirring during 20 min. After that 7.5 ml of the solution was slip-casted on a Petri dish and dried in air and in vacuum. Next PEG was leached out in ultra-high quality water (UHQ, Elga Purelab, UK) during 4 days, to obtain a porous structure. The resulting membranes were cut into circles (1.4 cm in diameter) and sterilized in ethanol (70%). After, they were washed in phosphate buffer saline (PBS) and UV light-sterilized for 20 min at both sides.

Membrane characterization

Atomic force microscopy (AFM)

The topographical images of both surfaces of the membranes were taken on atomic force microscope (Explorer, Veeco, USA) in contact mode at room temperature. The size of pores and roughness (Ra) of the obtained membranes were measured.

Wettability

Wettability of the membranes was estimated by water drop shape analysis (DSA 10, Krüss, Germany). Water contact angle was averaged from 10 droplets with a volume of 0.20 μ l which were placed on both surfaces of the membranes.

Tensile test

Tensile testing was conducted with universal testing machine (Zwick 1435, Germany). The test speed was 100 mm/min with 0.1 N pre-load, specimen length of 40 mm and specimen width of 5 mm

Percentage of PEG leached out

To ensure PEG removal, leaching out was performed by excessive washing with UHQ water. Percentage of PEG leached out from the membrane was calculated from the equation (1):

$$PEG_leach_out(\%) = 100\% - \frac{W_0}{W_c} * 100\%$$
(1)

where W_0 and W_f were the weights of membranes before and after leaching, respectively.

Thickness

The thickness of each membrane was measured in six different places using a micrometer screw.

Biological experiment

Cell culture and seeding

Osteoblast-like cells MG-63 (LGC/ATCC, UK) were cultured in MEM (PAA, Austria) medium supplemented with foetal bovine serum (10%) (Sigma, Germany), penicillin-streptomycin (1%), sodium pyruvate (0.1%) and amino acids (0.1%) (PAA Austria). For subcultures, cells were trypsinized, suspended in culture medium and 1.3×10^4 cells were seeded on each sample and cultured in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The cells were then analysed in two time points: 24 h and 6 days.

Cells morphology and distribution

The cells were fixed in paraformaldehyde and stained with acridine orange solution (1 mg/ml, Sigma, Germany) in order to perform a microscopic observation by fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 40, Carl Zeiss, Germany).

Crystal violet

Crystal violet (CV) is a useful assay to analyze quantitatively the relative density of cells adhering to the material. First paraformaldehyde was used to fix the cells. Next the samples were washed with PBS and 0.5 ml of CV solution (0.5% CV in 20% of methanol) (Sigma, Germany) was added. After washing the samples with tap water, CV was extracted in 1 ml of 100% methanol. 10 minutes later, 100 µl of the supernatant were transferred to a 96 well-plate and the absorbance was measured at 570 nm using a Multiscan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, USA).

Protein content

To determine the total content of protein in the cells' supernatants, the bicinchoninic acid test (BCA, Sigma Germany) was carried out. The BCA reagent was prepared just before the assay by mixing $CuSO_4$ solution (4%) with BCA in the proportion of 1:50. Then 10 µl of the supernatant and 200 µl of BCA reagent were added to a 96 well-plate. After 30 min incubation in dark the absorbance was measured at 540 nm.

Nitric oxide level

Nitrite/nitrate production, an indicator of nitric oxide (NO) synthesis, was measured in cell culture supernatants by the Griess reaction. To perform this assay Griess reagent A – 0.1% naphthalethylenediamine dihydrochloride (Sigma Germany) in water and Griess reagent B – 1% sulfanila-mide (POCH Poland) in 5% H_3PO_4 were mixed (1:1, v/v). Next 100 µl of the supernatant and 100 µl of the Griess reagent (A+B) were transferred to 96-well plate. The absorbance was measured at 540 nm.

Results

Characterization of PLGA membranes

Atomic force microscopy

FIG. 1 shows AFM pictures for scan areas of $20 \ \mu m \times 20 \ \mu m$ and $100 \ \mu m \times 100 \ \mu m$ of both sides (top, e.g. air-cured and bottom, e.g. glass-cured) of the membranes produced with two PEGs differing in molecular weight (200 Da and 1450 Da). It can be seen that PLGA/PEG 200 has similar porous topography on both sides. The size of pores (TABLE 1) and average roughness (FIG. 2) of this membrane are the same. On the other hand PLGA/PEG 1450 membrane has an asymmetric microstructure: the top surface is non-porous, while the bottom surface has the highest roughness and the biggest pores.

Wettability

The contact angle measurements were carried out to evaluate wettability of PLGA/PEG membranes. The results are presented in TABLE 1. The contact angle is about 85° for all the surfaces, except for bottom surface of PLGA/ PEG1450, for which contact angle is about 10 degrees lower. However the results are not significantly different according to t-test (p < 0.05).

Tensile test

Mechanical properties of the samples were evaluated in tensile test and three parameters were measured: tensile strength Rm (MPa), Young's Modulus (MPa) and total elongation at break $\epsilon_{\text{Ftotal}}(\%)$. TABLE 2 shows the results for the membranes and FIG. 3 shows representative stress-strain curves. Both membranes have similar tensile strength and Young's modulus but PLGA/PEG 200 membrane has significantly higher elongation at break.

PEG leached out percentage and membranes' thickness

The results of percentage of PEG leached out and membranes' thickness are shown in TABLE 2. As it can be seen PEG leaching out from both membranes is slightly higher than 60 wt%. The thickness of the membranes, as expected, is about 50 μ m.



FIG. 1. AFM images of PLGA membranes obtained with use of PEG 200 (A,B,C,D) and PEG 1450 (E,F,G,H); top surface (A,C,E,G), bottom surface (B,D,F,H); scanned areas: 100 μ m x 100 μ m (A,B,E,F) and 20 μ m x 20 μ m (C,D,G,H).



FIG. 2. Roughness obtained by AFM image analysis for top and bottom surfaces of the membranes: PLGA/PEG 200 and PLGA/PEG 1450. Data are expressed as average \pm standard deviation, n=3. Diamond (*) indicates statistically significant difference according to t-test between the groups: p<0.05.



FIG. 3. Tensile test representative curves of PLGA membranes obtained using different molecular weight of PEG.

TABLE 1. Pore size and contact angle of PLGA/PEG membranes obtained with different molecular weight of PEG. Data are expressed as average \pm standard deviation, n=30-40 for pore size and n=10 for contact angle, nd=not detectable. Diamond (*) indicates statistically significant difference according to t-test between the groups: p<0.05.

Material		Pore Size [µm]	Contact Angle [θ]
PLGA/	Тор	3.30 ± 0.18	89 ± 6
PEG 200	Bottom	3.75 ± 0.13	83 ± 6
PLGA/	Тор	nd	85 ± 5
PEG 1450	Bottom	5.75 ± 0.20*	76 ± 15

TABLE 2. Mechanical properties, thickness and percentage of PEG leached out of PLGA membranes (PLGA/PEG) obtained with different molecular weight of PEG. Tensile strenght (Rm), Young's modulus (E-Modulus), total elongation at break (ϵ_{Ftotal}). Data are expressed as average ± standard deviation, n=6 for thickness, n=3 for PEG leached out and n=5 for tensile test. Diamond (\bullet) indicates statistically significant difference according to t-test between the groups: p<0.001.

Membrane	Rm [MPa]	E-Modulus [MPa]	ε _{Ftotal} [%]	PEG leached out [wt%]	Thick- ness [µm]
PLGA/	13.8	724	49	63.3	50
PEG 200	± 1.1	± 16	± 18*	± 0.7	± 0.7
PLGA/	13.3	750	4.7	62.8	51.5
PEG 1450	± 3.1	± 141	± 2.6	± 0.4	± 4.9



FIG. 4. Measurement of cells' attachment by crystal violet test performed after 24 h (A) and 6 days of culture (B) on PLGA/PEG 200 and PLGA/PEG 1450 membranes of both surfaces (top and bottom), PLGA foil and TCPS as the control (total TCPS absorbance = 1). Data are expressed as average \pm standard deviation, n=4. Asterisks (*), circles (o) and diamonds (•) indicate statistically significant differences from the TCPS control, PLGA and between the groups, respectively: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.





In vitro experiment

Cells morphology and distribution

Fluorescence microscopy observation showed that the number of cells after 6 days was higher than after 24 h and the cells were well spread. On all the surfaces including control PLGA foil and TCPS the cells were distributed homogenously, except the bottom surface of PLGA/PEG 1450, where the cells tended to grow in agglomerates (data not presented).

Crystal violet

CV staining, which is often used for the indirect quantification of number of adherent cells, stains DNA that can be quantified in a spectrophotometer [20]. All results were recalculated in relation to the values obtained from control TCPS wells (total TCPS absorbance = 1). As it can be seen in FIG. 4 there are significant differences between control samples (TCPS and PLGA foil) and the membranes. The number of adherent cells is higher on the membranes than on controls after 1 day. The same tendency is visible after 6 days. However, after 6 days of culture, there is also a significant difference between PLGA and TCPS. Moreover, significant differences between both surfaces of the membrane PLGA/PEG 200 are found.

Protein content

The BCA protein assay combines the reduction of Cu²⁺ to Cu¹⁺ by protein in an alkaline medium with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cation Cu¹⁺ by bicinchoninic acid [21]. The obtained results from this experiment are presented in FIG. 5A. The total amount of protein in the supernatants from cell cultures on all the materials is similar in both time points. There are not statistically significant differences between the samples.

Nitric oxide level

NO plays an important role in several physiological processes including vascular regulation, immune responses and neural communication [22]. The NO value is similar for both time points and materials evaluated (FIG. 5B).

The main purpose of this work was to produce resorbable membranes by phase separation/porogen leaching and evaluate their physical, mechanical and biological properties. Two different types of PLGA membranes were produced with PEG 200 Da and 1450 Da, as pore formers. Surface and mechanical properties of the membranes were characterized. Moreover the membranes were tested in contact with osteoblast-like cells to study their cytocompatibility.

The total percentage of PEG leached out from the blends (TABLE 2) of around 63%, was slightly higher than the expected value, because the ratio PEG/PLGA used to produce the membranes was 60/40. One can assume that excessive washing was enough to ensure the PEG removal, creating a porous structure; however it probably accelerated hydrolytic degradation of the PLGA structure.

In order to study the membranes' morphology, AFM analysis was carried out. There was a considerable difference in the membranes' topography: PLGA/PEG 200 top and bottom surfaces presented similar Ra values and similar size of pores while PLGA/PEG 1450 had distinct values for each surface. The air-cured surface was non-porous, while on the glass-cured surface bigger pores were present.

This fact can be explained by the formation mechanism of the porous structure. Due to higher molecular weight of PEG 1450, PEG-rich domains were bigger and sediment to the bottom surface; that is why, after leaching, this surface was more porous than the air-cured surface [23]. On the other hand the use of PEG with low molecular weight led to a homogeneous distribution of PEG-rich domains in PLGArich phase. For these reasons PLGA/PEG 200 membrane was more homogeneous while PLGA/PEG 1450 membrane presented an asymmetric microstructure. The results from this study are consistent with our previous results for PLGA membranes obtained with the use of PEGs with molecular weight in the range 300 – 3400 Da [24].

The wettability test showed that for more smooth surfaces, the contact angle was higher, meaning the surface was more hydrophobic. This is in agreement with Wentzel theory, which is describing the influence of the surface roughness on wettability [25]. Another possible explanation of lower contact angle on bottom surface of PLGA/PEG 1450 membrane is that hydrophilic PEG was not leached out properly. However this hypothesis should be ruled out, because percentage of PEG leached out from the membrane was as expected.

The mechanical analysis by the tensile test confirmed that application of PEGs with different molecular weight resulted in the membranes with different mechanical characteristics. The membranes had the same tensile strength and Young's modulus, but different elongation at break (FIG. 3, TABLE 2). The higher flexibility of PLGA/PEG 200 membrane is an important parameter for material handling during the surgery.

Biological tests were performed in order to evaluate the properties of the materials important from the point of view of possible medical applications. With the aim to verify cell morphology and distribution during cell culture, a fluorescent microscopy assay was done. The cells adhered and grew on the membranes with a cell number increasing from day 1 to day 6. Microscopic observations showed that higher roughness and porosity of the bottom surface of PLGA/PEG 1450 membrane on day 1 resulted in agglomerated groups of cells within the pores which are not well spread and therefore the material was not homogeneously colonized. After 6 days the cells colonized the entire surfaces of the membranes.

Crystal violet staining was conducted in order to study the cells attached after 24 h and 6 days of culture. The results show a high absorbance value for the PLGA/PEG 1450 membrane in both time points and surfaces (FIG. 4). However these values are not credible because probably the dye remained trapped in the membrane especially in PLGA/PEG1450 and therefore it is rather difficult to infer about the adhered cell number from these data.

The results of protein level (FIG. 5A) demonstrated the same protein concentration after 24 h than 6 days of culture. This can be explained by the fact that in the beginning of cell culture the medium was fresh, i.e. proteins from serum were present in the medium. At day 6 probably an equilibrium between consumed and produced proteins was reached.

It is well known that NO plays an important role in cellular metabolism. Although a high value of NO can involve toxicity including disruption of mitochondrial respiration, enzyme inhibition, lipid peroxidation and genetic mutation. This toxicity is mediated by intermediates such as N_2O_3 and peroxynitrite [26]. As it was verified (FIG. 5B) the NO level was low for the cells cultured on all the materials suggesting that the materials are not toxic for osteoblast-like cells.

Conclusions

It was demonstrated in this study that solvent-casting leaching-out PEG from PLGA/PEG blends is a very useful method to obtain PLGA porous membranes prospective for biomedical applications. Mechanical properties, microstructure, pore size and distribution of the pores in the membranes can be controlled by molecular weight of PEG used. Interestingly, higher molecular weight PEG provides asymmetric membranes with non-porous skin in the air-cured surface and the membranes are rather brittle. Contrarily, low molecular weight PEG provides membranes with homogenously distributed pores within the membranes, which are highly deformable. It was proven that PLGA membranes allow cellular colonization *in vitro*, which is of key importance for GTR application in the clinic.

Acknowledgments

Funding for this study was provided by the Polish Ministry of Science and Higher Education (grant no N N507 280736) and the National Centre for Research and Development (grant no N N507 234640). LLP Erasmus Program is acknowledged for financial support of Carolina Ferreira and Soraia Fernandes.

References

[1] Ulbricht M.: Advanced functional polymer membranes, Polymer 47 (2006), 2217-2262.

[2] Stavropoulos A., Sculean A., Karring T.: GTR treatment of intrabony defects with PLA/PGA copolymer or collagen bioresorbable membranes in combination with deproteinized bovine bone (Bio-Oss), Clin Oral Invest 8 (2004), 226-232.

[3] Ratner D., Hoffman S., Schoen F., Lemons J.: Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine. 2nd Edition. Elsevier Academic Press. (p121).

[4] Stamatialis D. F., Papenburg B .J., Gironés M., Saiful S., Bettahalli S. N. M., Schmitmeier S., Wessling M.: Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering, J Membr Sci 308 (2008), 1-34.

[5] Karring T., Nyman S., Gottlow J., Laurell L.: Development of the biological concept of guided tissue regeneration - animal and human studies, Periodontol 2000 1 (1993), 26-35.

[6] Gottlow J.: Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results, J Periodontol 64 (1993), 11 Suppl :1157-1165.

[7] Tatakis D. N., Promsudthi A., Wikesjö U. M.: Devices for periodontal regeneration. Periodontol 2000 19 (1999), 59-73.

[8] Kim K. H., Jeong L., Park H. N., Shin S. Y., Park W. H., Lee S. C., Kim T. I., Park Y. J., Seol Y. J., Lee Y. M., Ku Y., Rhyu I. C., Han S. B., Chung C. P.: Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration, J Biotechnol 120 (2005), 327-339.

[9] Ho M. H., Hsieh C. C., Hsiao S. W., Thien D. V. H.: Fabrication of asymmetric chitosan GTR membranes for the treatment of periodontal disease, Carbohyd Polym 79 (2010), 955-963.

[10] Jae-Kyung K., Kentaro T., Shinsuke N., Masahiro O.: Preparation of a polymeric membrane with fine porous structure by dry casting, J Appl Polym Sci 111 (2009), 2518-2526.
[11] Van De Witte P., Dijkstra P. J., Van Den Berg J. W. A., Feijen J.:

[11] Van De Witte P., Dijkstra P. J., Van Den Berg J. W. A., Feijen J.: Phase Separation process in polymer solutions in relation to membrane formation, J Membr Sci 177 (1996), 1-31.

[12] Kesting R.E.: Polymer solutions, Synthetic Polymeric Membranes, A Structural Perspective, Wiley 1985, New York.

[13] Nakane K., Hata Y., Morita K., Ogihara T., Ogata N.: Porous poly(L-lactic acid)/poly(ethylene glycol) blend films, J Appl Polym Sci 94 (2004), 965-970. [14] Tsuji H., Smith R., Bonfield W., Ikada Y.: Porous biodegradable polyester. I. Preparation of porous poly(L-lactide) films by extraction of poly(ethylene oxide) from their blends, J Appl Polym Sci 75 (2000), 629-637.

[15] Seyednejad H., Ghassemi A. H., Van Nostrum C. F., Vermonden T., Hennink W. E.: Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications, J Control Release 152 (2011), 168-76.

[16] Pamula E., Filova E., Bacakova L., Lisa V., Adamczyk D.: Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblastlike MG 63 cells, J Biomed Mater Res 89A (2009), 432-443.

[17] Jain R. A.: The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, Biomaterials 21 (2000), 2475-2490.

[18] Harris J. M.: Poly(ethylene glycol) Chemistry: biotechnical and biomedical applications, Plenum Press 1992, Chapter 1, New York.

[19] Owen G. Rh., Jackson J., Chehroudi B., Burt H., Brunette D. M.: A PLGA membrane controlling cell behavior for promoting tissue regeneration, Biomaterials 26 (2005), 7447-7456.

[20] Chiba K., Kawakami K., Tohyama K.: Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells, Toxicology in Vitro 12 (1998), 251-258.

[21] Smith P.K et al.: Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal Biochem 150 (1985), 76-85.

[22] Van Faassen E. E., Vanin A. F.: Radicals for life: The various forms of nitric oxide, Elsevier 2007, Amsterdam. ISBN-13: 978-0-444-52236-8.

[23] Lin W., Lu C.: Characterization and permeation of microporous $poly(\epsilon$ -caprolactone) films, J Membr Sci 198 (2002), 109-118.

[24] Krok, M. Pamula, E.: Poly(L-lactide-co-glycolide) microporous membranes for medical applications produced with the use of polyethylene glycol as pore former - submitted.

[25] Kiss E., Bertóti I., Vargha-Butler E. I.: XPS and wettability characterization of modified poly(lactic acid) and poly(lactic/glycolic acid) films, J Colloid Interface Sci 245 (2002), 91-98.

[26] Gordge. M. P.: How cytotoxic is nitric oxide? Institute of urology and nephrology, university college London, UK. Exp Nephrol 6 (1998), 12-16.

•••••

OCENA SEKRECJI PROZAPALNYCH CYTOKIN PRZEZ LUDZKIE CHONDROCYTY HODOWANE NA BIORESORBOWALNYCH MATERIAŁACH POLIMEROWYCH

JOANNA WAWSZCZYK^{1*}, ARKADIUSZ ORCHEL², KATARZYNA JELONEK⁴, PIOTR PADUSZYŃSKI², JOANNA ORCHEL³, PIOTR DOBRZYŃSKI⁴, JANUSZ KASPERCZYK^{2,4}, IRENEUSZ BIELECKI⁵

¹ KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC ² KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC ³KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC ⁴ CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH, POLSKA AKADEMIA NAUK, UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE ⁵ KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII DZIECIĘCEJ, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. MEDYKÓW 16, 40-752 KATOWICE * E-MAIL: JWLADARZ@POCZTA.ONET.PL

Streszczenie

Tkanka chrzęstna charakteryzuje się małą zdo-Inościa regeneracji oraz niewielkim potencjałem do prawidłowej odbudowy, dlatego też, dotychczas stosowane metody leczenia uszkodzeń chrząstki są niewystarczające. Nadzieję na przełom w leczeniu wielu chorób chrząstki, jak również regenerację tej tkanki, daje inżynieria tkankowa wykorzystująca m.in. syntetyczne polimery z grupy poliestrów alifatycznych i poliwęglanów takie jak kopoolimery glikolidu, ε-kaprolaktonu, L-laktydu oraz trimetylenowęglanu zsyntetyzowane za pomocą nowatorskiej metody wykorzystującej jako inicjator polimeryzacji acetyloctan cyrkonu. W ramach niniejszej pracy dokonano oceny biozgodności wybranych biodegradowalnych materiałów w oparciu o poziom sekrecji prozapalnych cytokin IL-1a i IL-1β, IL-6 oraz IL-8 oznaczonych metodą ELISA. Spośród badanych polimerów biodegradowalnych podłoża o składzie PCLGA 92:8, PLAGA 85:15, PLATMC 70:30, PLATMC 30:70, PLATMC 50:50 wydają się charakteryzować największą biozgodnością, gdyż ich obecność nie powodowała istotnego wzrostu sekrecji cytokin prozapalnych przez chondrocyty rosnące na ich powierzchni. Pozostałe badane materiały polimerowe powodowały pewne niepożądane reakcje komórek związane ze stymulacją uwalniania niektórych spośród analizowanych cytokin prozapalnych przez chondrocyty. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, iż podłoża wykonane z analizowanych w pracy polimerów biodegradowalnych zsyntetyzowanych przy użyciu acetyloacetonianu cyrkonu zasługują na dalszą uwagę, gdyż niosą nadzieję na umożliwienie leczenia ubytków tkanki chrzęstnej.

Słowa kluczowe: chondrocyty, IL-6, IL-8, polimery biodegradowalne

[Inżynieria Biomateriałów, 104, (2011), 14-22]

SECRETION OF PROINFLAMMA-TORY CYTOKINES BY HUMAN CHONDROCYTES CULTURED ON BIODEGRADABLE POLYMERS

Joanna Wawszczyk^{1*}, Arkadiusz Orchel², Katarzyna Jelonek⁴, Piotr Paduszyński², Joanna Orchel³, Piotr Dobrzyński⁴, Janusz Kasperczyk^{2,4}, Ireneusz Bielecki⁵

¹ DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND ² DEPARTMENT OF BIOPHARMACY. MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND ³ DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND ⁴ CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCES. CURIE-SKLODOWSKA 34 ST., 41-819 ZABRZE, POLAND ⁵ DEPARTMENT OF PEDIATRIC SURGERY. MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, MEDYKÓW 16, 40-752 KATOWICE, POLAND * E-MAIL: JWLADARZ@POCZTA.ONET.PL

Abstract

Cartilage characterizes low potential to regeneration and proper reconstruction. Nowadays, methods of cartilage lesions treatment are unsatisfactory. Tissue engineering is very promising in therapy of many cartilage injures as well as regeneration of this tissue. Biodegradable aliphatic polyesters and polyesterocarbonates such as copolymers of glycolide, L-lactide, *ɛ*-caprolactone and trimethylene carbonate were synthesized using a novel method employing non-toxic zirconium acetylacetonate as initiator of polymerization. The aim of the study was to examine biocompatibility of selected biodegradable materials based on the level of secretion of proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8. Our results show, that among the studied biodegradable polymers the PCLGA 92:8, 85:15 PLAGA, PLATMC 70:30, PLATMC 30:70, 50:50 PLATMC were characterized by highest biocompatiblity, because they do not cause a significant increase in secretion of proinflammatory cytokines by chondrocytes growing on their surface. Other polymers could cause up-regulation of some proinflammatory cytokines secretion by chondrocytes cultured on their surface. The other tested polymeric materials did not induce the release of proinflammatory cytokines by chondrocytes. Generally, it should be concluded that the studied biodegradable copolymers synthesized with the use of zirconium acetylacetonate as initiator of polymerization deserve further attention. as being promising for the treatment of cartilage defects.

Keywords: chondrocytes, IL-6, IL-8, biodegradable polymers

[Engineering of Biomaterials, 104, (2011), 14-22]

Wprowadzenie

Tkanka chrzęstna charakteryzuje się małą zdolnością regeneracji i niewielkim potencjałem do prawidłowej odbudowy. Właściwość ta jest głównym czynnikiem ograniczającym skuteczne leczenie ubytków w jej obrębie. Dotychczas stosowane metody leczenia uszkodzeń chrząstki są niewystarczające. Nadzieję na przełom w leczeniu wielu chorób chrząstki, jak również regenerację tej tkanki, daje inżynieria tkankowa [1]. Rozwój inżynierii tkankowej oraz współczesnych form terapii schorzeń tkanki chrzęstnej jest związany z poszukiwaniem nowych biozgodnych i bioresorbowalnych materiałów mogących posłużyć do wytworzenia nośników dla komórek. Jedną z istotnych właściwości biodegradowalnych biomateriałów według A. V. Lloyd'a [2] jest brak zdolności do indukcji stanu zapalnego lub toksycznej odpowiedzi po ich implantacji do organizmu. Duże nadzieje wiąże się z syntetycznymi polimerami z grupy poliestrów alifatycznych i poliwęglanów. Polimery glikolidu, ɛ-kaprolaktonu, L-laktydu oraz węglanu trimetylenu są powszechnie badane pod kątem ich wykorzystania do konstrukcji rusztowań dla komórek.

Homeostaza tkanki chrzęstnej jest zależna od odpowiedzi komórek tej tkanki na auto- oraz parakrynne czynniki anaboliczne i kataboliczne produkowane zarówno przez chondrocyty, jak i inne komórki organizmu. Zaburzenie równowagi pomiędzy procesami anabolicznymi i katabolicznymi prowadzi do powstawania zmian patologicznych związanych między innymi z modyfikacją właściwości substancji podstawowej chrząstki, jej składu chemicznego i struktury, czego konsekwencją są zmiany degeneracyjne [3]. Istotną rolę w metabolizmie tkanki chrzęstnej odgrywa sieć cytokin, spośród których wyróżnia się cytokiny o działaniu anabolicznym (tj. IGF-1, TGF-β, bFGF) oraz katabolicznym (np. IL-1, IL-8, TNF-α, IFN-γ) [4,5].

Do głównych cytokin prozapalnych uczestniczących w stymulacji procesów katabolicznych w chrząstce oraz jej degradacji w przebiegu różnych chorób należą IL-1a i IL-1β. Stymulują one chondrocyty do syntezy metaloproteaz oraz proteaz serynowych, jednocześnie hamując syntezę tkankowych inhibitorów metaloproteaz, czego konsekwencją jest degradacja macierzy chrzęstnej [6,7]. Cytokiny te indukują także produkcję prostaglandyn i wolnych rodników oraz powodują zahamowanie syntezy włókien kolagenowych a także proteoglikanów chrząstki [8-11]. Efekt kataboliczny na chrząstkę wywierają również IL-8 i IL-6, których synteza podlega kontroli IL-1 oraz TNF-α. Interleukina 8 jest jedna z głównych cytokin o działaniu chemotaktycznym (stad zaliczana jest również do grupy chemokin). Odpowiada ona za całokształt procesu transmigracji leukocytów z krwi do tkanek. Pobudza migrację neutrofilów przez śródbłonek oraz wzmaga ich adhezję do białek macierzy pozakomórkowej. Ponadto aktywuje w neutrofilach procesy degranulacji i wybuchu tlenowego. Indukuje również proces angiogenezy. Ze względu na właściwości chemotaktyczne, stymulujace proliferację oraz aktywujące komórki układu immunologicznego, IL-8 jest jednym z kluczowych mediatorów stanów zapalnych. Prowadzi do nagromadzenia komórek zapalnych w chrząstce, a w konsekwencji produkcji przez te komórki enzymów ja rozkładających takich jak elastaza, kolagenaza czy żelatynaza [12]. IL-6 jest cytokiną o wielokierunkowym oddziaływaniu i uważana jest za jeden z ważniejszych czynników regulujących mechanizmy obronne. Pełni ważną rolę w reakcjach zapalnych oraz procesie krwiotworzenia. Wpływ tej cytokiny na tkankę łączną jest złożony. Uczestniczy w aktywacji procesów zapalnych oraz stymuluje sekrecję metaloproteaz, przez co wpływa na degradację chrząstki. Często jest przedstawiana jako kofaktor katabolicznych efektów IL-1β w chrząstce [8].

Introduction

Cartilage characterizes low potential for regeneration and capability to proper reconstruction. This property is a major factor, which limits the treatment of cartilage lesions. Nowadays, methods of healing of cartilage injuries are unsatisfactory. Tissue engineering is very promising in cartilage treatment and it aims at enabling to restore the structure and function of the damaged tissue [1]. Development of tissue engineering and modern therapies of cartilage cure is dependent on studies of new biocompatible, bioresorborable materials used as cells' carriers. According to Lloyd et al [2], implanted biomaterial should not induce inflammatory reactions and cause a toxic effect in the organism. Synthetic polymers like aliphatic polyesters and polycarbonates are widely used in clinical practice as very good materials for biodegradable implants. Polymers of glycolide, *ɛ*-caprolactone, L-lactide and trimethylene carbonate are commonly tested for use in the construction of scaffolds for cells.

Homeostasis of cartilage is dependent on the response of chondrocytes to para- and autocrine, catabolic and anabolic factors which are produced by both chondrocytes and other types of cells in the organism. Imbalance between anabolic and catabolic processes results in the formation of pathological changes connected with, inter alia, modification of ground substance properties, its chemical composition and structure which results in degenerative changes [3]. An important role in cartilage metabolism is contributed by a network of cytokines, that can be classified into two categories: anabolic cytokines (IGF-1, TGF- β , bFGF) and catabolic cytokines (IL-1, IL-8, TNF- α , IFN- γ) [4,5].

Interleukin 1 (IL-1) plays the main role in the patophysiology of cartilage damage. IL-1 α and IL-1 β are classified as major proinflammatory cytokines involved in the stimulation of catabolic effect in cartilage and its degradation in the course of various diseases. They stimulate chondrocytes to produce several matrix-degrading proteases including matrix metalloproteinases and serine proteases. Simultaneously, they inhibit the synthesis of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases which results in degradation of cartilage matrix [6,7]. These cytokines also augment the production of prostaglandins and free radicals and inhibit the synthesis of collagen and cartilage proteoglycans [8-11]. IL-1 and TNF- α induce cartilage cells to produce other catabolic mediators, such as interleukin 8 (IL-8) and interleukin 6 (IL-6). IL-8 is a chemokine, one of the main chemotactic cytokines. It is responsible for the whole process of transmigration of leukocytes from blood to tissues. This cytokine plays an essential role in the recruitment and activation of neutrophils. It stimulates the migration of neutrophils through endothelium and increases their adhesion to extracellular matrix proteins. This chemokine also induces neutrophil degranulation and respiratory burst. IL-8 exerts a potent angiogenic impact on endothelial cells. Due to the chemotactic properties, stimulating proliferation and activating immune cells, IL-8 is one of the key mediators of inflammation. It causes accumulation of inflammatory cells in the cartilage and, consequently, production by these cells enzymes, such as elastase, collagenase and gelatinase which decompose cartilage [12]. Interleukin 6 is a multifunctional cytokine that is one of the most important factors regulating immune response and inflammation. IL-6 plays an important role in hematopoesis. The impact of this cytokine on the connective tissue is complex. IL-6 participates in the activation of inflammatory response and enhances the secretion of matrix metalloproteinases, which affect the degradation of cartilage. IL-6 is commonly presented as a cofactor of the catabolic effects of IL-1ß in the cartilage [8].

Hamuje również wytwarzanie przez chondrocyty agrekanu i kolagenu typu II [13,14]. Jednak rola tej cytokiny w regulacji funkcji chondrocytów jest niejednoznaczna, gdyż może ona wywierać na chrząstkę również efekt protekcyjny, między innymi poprzez stymulację wytwarzania białek będących inhibitorami mediatorów odczynu zapalnego takich jak tkankowe inhibitory metaloproteaz (TIMP) [15]. Doniesienia wskazujące na zahamowanie proliferacji chondrocytów w obecności IL-6 przemawiają jednak za jej niekorzystnym wpływem na chrząstkę [14].

Niekorzystną rolę omówionych cytokin w przebiegu chorób zapalnych tkanki chrzęstnej potwierdzają liczne wyniki prac eksperymentalnych i klinicznych. Zwiększoną ekspresję IL-1, IL-6 i IL-8 stwierdzono w chrząstce osób cierpiących na zwyrodnieniowe choroby stawów [16]. Również w płynie stawowym i maziówce stawowej chorych na reumatoidalne zapalenie stawów stwierdza się zwiększone stężenia IL-6, IL-1β i IL-8 [17, 18]. Udowodniono także, że stężenia IL-6 w surowicy i płynie stawowym korelują z klinicznymi objawami stanu zapalnego (gorączką i niedokrwistością), wskaźnikami klinicznymi takimi jak sztywność poranna czy liczba zajętych stawów, a także parametrami laboratoryjnymi (wartością OB, stężeniem CRP) [19].

Biomateriały, wszczepione do organizmu żywego, powinny przejąć określone funkcje organizmu wykazując jak największą biokompatybilność. Idealny biomateriał nie powinien wywierać negatywnego wpływu na układ immunologiczny, a zaburzenie jego homeostazy powinno być jak najmniejsze. Jednak biomateriały, wszczepione do organizmu, podlegają podstawowym prawom patofizjologii ciała obcego, w efekcie czego mogą wywoływać reakcje zapalne o zróżnicowanym nasileniu [20]. Odpowiedź na biomateriał może się charakteryzować reakcją zapalną z udziałem mediatorów zapalenia z grupy cytokin, spośród których ważną funkcję pełnią cytokiny prozapalne, a w szczególności IL-1, IL-6 i IL-8 [21].

Przeprowadzone badania in vitro obejmowały ocenę sekrecji prozapalnych cytokin (IL-1α, IL-1β, IL-6 i IL-8) przez ludzkie chondrocyty hodowane na powierzchni biodegradowalnych podłoży polimerowych. Polimery analizowane w pracy zawierały różne kombinacje jednostek komonomerycznych (glikolidylowe, kaproilowe, laktydylowe, węglanowe) oraz różniły się udziałem procentowym tych jednostek w łańcuchach kopolimerowych. Materiały te zostały zsyntetyzowane przy użyciu nietoksycznego inicjatora polimeryzacji - acetyloacetonianu cyrkonu. Poliestry alifatyczne są grupą biomateriałów znajdującą coraz więcej zastosowań medycznych. Związki te degradują na drodze hydrolizy, a powstające produkty są nietoksyczne i łatwo ulegają eliminacji z ustroju [22]. Tradycyjne metody syntezy biodegradowalnych polimerów wykorzystuja jako inicjator polimeryzacji toksyczne związki cyny. Niestety nie można całkowicie wyeliminować tych związków z otrzymanego polimeru, czego konsekwencją jest ich stopniowe uwalnianie w organizmie. Bezpieczną alternatywą jest synteza polimerów przy użyciu bardziej biozgodnych inicjatorów tego procesu, do których należy acetyloacetonian cyrkonu.

Materiały i metody

Kopolimery wykorzystane w badaniach (TABELA 1) zsyntezowano w oparciu o procedury opisane we wcześniejszych publikacjach [23]. Kopolimeryzację prowadzono z wykorzystaniem jako inicjatora acetyloacetonianu cyrkonu (Zr(Acac)₄). Eksperymenty przeprowadzono na ośmiu materiałach polimerowych: 1) poli(ϵ -kaprolaktono-ko-glikolid) 92:8 (PCLGA 92:8); 2) poli(L-laktydo-ko-glikolid) 85:15 (PLAGA 85:15); 3) poli(L-laktydo-ko- ϵ -kaprolakton) 75:25 (PLACL 75:25); 4) poli(L-laktydo-ko-węglan trimetylenu) 70:30 (PLATMC 70:30; 5) poli(L-laktydo-ko-węglan trimetylenu) It was also demonstrated to down-regulate aggrecan and type II collagen synthesis by chondrocytes [13,14]. However, this cytokine may also have protective effects in the cartilage. Some works have reported that IL-6 induced the expression of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP) [15]. However, reports indicating inhibition of chondrocytes proliferation in the presence of IL-6 signify its adverse impact on the cartilage [14].

Numerous results of the experimental and clinical studies confirm the negative role of these cytokines in causing cartilage inflammatory diseases. Increased expression of IL-1, IL-6 and IL-8 was found in the cartilage of patients suffering from degenerative joint disease [16]. Elevated levels of these cytokines were found in the synovial fluid and articular synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis [17,18]. It has been proven that elevated levels of IL-6 in serum and synovial fluid correlate with clinical signs of inflammation (fever, anemia), clinical symptoms including morning stiffness, number of inflamed joints, as well as increased laboratory parameters: level of C reactive protein (CRP) and a raised erythrocyte sedimentation rate (ESR) [19].

Biomaterials after implantation into the organism should take over certain body functions showing the highest biocompatibility. The perfect biomaterial should not adversely affect the immune system and minimize the disturbance of homeostasis. However, biomaterials, implanted into the body, are subjected to basic roules of the pathophysiology of foreign body, so they may cause inflammatory reactions of various severity [20]. Biological responses to implanted materials may be characterized by an inflammatory reaction. Implanted biomaterial may alter the secretion of protein inflammatory mediators such as IL-1, IL-6 and IL-8 [21].

The aim of the present study was to examine the secretion of proinflammatory cytokines (IL-1a, IL-1b, IL-6 and IL-8) by human chondrocytes cultured on the biodegradable polymeric materials. Polymers analyzed in this work are characterized by various structure of comonomer units or different comonomer units molar ratio. All of the copolymers were synthesized with the use of nontoxic zirconium acetylacetonate as an initiator of polymerization reaction. Biodegradable synthetic aliphatic polyesters seem very promising in medical applications. These polymers degrade in the body by hydrolysis, and their degradation products are non-toxic and may be metabolized or easily eliminated from the body [22]. Traditional methods of the synthesis of biodegradable polymers employ highly toxic tin compounds as the initiators of polymerization. Complete elimination of these compounds from the polymers is practically impossible which results in their slow penetration into the organism. Safe alternative is the synthesis of polymers using more biocompatible initiators of this process, which include zirconium acetylacetonate.

Materials and methods

All of the copolymers (TABLE 1) were synthesized on the basis of copolymerization procedures described previously [23]. Copolymeryzations were conducted with zirconium acetyloacetonate ($Zr(Acac)_4$) as initiator. Eight biodegradable polymers have been selected to our study: 1) poly(ε -caprolactone-co-glycolide) 92:8 (PCLGA 92:8); 2) poly(L-lactide-co-glycolide) 85:15 (PLAGA85:15); 3) poly(Llactide-co- ε -caprolactone) 75:25 (PLACL 75:25); 4) poly(Llactide-co-trimethylene carbonate) 70:30 (PLATMC 70:30); 5) poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) 30:70 (PLATMC 30:70); 6) poly(glycolide-co-trimethylene carbonate) 30:70 (PGATMC 30:70); 7) poly(L-lactide-co- ε -caprolactone-coglycolide) 66:24:10 (P(LA-CL-GA) 66:24:10); 8) poly(Llactide-co-trimethylene carbonate) 50:50 (PLATMC 50:50).

30:70 (PLATMC 30:70); 6) poli(glikolido-ko-węglan trimetylenu) 30:70 (PGATMC 30:70); 7) poli(L-laktydo-ko-εkaprolaktono-ko-glikolid) 66:24:10 (P(LA-CL-GA) 66:24:10); 8) poli(L-laktydo-ko-węglan trimetylenu) 50:50 (PLATMC 50:50). Podłoża polimerowe, na których prowadzono hodowlę chondrocytów scharakteryzowano na podstawie liczbowo średniej masy molowej (Mn), dyspersji (l_n), temperatury zeszklenia (T_a) oraz parametrów opisujących mikrostrukturę łańcuchów tj. średnia długość jednostek laktydylowych, glikolidowych, kaproilowych i węglanowych (odpowiednio – I_{LL} , I_{GG} , I_{Cap} , I_{T}), współczynnik bezładności (R) oraz współczynnik transestryfikacji drugiego stopnia (TII). Wartości analizowanych parametrów dla poszczególnych materiałów polimerowych przedstawiono w TABELI 1. Kopolimery rozpuszczano w 1,1,1,3,3,3-Heksafluoro-2propanolu (1,1,1,3,3,3-HFIP; Fluka) i wprowadzano do studzienek mikropłytek do hodowli komórkowych. Mikropłytki suszono na powietrzu, a następnie w próżni, w celu całkowitego usuniecia rozpuszczalnika. Opłaszczone płytki wyjaławiano promieniowaniem y (25 kGy).

Materiał do badań stanowiły chondrocyty izolowane z chrzęstnych fragmentów przegrody nosowej 33-letniej pacjentki wg uprzednio opisanej metody [24]. Komórki wykorzystywane jako inokulum hodowano w pożywce MEM zawierającej 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS), penicyline (100 U/ml), streptomycyne (100 µg/ml), suplement "MEM-Non Essential Amino Acids" (1x) i bufor Hepes (10 mM). Hodowlę prowadzono w polistyrenowych naczyniach z filtrem bakteriologicznym (Nunc Easy Flasks) w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂ o wilgotności 95%. W celu zbadania sekrecji prozapalnych cytokin IL-1α, IL-1β, IL-6 i IL-8, przez chondrocyty rosnące na powierzchni badanych materiałów, do studzienek mikropłytki opłaszczonych polimerami wprowadzono 5x103 komórek w 200 µl pożywki. Komórki te hodowano przez 3 kolejne doby. Następnie wymieniono medium i kontynuowano hodowlę przez 24 godziny. Równolegle prowadzono eksperyment, w którym komórki rosnące na powierzchni polimerów inkubowano w obecności IL-1ß o stężeniu 1 ng/ml. Po zakończeniu hodowli zebrano pożywkę w celu oznaczenia w niej poziomu cytokin. Pomiary stężenia IL-1α i IL-1β wykonano metodą ELISA korzystając z zestawu odczynników firmy BioLegend. Stężenia IL-6 i IL-8 oznaczono wykorzystując testy ELISA MAX[™] (Biolegend). Oceny liczby komórek, zakotwiczonych na powierzchni mikropłytek, dokonano przy użyciu testu "CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit" (Molecular Probes).

TABELA 1. Charakterystyka badanych kopolimerów. TABLE 1. Characterization of the studied copolymers. The characterization of copolymers was conducted on the basis of number-average molecular mass (Mn), dispersity (I_p), glass transition temperature (T_g) and parameters that describe the polymer microstructure, i.e. the average length of the lactidyl, glycolidyl, caproyl, carbonate blocks (respectively – I_{LL} , I_{GG} , I_{Cap} , I_{T}), randomization ratio (R) and transesterification ratio (T_{II}) (TABLE 1). The copolymers were dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (1,1,1,3,3,3-HFIP; Fluka). Solutions of the studied polymers were used as the polymeric films coating 96-well cell culture plates. The plates were dried under the air atmosphere and then in the vacuum for complete solvent evaporation. Coated microplates were sterilized with exposure to γ -irradiation (25 kGy).

Chondrocytes were isolated from the cartilage fragments of the nasal septum of thirty three years old women as described previously [24]. Cells were cultured in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C in polystyrene flasks with bacteriological filter (Nunc Easy Flasks). The cells were grown in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), MEM-Non Essential Amino Acids (1x) and 10 mM Hepes buffer. The cells were seeded into 96-well plates coated with the studied copolymers at an initial density 5x103 cells/well in 200 µl medium. After 72 h, the medium was aspirated and the cells were exposed to the freshly prepared medium for 24 hours. Then, the culture medium was collected for IL-1a, IL-1β, IL-6 and IL-8 assay. The effect of the polymers on proinflammatory cytokines secretion was determined in both unstimulated and stimulated with interleukin-1ß (1 ng/ml) cells. Cytokines level was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. The amount of IL-1 α and IL-1 β secreted into the culture supernatant was determined using BioLegend's reagents according to the Sandwich ELISA Protocol. IL-8 and IL-6 concentration in supernatants was measured by commercially available ELISA MAX[™] kits (Biolegend) according to the vendor's protocol. Cells number in cultures growing on the studied biopolymers and in control cultures was determined using the "CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit" (Molecular Probes).

No	Type of polymer	Mn [kDa]	l _p	Τ _g	The average length of the blocks	R	Τ _{II}
1	poly(ε-caprolactone-co-glycolide) 92:8	40	2.0	-46	$I_{\rm GG} = 1.1$ $I_{\rm Cap} = 4.94$	1.1	1.15
2	poly(L-lactide-co-glycolide) 85:15	63	2.1	33	$I_{\rm LL} = 9.24$ $I_{\rm GG} = 1.63$	0.41	0.2
3	poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) 75:25	60.3	2.1	35	I _{LL} =5.13 I _{Cap} =1.71	0.68	-
4	poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) 70:30	36	2.0	42	$l_{\rm T} = 2.44$ $l_{\rm LL} = 6.28$	0.5	2.78
5	poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) 30:70	17.5	2.0	8	<i>I</i> _T = 4.11 <i>I</i> _{LL} = 1.52	0.57	0.63
6	poly(glycolide-co-trimethylene carbonate) 30:70	6.0	1.5	no data	$I_{\rm GG} = 2.9$ $I_{\rm T} = 7.64$	0.3	-
7	poly(L-lactide-co-ε-caprolactone-co-glycolide) 66:24:10	50	1.9	29	$I_{LL} = 5.25$ $I_{GG} = 0.94$ $I_{Cap} = 5.9$	-	-
8	poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) 50:50	26.7	2.0	23	I _{LL} = 1.51 I _T = 2.05	0.82	22.6

17

BIOMATERIALS

18

Wcześniejsze badania wykazały, że polimery glikolidu, ε-kaprolaktonu, L-laktydu oraz węglanu trimetylenu syntezowane przy pomocy nietoksycznego inicjatora polimeryzacji - acetyloacetonianu cyrkonu charakteryzują się, z punktu widzenia inżynierii tkankowej, odpowiednimi właściwościami mechanicznymi oraz szybkością degradacji [25,26]. Przeprowadzone badania dowiodły, że na powierzchni tych kopolimerów możliwy jest wzrost licznych rodzajów komórek, w tym również chondrocytów, przy czym nie obserwowano cytotoksycznego działania tych podłoży na komórki [27,28].

W ramach niniejszej pracy dokonano oceny biozgodności wybranych biodegradowalnych materiałów w oparciu o poziom sekrecji prozapalnych cytokin przez komórki rosnące na ich powierzchni. W przeprowadzonym eksperymencie nie stwierdzono sekrecji IL-1α oraz IL-1β zarówno przez kontrolne hodowle chondrocytów, jak i przez komórki rosnące na testowanych materiałach polimerowych. Świadczy to o braku konstytutywnej sekrecji tych cytokin przez badane chondrocyty. Pozwala także na przypuszczenie, że badane materiały polimerowe nie indukują sekrecji, przez chondrocyty rosnące na ich powierzchni, badanych cytokin. Jest to istotne z uwagi na fakt, że peptydy te pełnią kluczową rolę w rozwoju stanu zapalnego oraz uczestniczą w destrukcji chrząstki. Brak konstytutywnej ekspresji IL-1a i IL-1β przez ludzkie chondrocyty wykazali Seid i wsp. [29]. Autorzy zaobserwowali jednak indukcję ekspresji analizowanych cytokin przez komórki stymulowane IL-1β. Również Aida i wsp. [9] nie stwierdzili ekspresji IL-1ß przez izolowane ludzkie chondrocyty, obserwowali natomiast istotny wzrost badanej cytokiny w odpowiedzi na stymulację komórek IL-1β. Badania prowadzone przy użyciu mikromacierzy białkowych nie wykazały obecności IL-1 w medium chondrocytów stymulowanych IL-1 lub TNF [30], autorzy uważają jednak, że jedną z możliwych przyczyn braku obecności tej cytokiny w medium hodowlanym może być jej szybka degradacja w obecności metaloproteaz oraz zrzucanie receptorów wiążących IL-1 z powierzchni komórek i ich działaniem jako receptory wyłapujące [31].

Oznaczenia stężenia IL-6 w hodowlach chondrocytów wykazały, że komórki te wydzielają konstytutywnie IL-6 na poziomie wynoszącym średnio 38 ± 13 pg/1000 komórek. Aktywacja chondrocytów przez wprowadzenie do pożywki IL-1ß prowadziła do istotnego wzrostu sekrecji tej cytokiny (2556 ± 275 pg/1000 komórek). Profil uwalniania IL-6 przez chondrocyty rosnące na powierzchni analizowanych biomateriałów przedstawiono na RYS. 1A. Stwierdzono, że najwyższą sekrecją analizowanej interleukiny charakteryzowały się chondrocyty rosnące na powierzchni kopolimeru PGATMC 30:70, a obserwowany wzrost względem komórek kontrolnych był istotny statystycznie (RYS. 1A). Natomiast nie stwierdzono znamiennych statystycznie, w odniesieniu do kontroli, zmian poziomu wydzielania IL-6 w przypadku chondrocytów rosnących na pozostałych podłożach polimerowych. W warunkach oddziaływania na komórki IL-1β obserwowano wzrost uwalniania IL-6, zarówno w hodowlach kontrolnych jak i rosnących na powierzchni badanych materiałów. Profil sekrecji IL-6 przez stymulowane IL-1ß chondrocyty rosnace na powierzchni analizowanych polimerów przedstawiono na RYS. 1B. Istotny wzrost wydzielania badanej cytokiny obserwowano w przypadku komórek hodowanych na podłożach P(LA-CL-GA) 66:24:10 oraz PGATMC 30:70. Najwyższe stężenie IL-6 stwierdzono w medium hodowlanym komórek rosnących na powierzchni terpolimeru P(LA-CL-GA) 66:24:10.

Results and Discussion

It has previously been shown, that polymers of glycolide, ε -caprolactone, L-lactide and trimethylene carbonate synthesized with the use of a novel method employing non-toxic zirconium acetylacetonate as initiator of polymerization displayed suitable mechanical properties and degradation rate [25, 26]. The *in vitro* studies have shown that it is possible to grow different cell types, including chondrocytes on the studied polymeric films. These copolymers do not induce cytotoxic effects on cells growing on their surface [27,28].

In the present experiment we have studied biocompatibility of the selected biodegradable polymers based on the level of proinflammatory cytokines released by cells growing on their surface. Our study did not show secretion of IL-1 α and IL-1 β , neither by the control cultures of chondrocytes nor by cells growing on the tested polymeric films. This indicates that chondrocytes are not able to constitutively secrete these proinflammatory cytokines. This also suggests that the tested polymeric materials do not induce secretion of the tested cytokines by chondrocytes growing on their surface, which is important due to the fact that these peptides play a key role in inflammation and are involved in the destruction of cartilage. Also Seid et al. [29] did not observe constitutive secretion of IL-1a and IL-1B by human chondrocytes. However, these authors observed significantly enhanced production of these cytokines upon activation of cells with IL-1β. Aida et al. [9] found no secretion of IL-1β by isolated human chondrocytes too, but the cells responded with significant increase of this cytokine secretion to stimulation with IL-1β. Research carried out with the use of protein microarrays did not reveal the presence of IL-1 in the medium of chondrocytes cultures stimulated with IL-1 or TNF [30]. However, the authors consider that the absence of these cytokines in the culture medium could be explained by their rapid degradation by metalloproteinases or by shedding IL-1 and TNF receptors from the cell surface to function as soluble receptors that capture their respective cytokines [31].

Chondrocytes released constitutively IL-6 at a mean amount of 38 ± 13 pg/1000 cells. Secretion of IL-6 by these cells was up-regulated in response to IL-1ß stimulation (2556 ± 275 pg/1000 cells). Profile of IL-6 release by chondrocytes growing on the analyzed polymer films is shown in FIG. 1A. As shown in FIG. 1A, the highest concentrations of the analyzed interleukin were observed in chondrocytes growing on the surface of copolymer PGAT-MC 30:70, and the observed increase in IL-6 secretion was statistically significant. In contrast, there was no statistically significant difference (in relation to the control) in the secretion of IL-6 by cells cultured on the other polymeric films. We have also studied the effect of IL-1 β on chondrocytes growing on the surface of the tested biomaterials in respect to IL-6 production. The experimental data presented in FIG. 1B indicate that IL-6 secretion was increased by IL-1ß in both, control cultures and cells growing on the surface of the biomaterials. The statistically significant increase in IL-6 secretion was observed in cells cultured on P(LA-CL-GA) 66:24:10 and PGATMC 30:70. The highest concentration of IL-6 was found in the medium derived from cells cultured on terpolymer P(LA-CL-GA) 66:24:10. Among the tested biomaterials statistically significant elevation of IL-6 release by both chondrocytes unstimulated and stimulated with IL-1ß was observed only in cultures growing on one polymeric material: PGATMC 30:70.



RYS. 1. Sekrecja IL-6 przez chondrocyty rosnące na powierzchni materiałów polimerowych wyrażona w pg przypadających na 1000 komórek przez komórki niestymulowane (A) oraz rosnące w obecności IL-1β (B). Średnia ± SD, *P<0,05; (C. kontrola; 1. PCLGA 92:8; 2. PLAGA 85:15; 3. PLACL 75:25; 4. PLATMC 70:30; 5. PLATMC 30:70; 6. PGATMC 30:70; 7. P(LA-CL-GA) 66:24:10; 8 PLATMC 50:50).

FIG. 1. Effect of various polymer films on IL-6 secretion (pg/1000 cells) by chondrocytes unstimulated with IL-1 β (A) and stimulated with IL-1 β (B). Mean ± SD, *P<0.05; (C. control; 1. PCLGA 92:8; 2. PLAGA 85:15; 3. PLACL 75:25; 4. PLATMC 70:30; 5. PLATMC 30:70; 6. PGATMC 30:70; 7. P(LA-CL-GA) 66:24:10; 8. PLATMC 50:50).



RYS. 2. Sekrecja IL-8 przez chondrocyty rosnące na powierzchni materiałów polimerowych wyrażona w pg przypadających na 1000 komórek przez komórki niestymulowane (A) oraz rosnące w obecności IL-1β (B). Średnia ± SD, *P<0,05; (C. kontrola; 1. PCLGA 92:8; 2. PLAGA 85:15; 3. PLACL 75:25; 4. PLATMC 70:30; 5. PLATMC 30:70; 6. PGATMC 30:70; 7. P(LA-CL-GA) 66:24:10; 8. PLATMC 50:50).

FIG. 2. Effect of various polymer films on IL-8 secretion (pg/1000 cells) by chondrocytes unstimulated with IL-1 β (A) and stimulated with IL-1 β (B). Mean ± SD, *P<0.05; (C. control; 1. PCLGA 92:8; 2. PLAGA 85:15; 3. PLACL 75:25; 4. PLATMC 70:30; 5. PLATMC 30:70; 6. PGATMC 30:70; 7. P(LA-CL-GA) 66:24:10; 8. PLATMC 50:50).

Spośród badanych polimerów istotny statystycznie wzrost sekrecji IL-6 (względem kontroli) zarówno przez chondrocyty niestymulowane jak i aktywowane IL-1ß obserwowano w przypadku polimeru o składzie PGATMC 30:70. Zdolność do ekspresji i sekrecji IL-6 przez chondrocyty została potwierdzona w badaniach eksperymentalnych. Konstytutywną produkcję tej interleukiny udowodnił w swoich doświadczeniach Bender i wsp. [32], wskazał on również na IL-1ß jako czynnik stymulujący wytwarzanie IL-6 (zarówno na poziomie syntezy mRNA jak i sekrecji) przez chondrocyty rosnące w postaci monowarstwy, a także w hodowli tkankowej oraz agarozowej. Pojawiają się także publikacje wskazujące na brak ekspresji IL-6 przez ludzkie chondrocyty nie poddane działaniu czynników stymulujących takich jak IL-1β. Jednocześnie wykazano znaczący wzrost ekspresji interleukiny 6 oraz jej receptorów indukowany obecnością IL-1β, co wskazuje na jej rolę promującą działanie IL-6 [9].

Chondrocyty wykazywały zdolność do konstytutywnej sekrecji IL-8 (RYS. 2A). Ich aktywacja poprzez wprowadzenie do medium IL-1 β spowodowała ponad 400-krotny wzrost uwalniania badanej cytokiny (874 ± 554 pg/1000 komórek) (p<0,01). Obecność IL-8 stwierdzono również w medium hodowlanym chondrocytów rosnących na powierzchni badanych materiałów polimerowych, a stężenie tej cytokiny było zależne od rodzaju polimeru.

The ability of chondrocytes to express and secrete IL-6 was confirmed in other experimental studies. Bender et al. [32] reported that chondrocytes secreted constitutively IL-6 and that stimulation with IL-1 β enhanced production of IL-6 (both at the level of mRNA synthesis and secretion) by chondrocytes growing in monolayer cultures, as well as in organ and agarose cultures. Some publications indicate that chondrocytes failed to produce IL-6 in the absence of stimulating agents such as IL-1 β . Aida et al. [9] reported significant increase of expression of interleukin-6 and its receptors induced by IL-1 β , which indicates its role in promoting the action of IL-6 [9].

Chondrocytes secreted constitutively IL-8 (FIG. 2A). As shown in FIG. 2, IL-1 β by itself enhanced IL-8 production by 400-fold to 874 ± 554 pg/1000 cells compared to the basal secretion (p<0.01). Chondrocytes growing on the surface of the tested polymeric films also secreted IL-8, and the concentration of this cytokine was dependent on the type of biomaterial. In the absence of stimulation by IL-1 β , the greatest increase of IL-8 concentration was observed in cultures growing on PGATMC 30:70, the observed effect was statistically significant. PLACL 75:25 have also promoted the significant increases in the secretion of IL-8.

W warunkach braku stymulacji IL-1β najintensywniejszą sekrecję obserwowano przez chondrocyty zakotwiczone na podłożu polimerowym o składzie PGATMC 30:70, a obserwowany efekt był istotny statystycznie. Znaczący wzrost wydzielania IL-8 obserwowano również w przypadku komórek rosnących na polimerze o składzie PLACL 75:25. Stężenia IL-8 oznaczone w medium znad hodowli chondrocytów rosnących na pozostałych podłożach polimerowych nie różniły się istotnie od wartości w kontroli. Aktywacja hodowli IL-1β prowadziła do wzrostu sekrecji IL-8. W warunkach oddziaływania na komórki IL-1β największe uwalnianie chemokiny obserwowano w przypadku chondrocytów rosnących na powierzchni P(LA-CL-GA) 66:24:10 (wzrost 3-krotny, istotny w odniesieniu do kontroli). Znamienny statystycznie wzrost sekrecji IL-8 w odniesieniu do kontroli stwierdzono także w przypadku komórek rosnących na podłożu PGATMC 30:70. W przeprowadzonym doświadczeniu nie wykazano istotnych względem kontroli zmian sekrecji IL-8 przez stymulowane IL-1ß chondrocyty rosnące na powierzchni pozostałych analizowanych polimerów. Doniesienia literaturowe dotyczące konstytutywnej ekspresji IL-8 przez ludzkie chondrocyty nie pozwalają na wysunięcie jednoznacznych wniosków. Badania Aidy i wsp. [9] wykazały ekspresję tej chemokiny przez chondrocyty zaktywowane IL-1β, nie stwierdzono jednak ekspresji IL-8 w komórkach nie poddanych działaniu IL-1β. Inne doniesienia wskazują na konstytutywną oraz stymulowaną w obecności IL-1β ekspresję IL-8 przez ludzkie chondrocyty [29]. Również badania prowadzone na modelu końskich chondrocytów wykazały zdolność tych komórek do ekspresji nie tylko IL-8 ale również innych cytokin w tym również IL-6 [33]. W ostatniej z przytoczonych publikacji udowodniono także, że stymulacja komórek IL-1β prowadziła do znaczącego wzrostu ekspresji tych cytokin.

Analizowane podłoża są badane w związku z ich potencjalnym wykorzystaniem w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej u ludzi. Ważne są jednak szczegółowe badania biozgodności analizowanych polimerów a także produktów ich degradacji. Istotnym elementem jest również odpowiedź organizmu na implant. Wszczepienie implantu nie powinno powodować ostrej lub przewlekłej odpowiedzi zapalnej gospodarza. Silna i długotrwała reakcja zapalna może prowadzić do "obluzowania" implantu oraz utrudniać proces regeneracji tkanki. Jednym z parametrów pozwalających na określenie rozwoju reakcji zapalnej jest sekrecja mediatorów tego procesu, do których zaliczamy analizowane w prezentowanej pracy cytokiny. Spośród badanych polimerów biodegradowalnych, podłoża otrzymane z PGATMC 30:70, P(LA-CL-GA) 66:24:10, a także PLACL 75:25 powodowały pewne niepożadane reakcje komórek, ponieważ prowadziły do istotnego wzrostu sekrecji cytokin prozapalnych (IL-6 oraz IL-8) przez chondrocyty rosnące na ich powierzchni. Pozostałe badane materiały polimerowe nie indukowały uwalniania cytokin przez chondrocyty.

Analizowane podłoża są uważane za dobry materiał do zastosowania w inżynierii tkankowej, co jest związane z ich biodegradacją oraz nietoksycznością produktów powstających w efekcie ich degradacji. Nie jest jednak dostatecznie poznany wpływ tego rodzaju materiałów na przebieg procesu zapalnego, będącego normalną reakcją organizmu na obecność ciała obcego. Badania kopolimeru L-laktydu i glikolidu (PLAGA 85:15) otrzymanego przy użyciu inicjatora cyrkonowego prowadzili Czajkowska i wsp. [25]. Autorzy nie stwierdzili indukcji sekrecji prozapalnych cytokin: IL-6 i TNF- α przez komórki makrofagopodobne linii U-937 rosnące na badanym kopolimerze. Jednocześnie wykazano wysoką żywotność fibroblastów, osteoblastów i monocytów na badanym podłożu.

The other polymeric materials did not cause statistically significant induction of IL-8 release compared to control cells. In the presence of IL-1β, IL-8 secretion was markedly increased compared to that of the control (p<0.01) and the highest amount of IL-8 was determined in cultures growing on P(LA-CL-GA) 66:24:10 (threefold increase, p<0.01). Significant stimulation of IL-8 release was also observed in cells cultured on PGATMC 30:70. As observed in this experiment, the remaining analyzed biopolymers did not cause statistically significant differences versus control in the IL-8 release stimulated with IL-1β. In the light of recent literature data the ability of human chondrocytes to constitutively express and secrete IL-8 has not clearly been confirmed. Aida et al. [9] reported the expression and secretion of IL-8 by IL-1ß stimulated cells, however, they did not detect expression of the IL-8 by chondrocytes in the absence of IL-1B. A number of studies have shown constitutive and IL-1β-stimulated IL-8 expression by human chondrocytes [29]. David et al. [33] demonstrated that equine chondrocytes expressed mRNA for IL-8 and several other proinflammatory cytokines. They also showed that IL-1β modulated the expression of studied cytokines.

The analyzed materials were examined in relation to their potential use in the treatment of cartilage lesion in humans. However, this requires a detailed study of biocompatibility of the analyzed polymers and their degradation products. Implantation should not cause acute or chronic inflammatory response of the host. The strong and prolonged inflammatory response may lead to an implant "loosening" and impede the process of tissue regeneration. One of the parameters allowing detection of inflammatory process is the secretion of inflammatory mediators such as cytokines analyzed in this study. Among the studied biodegradable polymers, PGATMC 30:70, P(LA-CL-GA) 66:24:10, and PLACL 75:25 caused some adverse reactions in cells, because they led to significant increases in secretion of inflammatory cytokines - IL-6 and IL-8 by chondrocytes growing on their surface. Other tested polymeric materials did not induce the release of cytokines by these cells.

Biopolymers analyzed in the present study are considered as suitable support for tissue engineering, which is associated with their biodegradability and formation of non-toxic degradation products. The impact of this type of material on the process of inflammation, which is a physiological response of the organism to the foreign body, is not sufficiently understood. Czajkowska et al. [25] studied a copolymer of L-lactide and glycolide PLAGA 85:15 obtained by using zirconium initiator. The authors showed that examined materials failed to induce secretion of proinflammatory IL-6 and TNF-a cytokines by human monocyte/macrophage-like cell line U-937. Moreover, the authors observed a high viability of osteoblasts, fibroblasts and monocytes cultured on the tested copolymer. Other studies also demonstrated high biocompatibility of the PLAGA 85:15. The scaffolds made of this polymer are appropriate for chondrocytes growth. Moreover, PLAGA 85:15 scaffolds promoted chondrocytes redifferentiation into mature, functional cells, as demonstrated by the expression of selected genes [27]. The presented results also show that PLAGA 85:15 is a biomaterial with a high biocompatibility which does not lead to induction of the proinflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8. Rotter et al. [34] investigated in vivo the generation of tissue-engineered cartilage using a glycolide and lactide copolymer (90:10) in the pig model. They found that the implantation of the scaffolds led to a strong expression of IL-1α in chondrocytes at the implant periphery. These results suggest that induction of inflammatory reaction against biomaterial may inhibit regeneration of cartilage tissue.

Inne badania również wskazują na dużą biozgodność polimeru o składzie PLAGA 85:15, gdyż chondrocyty zasiedlają gąbki wykonane z tego polimeru, jednocześnie różnicują się w kierunku dojrzałych, funkcjonalnych komórek na co wskazuje ekspresja wybranych genów [27]. Prezentowane badania również wskazują na kopolimer o składzie PLAGA 85:15 jako biomateriał o dużej biozgodności nie prowadzący do indukcji analizowanych cytokin prozapalnych. Z kolei Rotter i wsp. [34] badali *in vivo* na modelu świńskim kopolimer glikolidu i laktydu (90:10). Zaobserwowali oni, że wszczepienie implantu prowadziło do silnej ekspresji IL-1α w chondrocytach implantowanych na peryferiach implantu, co z kolei może hamować regenerację tkanki chrzęstnej.

Wnioski

Badanie procesów adhezji i proliferacji komórek na powierzchni badanego biomateriału nie wyczerpuje możliwości badania ich funkcji w warunkach *in vitro*. Poprawne przyleganie i namnażanie się komórek nie gwarantuje, że odbudowa uszkodzonej tkanki będzie zachodziła zgodnie z założeniami. Zaburzenia reakcji immunologicznej polegające na indukcji mediatorów zapalenia, mogą wiązać się z chroniczną, bądź relatywnie przedłużoną reakcją zapalną na biomateriał, co z kolei może w istotnym stopniu upośledzać proces odtwarzania tkanki. Aktywacja odpowiedzi zapalnej na czynnik zewnętrzny jest związana ze skoordynowaną ekspresją i sekrecją licznych mediatorów. Wydaje się, że obserwacja stymulacji mediatorów reakcji zapalnej takich jak IL-1, IL-6 i IL-8 może pomóc w ocenie biozgodności materiałów polimerowych.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że spośród badanych materiałów polimerowych pewien wzrost sekrecji analizowanych cytokin stwierdzono w hodowlach chondrocytów rosnących na podłożach polimerowych wykonanych z PGATMC 30:70, niezależnie od obecności w medium IL-1^β. Również w przypadku komórek hodowanych na powierzchni polimerów: P(LA-CL-GA) 66:24:10 oraz PLACL 75:25 obserwowano zwiększenie uwalniania cytokin, jednak efekt ten był zależny od rodzaju oznaczanej cytokiny, a także warunków hodowli (obecności IL-1β). Podłoża te wydają się być najmniej biozgodnymi spośród badanych w niniejszej pracy polimerów w aspekcie stymulacji odpowiedzi zapalnej chondrocytów, konieczne sa jednak dalsze szczegółowe badania. Spośród badanych polimerów biodegradowalnych podłoża o składzie PCLGA 92:8, PLAGA 85:15, PLATMC 70:30, PLATMC 30:70, PLATMC 50:50 wydają się charakteryzować największą biozgodnością, gdyż nie powodowały istotnego wzrostu sekrecji prozapalnych cytokin przez chondrocyty rosnące na ich powierzchni. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, iż podłoża wykonane z alifatycznych poliestrów i poliestrowęglanów zsyntezowane przy użyciu acetyloacetonianu cyrkonu zasługują na dalszą uwagę, gdyż niosą nadzieję na umożliwienie leczenia ubytków tkanki chrzęstnej.

Podziękowania

Praca była współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu RFSD 2.

Conclusions

Study of cell adhesion and proliferation on the biomaterial surface is not sufficient for complete *in vitro* analysis. Proper cells adhesion and proliferation do not guarantee that the reconstruction of the damaged tissue will occur in accordance with our expectations. The immune response involving the induction of inflammatory mediators may be associated with chronic or relatively prolonged inflammatory response to the biomaterial, which can significantly impair the recovery process of tissue. Activation of the inflammatory response to the external factor is associated with coordinated expression and secretion of numerous mediators. It appears that the estimation of induced proinflammatory mediators such as IL-1, IL-6 and IL-8 can help to evaluate the biocompatibility of polymeric materials.

Our results indicate that among the examined aliphatic polyesters and polyesterocarbonates increased proinflammatory cytokines secretion from unstimulated and stimulated with IL-1β chondrocytes cultured on PGATMC 30:70. In the present experiments we observed elevated levels of IL-6 or IL-8 cytokines in supernatants from chondrocyte cultures conducted on the polymeric films: P(LA-CL-GA) 66:24:10 and PLACL 75:25. These materials appear to be the least biocompatible among the tested copolymers in respect to stimulation of the inflammatory response in human chondrocytes. Among the studied biodegradable polymers the PCLGA 92:8, 85:15 PLAGA, PLATMC 70:30, PLATMC 30:70, 50:50 PLATMC seem to be the most biocompatible, because they do not cause a significant increase in secretion of proinflammatory cytokines by chondrocytes growing on their surface. Our results indicate, that the studied biopolymers are well-tolerated, however, they need further detailed study.

Acknowledgements

This work was supported by the European Community from the European Social Fund within the RFSD 2 project.

• • • • Piśmiennictwo

22

[1] Kaźnica A., Joachimiak R., Drewa T., Drewa G.: Zastosowanie inżynierii tkankowej w wybranych działach medycyny regeneracyjnej. Med. Biol. Sci. 21 (2007) 9-14.

[2] Lloyd A. W.: Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. Med. Device Technol. 13 (2002) 18-21.

[3] Hrycaj P., Łącki J.K.: Od zwyrodnienia do zapalenia - współczesne poglądy na patogenezę choroby zwyrodnieniowej stawów. Nowa Med. 2 (2002) 7-16.

[4] Verbruggen C.: Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. Rheumatology. 45 (2006) 129-138.

[5] Malejczyk J.: Regulacja odtwarzania i niszczenia macierzy chrząstki stawowej. Terapia 5 (1997) 46-48.

[6] Goldring M.B.: The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheum. 43 (2000) 1916-1926.

[7] Martel-Pelletier J., McCollum R., Fujimoto N., Obata K., Cloutier J.M., Pelletier J.P.: Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Lab. Invest. 70 (1994) 807-815.

[8] Sanchez C., Deberg M.A., Burton S., Devel P., Reginster J.Y., Henrotin Y.E.: Differential regulation of chondrocyte metabolism by oncostatin M and interleukin-6. Osteoarthr. Cartilage 12 (2004) 801-810.

[9] Aida Y., Maeno M., Suzuki N., Namba A., Motohashi M., Matsumoto M., Makimura M., Matsumura H.: The effect of IL-1beta on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. Life Sci. 79 (2006) 764-771

[10] Westacott C.I., Sharif M.: Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? Semin. Arthritis Rheu. 25 (1996) 254-272.

[11] Goldring M.B.: The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. Connect Tissue Res. 40 (1999) 1-11.

[12] Kraan M.C., Patel D.D., Haringman J.J., Smith M.D., Weedon H., Ahern M.J., Breedveld F.C., Tak P.P.: The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). Arthritis Res. 3 (2001) 65-71.

[13] Legendre F., Dudhia J., Pujol J.P., Bogdanowicz P.: JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. J. Biol. Chem. 278 (2003) 2903-2912.

[14] Kontny E., Maśliński W.: Interleukina 6 – znaczenie biologiczne i rola w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. Reumatologia 47 (2009) 24-33.

[15] Cronstein B.N.: Interleukin-6. A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. Bull NYU Hosp Jt Dis 65 (2007) S11-S15.

[16] Attur M.G., Dave M., Akamatsu M., Katoh M., Amin A.R.: Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. Osteoarthr. Cartilage 10 (2002) 1-4.

[17] Houssiau F.A., Devogelaer J.P., van Damme J., de Deuxchaisnes C.N., Van Snick J.: Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Arthritis Rheum. 31 (1988) 784-788.

[18] Pulsatelli L., Dolzani P., Piacentini A., Silvestri T., Ruggeri R., Gualtieri G., Meliconi R., Facchini A.: Chemokine production by human chondrocytes. J. Rheumatol. 26 (1999) 1992-2001.

[19] Madhok R., Crilly A., Watson J, Capell H.A.: Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory indices of disease activity. Ann. Rheum. Dis. 52 (1993) 232-234.

.

[20] Schutte R.J., Xie L., Klitzman B., Reichert W.M.: In vivo cytokine-associated responses to biomaterials. Biomaterials 30 (2009) 160-168.

[21] Żywicka B., Czarny A., Zaczyńska E., Karaś J.: Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-kB, indukcja cytokin prozapalnych in vitro oraz badania biozgodności ceramiki węglanowej *in vivo*. Polimery w Medycynie 36 (2006) 23-36.

[22] Nair L. S., Laurencin C. T.: Biodegradable polymers as biomaterials. Prog. Polym. Sci. 32 (2007) 762-798.

[23] Dobrzyński P., Kasperczyk J.: Synthesis of biodegradable copolymers with low-toxicity zirconium compound. IV. Copolymerization of glycolide with trimethylene carbonate and 2,2-dimethyltrimethylene carbonate : microstructure analysis of copolymer chains by high-resolution Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. J. Polym. Sci. Pol. Chem. 14 (2006) 98-114.

[24] Orchel A., Dylla A., Jelonek K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Owczarek A., Bielecki I., Dzierżewicz Z.: Growth of human chondrocytes on biodegradable synthetic polymers. Eng.Biomater.2008 58-60 (2006) 223-226.

[25] Czajkowska B, Dobrzynski P, Bero M.: Interaction of cells with L-lactide/glycolide copolymers synthesized with the use of tin or zirconium compounds. J. Biomed. Mater. Res. A. 74 (2005) 591-597

[26] Pamula E., Blazewicz M., Czajkowska B., Dobrzynski P., Bero M., Kasperczyk J.: Elaboration and Characterization of Biodegradable Scaffolds from poly (L-Lactide-co-glycolide) synthesized with Low-Toxic Zirconium Acetylacetonate. Ann. Transplant. 9 (2004) 64-67.

[27] Orchel J., Orchel A., Kasperczyk J., Pamuła E., Paduszyński P., Dobrzyński P., Pałasz A., Bielecki I., Jelonek K., Dzierżewicz Z.:Growth and differentiation of human chondrocytes on biodegradable polymeric scaffolds. Inż.Biomater. / Eng.Biomater 81-84 (2008) 8-11.

[28] Orchel A., Jelonek K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Orchel J., Dzierżewicz Z.: Biocompatibility of biodegradable synthetic polymers for human fibroblasts. Eng.Biomater. 81-84 (2008) 5-8. [29] Seid J.M., Rahman S., Graveley R., Bunning R.A., Nordmann R., Wishart W., Russell R.G.: The effect of interleukin-1 on cytokine gene expression in cultured human articular chondrocytes analyzed by messenger RNA phenotyping. Arthritis Rheum. 36 (1993) 35-43.

[30] De Ceuninck F., Dassencourt L., Anract P.: The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays. Biochem. Biophys. Res. Commun. 323 (2004) 960-969.

[31] Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Abramson S.B.: Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis Rheum. 44 (2001) 1237-1247.

[32] Bender S., Haubeck H.D., Van de Leur E., Dufhues G., Schiel X., Lauwerijns J., Greiling H., Heinrich P.C.: Interleukin-1 beta induces synthesis and secretion of interleukin-6 in human chondrocytes. FEBS Lett. 263 (1990): 321-324.

[33] David F., Farley J., Huang H., Lavoie J.P., Laverty S.: Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. Vet. Surg. 36 (2007) 221-227.
[34] Rotter N., Ung F., Roy A.K., Vacanti M., Eavey R.D., Vacanti

[34] Rotter N., Ung F., Roy A.K., Vacanti M., Eavey R.D., Vacanti C.A., Bonassar L.J.: Role for interleukin 1alpha in the inhibition of chondrogenesis in autologous implants using polyglycolic acid-polylactic acid scaffolds. Tissue Eng. 11 (2005) 192-200.

ROZWÓJ SZCZELINY BRZEŻNEJ JAKO EFEKT ZMĘCZENIA CIEPLNEGO WYPEŁNIEŃ STOMATOLOGICZNYCH

KRZYSZTOF PAŁKA^{1*}, MONIKA GRUSZECKA¹, AGATA NIEWCZAS²

 ¹ Katedra Inżynierii Materiałowej, Politechnika Lubelska, ul. Nadbystrzycka 36, 20-618 Lublin
 ² Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Karmelicka 7, 20-081 Lublin
 * E-mail: K.Palka@pollub.pl

Streszczenie

Mikroprzeciek jest główną przyczyną występowania próchnicy wtórnej w okolicy wypełnień stomatologicznych. W pracy badano wpływ cyklicznych obciążeń cieplnych na rozwój szczeliny brzeżnej dla 2 nanohybrydowych materiałów kompozytowych w wypełnieniach klasy I w ludzkich zebach trzonowych. Po każdych 2000 cykli (do 20 000) próbki były oceniane na mikroskopie stereoskopowym stosując metodę penetrantu. Pomiarów długości szczeliny brzeżnej dokonano z wykorzystaniem systemu analizy obrazu. Uzyskano wyniki pomiarów długości szczeliny brzeżnej w zależności od ilości cykli termicznych. Wzrost szczeliny brzeżnej może być opisany wielomianem 3 stopnia, a szybkość rozwoju szczeliny zależy w szczególności od rodzaju systemu wiążącego oraz od interakcji między materiałami, właściwości powierzchni tkanek oraz od wpływu warunków w jamie ustnej.

Słowa kluczowe: cykliczne obciążenia cieplne, mikroprzeciek, szczelina brzeżna, kompozyty stomatologiczne

[Inżynieria Biomateriałów, 104, (2011), 23-27]

Wprowadzenie

Materiały stosowane obecnie na wypełnienia stomatologiczne powinny wykazywać odporność na czynniki występujące w jamie ustnej, szczególnie zmiany temperatury. Opracowywanie nowych materiałów wymaga zwrócenia szczególnej uwagi na skurcz polimeryzacyjny oraz problem uzyskania podobnej rozszerzalności cieplnej do tkanek zęba. Ocena właściwości termicznych materiałów wypełnień została poszerzona o testy zmęczenia cieplnego [1]. W warunkach laboratoryjnych zęby z założonymi wypełnieniami poddawane są cyklicznym obciążeniom cieplnym, a następnie ocenia się szczelinę brzeżną i mikroprzeciek poprzez test zanurzeniowy, mikroskopią SEM, izotopami promieniotwórczymi lub nawet bakteriami czy sztucznie wywołaną próchnicą [2].

Proces polimeryzacji powoduje powstawanie skurczu kompozytów stomatologicznych, wywołując naprężenia, które przekroczyć mogą wartość wytrzymałości systemu wiążącego. Wielkość skurczu (1,3-3,22%) wywołać może naprężenia o wartości 4-7 MPa [3], które mogą prowadzić do powstawania pęknięć w szkliwie, szczególnie w warunkach interakcji z naprężeniami cieplnymi. Dodatkowo powstawanie szczeliny na granicy ząb/wypełnienie może być wywołane niedostateczną adhezją wypełnienia do tkanek zęba. Ponadto nowe szczeliny mogą powstawać podczas użytkowania wypełnienia, jako wynik naprężeń cieplnych lub mechanicznych [4].

INCREASING OF MARGINAL GAP IN THERMOCYCLED RESTORATION SYSTEM

KRZYSZTOF PAŁKA^{1*}, MONIKA GRUSZECKA¹, AGATA NIEWCZAS²

 ¹ DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING, LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
 36 NADBYSTRZYCKA ST., 20-618 LUBLIN, POLAND
 ² DEPARTMENT OF CONSERVATIVE DENTISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
 7 KARMELICKA ST., 20-081 LUBLIN, POLAND

* E-MAIL: K.PALKA@POLLUB.PL

Abstract

Microleakage is a major factor contributing to the occurrence of secondary carious lesions around restorations. This study investigated the effect of thermocycling on microleakage of 2 selected nanohybrid composite Class I restorations in human molars. After every 2000 thermocycles (till 20000 thermocycles) specimens were examined by stereomicroscopy using a dye penetration test. The marginal gap was measured using image analysis software. As a result the length of marginal gaps in dependence of number of thermocycles was presented. Increasing of marginal gap may be described by 3rd degree polynomial line and the velocity of marginal gap growth depends especially on adhesive system, and also on interactions between materials, physical properties of the tissue interface and the influence of the oral environment.

Keywords: thermocycling, microleakage, marginal gap, restorative composite

[Engineering of Biomaterials, 104, (2011), 23-27]

Introduction

Materials which are used today as restorations must resist the surrounding influences in the oral cavity, especially temperature. In developing new restorative materials, special attention is paid to reducing the setting contraction and closely adapting the thermal volume effect to that of the hard tooth structure. The examination of restorative materials for thermal characteristics has developed into a generally acknowledged test procedure under the term "thermocycling" in dental research [1]. In laboratory conditions, restored teeth are thermally cyclic stressed, and then marginal quality/leakage is evaluated by dye penetration, scanning electron microscopy, radioactive isotopes, bacteria and even artificial caries [2].

The polymerization process results in shrinkage or contraction of the composite, causing stresses that may exceed the strength of the bond with the surrounding tooth structure, with possible failure at the adhesive joint. The level of shrinkage (1.3-3.22%) could generate contractile forces of 4.0 to 7.0 MPa [3], which may lead to cracking at the enamel margins, especially when synergetic interactions with thermal stresses occur. Polymerization shrinkage leads to gap formation between the composite restoration and the walls of the cavity at the weakest bond. Marginal breakdown may result in microleakage, postoperative sensitivity, and recurrent dental caries, more intense when thermocycled.

BI MATERIALS

Zęby narażone są na zmiany temperatury podczas jedzenia, picia i oddychania. Posiłki gorące mają temperaturę do 85°C, natomiast lody do -12°C. Gale i in. dokonali przeglądu 130 artykułów z zakresu laboratoryjnych testów obciążeń cieplnych wypełnień stomatologicznych [1]. Wynika z niego, że średnia wartość najniższej temperatury wynosiła 6,6°C (zakres 0-36°C, mediana 5,0°C), natomiast średnia wartość najwyższej temperatury osiągała 55,5°C (zakres 40-100°C, mediana 55°C). Czas zanurzenia nie był często określany, jednakże w większości przypadków wynosił 53 s z medianą 30 s (zakres 4 s do 20 min) [5]. Takie zakresy zmian temperatur oraz czas ich oddziaływania może powodować zmiany w tkankach zęba spowodowane różnicami we współczynnikach rozszerzalności cieplnej szkliwa i zębiny. Zmiana temperatury zęba wywołuje naprężenia cieplne, proporcionalne do gradientu temperatury. Zmiany napreżeń powodują zmęczenie cieplne tkanek i ich uszkodzenie [6]. Wielu autorów dokonuje oceny szczeliny brzeżnej stosując system oceny punktowej [3,6,7], w innych przypadkach [8-10] są to pomiary wielkości szczeliny brzeżnej z wykorzystaniem mikroskopii optycznej lub skaningowej, jednakże bez wykazywania związku z liczbą cykli obciążeń cieplnych.

W niniejszej pracy zaprezentowano metodykę badań rozwoju szczeliny brzeżnej, powstającej w wyniku cyklicznych obciążeń cieplnych, wraz z wynikami badań wstępnych na przykładzie 2 materiałów z nanowypełniaczem.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano ludzkie zęby trzonowe, które bezpośrednio po ekstrakcji zostały oczyszczone, a następnie przechowywane w roztworze soli fizjologicznej z 3% dodatkiem podchlorynu sodu. Następnie w zębach wykonano wypełnienia klasy I (wg Blake'a) o głębokości ok. 3 mm. W wielu badaniach z zakresu oceny szczeliny brzeżnej wykonywano okrągłe wypełnienia "modelowe" [3,7], w niniejszych badaniach wykonano rzeczywiste wypełnienia, jako odwzorowanie warunków realnych. Wypełnienia zostały wykonane zgodnie z zaleceniami producentów materiałów oraz wiedzą stomatologiczną. Wykorzystano 2 materiały kompozytowe z nanowypełniaczem: Ceram X (Dentsply) oraz Filtek Supreme (3M ESPE) z ich dedykowanymi systemami wiążącymi (TABELA 1). Jako próbka kontrolna zastosowany był zab bez ingerencji stomatologicznej. Po przygotowaniu zęby były przechowywane przez 24 h w wodzie destylowanej, po czym ich powierzchnię zabezpieczono lakierem w odległości ok. 1 mm do wypełnienia. Następnie zęby zamocowano w uchwytach i zanurzono część koronową na 30 min. w 1% roztworze błękitu metylenowego (POCH S.A.). Po opłukaniu zębów pod bieżącą wodą i delikatnym osuszeniu były one oceniane pod mikroskopem stereoskopowym SMZ1500 z kamerą cyfrową (Nikon) i systemem akwizycji obrazu (NIS Elements). Po wykonaniu pomiarów "zerowych" zęby poddane zostały cyklicznym obciążeniom cieplnym na urządzeniu opisanym w pracy [11] w zakresie temperatur 5-55°C z czasem zanurzenia 30 s. Po każdych 2000 cykli (aż do 20000 cykli) zęby były oczyszczane, zanurzane w roztworze błękitu metylenowego (30 min), płukane i suszone, po czym oceniane pod mikroskopem stereoskopowym. Szczelina brzeżna mierzona była jako suma długości szczelin, przy wykorzystaniu oprogramowania ImagePro Plus (Media Cybernetics). Wykonywano po pięć pomiarów długości z dokładnością ±12 µm. Odchylenie standardowe w każdym z przypadków było mniejsze niż 0,15% w odniesieniu do wartości średniej. Wyniki przedstawiono, jako średnie procentowe odniesienie długości szczeliny brzeżnej do długości obwodu wypełnienia. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono prędkość rozwoju szczeliny brzeżnej, jako wartość pierwszej pochodnej funkcji aproksymacji (wielomian 3 stopnia) w środkowym punkcie rozważanego przedziału.

In addition to polymerization shrinkage, gap formation at the tooth/restoration interface may be caused by inadequate wetting of the tooth surface by the restorative material along the preparation walls during placement. Furthermore, new marginal gaps may develop during the service life of the restoration as a result of thermally or mechanically induced stresses [4].

Teeth are subjected to significant temperature variations during routine eating, drinking and breathing. Hot food is served up to 85°C, and ice cream as low as -12°C. Gale et al. showed review of 130 articles [1] on thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. The mean low-temperature point was 6.6°C (range 0-36°C, median 5.0°C). The mean high-temperature point was 55.5°C (range 40-100°C, median 55°C). Dwell times were sometimes not stated, but the mean stated dwell time was 53 s, the median 30 s, with a range of 4 s to 20 min [5]. These temperature and time differences may create various modifications to the tooth structure due to the different thermal expansion of enamel and dentin. Temperature changes in tooth produce thermal stress, which is proportional to the temperature gradient. With sufficient repeated high or low thermal stress, the tooth structure may be damaged [6]. Many authors evaluate the marginal gap by scoring system [3,6,7]. The others [8-10] measured the marginal gap using optical or electron microscopy, but without any dependence of number of thermocycles.

In the present study there was presented the research method of increasing of marginal gap forming in thermocycling as well as the example results obtained for two nanofilled restoration materials.

Materials and methods

Human molars were collected for this study. Immediately after extraction, the teeth were gently cleaned and stored in physiological saline and 3% sodium hypochlorite. A Class I preparation of about 3 mm depth was prepared in each tooth using a high-speed handpiece with water coolant. In many studies there were prepared modelled restorations [3,7] most often in circular shape. In present study the authors decided to prepare a "real" restoration simulating in vivo conditions. Restorations were placed according to manufacturer's instructions and dental knowledge. There were used 2 nanofilled composite materials: Ceram X (Dentsply) and Filtek Supreme (3M ESPE) (TABLE 1) with its dedicated adhesive system. As reference specimen there was used a tooth without any dental intervention. After preparation teeth were stored in distilled water for 24 h, thereafter specimens were coated with nail polish to within 1 mm of the restoration margin prior to being thermocycled. This has been shown to effectively limit microleakage to that possible at the marginal interface of the tooth and restoration. After this the teeth were mounted in specimen holders. All teeth were subjected to exposure in 1% methylene blue solution (POCH S.A.) by 30 min immersing the crown part of the tooth. Thereafter the samples were washed in tap water, gently dried by paper tissue and examined using stereomicroscope SMZ1500 (Nikon) with image acquisition system (NIS Elements). Thereafter the teeth in holders were thermocycled using the device described in [11] with temperature range from 5°C to 55°C and dwell time of 30 s. After every 2000 cycles (till 20 000 thermocycles) specimens were cleaned, immersed in methylene blue solution (30 min), rinsed, dried and examined by stereomicroscopy. The length of marginal gap, which is the sum of lengths of cracks in the interface zone, was then measured using ImagePro Plus software (Media Cybernetics). Five measuring were taken for each restoration (accuracy ±12 µm). Result showed the mean value of measurements, standard deviation in each case was less than 0.15% according to mean value. TABELA 1. Materiały wykorzystane w badaniach. TABLE 1. Materials used in the study.

Materiał (Producent) / Material (Manufacturer)	Rodzaj kompozytu i zastosowanie / Type of composites and application	Rodzaj i wielkość wypełniacza / Type of fillers and size	Udział objętościowy wypełniacza / Volume fraction of fillers [% wag. / wt%]	Skurcz polimery- zacyjny / Polymerization shrinkage [%]
Filtek Supreme (3M ESPE)	nanohybrydowy,	tlenki cyrkonu i krzemu, konwencjonalny wypełniacz szklany (~1 μm), nanowypełniacze (~10 nm), nanoczą- steczki ceramiczne modyfikowane organicznie (2-3 nm) zirconia/silica filler, conventional glass fillers (~1 μm), nanofillers (~10 nm), organically modified ceramic nanoparticles (2-3 nm)	79	1.8
Ceram X (Dentsply)	uniwersalny/ nano-hybrid, universal	nieorganiczny wypełniacz ze szkła barowego, trójfluorek iterbu, szkło fluorosilikatowe z dodatkami Ba i AI, tlenek krzemu o wysokiej dyspersji, mieszanina sferoidalnych tlenków o wielkość cząstek 0,04-3,0 μm inorganic fillers of barium glass, ytterbium trifluoride, Ba-AI-fluorosilicate glass, highly dispersed silicon dioxide and spheroid mixed oxide, particle size of 0.04-3.0 μm	76	1.9

Wyniki badań i dyskusja

Wyglad wypełnień po zanurzeniu w roztworze błekitu metylenowego przedstawiono na RYS. 1 i 2. Zaobserwowano powiększanie szczeliny brzeżnej wraz z ilością cykli obciążeń cieplnych. Średnia długość szczeliny odniesiona do długości obwodu dla obydwu rodzajów wypełnień została przedstawiona na RYS. 3. Średnia wielkość szczeliny przed rozpoczęciem cyklu obciążeń cieplnych wynosiła: dla Ceram X 11,69 mm ± 2,53 µm, natomiast dla F.Supreme 7,52 mm ± 11,29 µm, co stanowi odpowiednio 12,19% i 30,18% obwodu. Jest to zgodne z wynikami zawartymi w pracy [3], gdzie tylko 52,5% próbek przed cyklem obciążeń cieplnych nie wykazywało szczeliny brzeżnej. Wykres długości szczeliny brzeżnej (procentowo w odniesieniu do długości obwodu) w funkcji ilości termocykli wykazuje klasyczny kształt krzywej zużycia. W pierwszym okresie obciążeń cieplnych (do ok. 6000 cykli) obserwowano szybki wzrost długości szczeliny. W kolejnym okresie obciążania dla materiału Filtek Supreme obserwowano plateau przy wartości ok. 50% aż do końca testu z nieznacznym wzrostem przy 20000 cykli. Dla materiału Ceram X zanotowano ciągły wzrost długości szczeliny brzeżnej z nieznacznym obniżeniem prędkości propagacji w zakresie 6000 ÷ 16000 cykli. Po przekroczeniu tego punktu zaobserwowano szybki wzrost długości szczeliny. Przewiduje się, że przy aproksymacji krzywej zużycia wielomianem 3 stopnia, utworzenie szczeliny na całym obwodzie nastąpi przy ok. 22000 cykli. W przypadku zęba kontrolnego (bez wypełnienia) nie zaobserwowano żadnych pęknięć czy szczelin podczas całego testu.

Na podstawie równań regresji krzywych zużycia wyznaczono prędkość rozwoju szczeliny brzeżne, jako wartość pierwszej pochodnej w środkowym punkcie rozpatrywanego przedziału. W obydwu przypadkach zauważyć można dwa etapy wzrostu szczeliny – pierwszy, pomiędzy 0 i około 4 000 cykli i drugi, w rejonie plateau (pomiędzy 6 000 i 12 000 termocykli). Wartość prędkości rozwoju szczeliny dla materiału Filtek Supreme wynosiła w etapach odpowiednio 0,79 i 0,09 mm na 1000 cykli termicznych. Natomiast dla materiału Ceram X wyznaczone prędkości rozwoju szczeliny wynosiły odpowiednio 1,13 i 0,19 mm/1000 cykli. On the basis of diagrams there were assigned the velocity of marginal gap formation calculated as a value of first derivative of an approximation's function (3rd degree polynomial) in central point of a consider range.

Results and Discussions

Images of restoration after dye penetration test there are presented in FIG. 1 and 2. It was noticed increasing of marginal gap with the number of cycles. The mean gap lengths for both the Ceram X and Filtek Supreme restorative composite specimen were averaged and presented in FIG. 3. The mean marginal gap length before thermocycling for the Ceram X specimens was 1.69 mm ± 2.53 µm (12.19% in comparison with the perimeter), and for the F.Supreme specimens was 7.52 mm ± 11.29 µm (30.18%) according to work [3], where only 52.5% of the control preparations (nonthermocycled) showed no microleakage at the enamel and dentin margins. The diagram of marginal gap's length influenced by termocycling showed a classic wear curve. In first period of thermocycling (till 6000 cycles) a quick increasing of marginal gap's length was observed. Thereafter from this point a plateau on value of about 50% for Filtek Supreme was noticed till the end of research period with a slightly increasing in the end. For Ceram X composite there was observed continuous increasing of length of marginal gap, with the speed of propagation slightly diminished in range 6000 to 16000 cycles. Beyond this point a quick increasing of gap formation was noticed. The prediction of complete formation of marginal gap is on the value of about 22000 of thermocycles in the case of 3rd degree polynomial approximation of wear curve. The reference tooth (without restoration) didn't show any cracks or gaps during all test period in area of interest.

On the basis of the polynomial regression curves there were assigned velocities of marginal gap formation calculated as a value of first derivative of an approximation's function in central point of a consider range. In both cases it can be seen two stages of marginal gap's growth – first, between 0 and about 4 000 cycles, and second, in plateau region (between 6 000 and 12 000 thermocycles). Calculated velocities for Filtek Supreme showed value of 0.79 and 0.09 mm of marginal gap per one thousand of thermocycles (respectively) while for Ceram X the values were 1.13 and 0.19 mm/1000 cycles.



RYS. 1. Szczelina brzeżna w przypadku wypełnienia materiałem Ceram X po wykonaniu: a) 0 cykli, b) 10 000 cykli i c) 20 000 cykli. FIG. 1. Marginal gap in Ceram X restoration composite after a) 0 cycles, b) 10 000 cycles and

c) 20 000 cycles.



RYS. 2. Szczelina brzeżna w przypadku wypełnienia materiałem Filtek Supreme po wykonaniu: a) 0 cykli, b) 10 000 cykli i c) 20 000 cykli.

FIG. 2. Marginal gap in Filtek Supreme restoration composite after a) 0 cycles, b) 10 000 cycles and c) 20 000 cycles.

Szczelność brzeżna pomiędzy tkankami zęba i wypełnieniem zależna jest od wielu czynników, np. składu materiału wypełnienia, właściwości materiału i systemu wiążącego, wzajemnymi interakcjami pomiędzy materiałami, właściwościami tkanek oraz oddziaływania środowiska jamy ustnej. Obydwa badane materiały należą do tej samej grupy kompozytów nanohybrydowych z podobną ilością wypełniacza ceramicznego, główne różnice występują w rodzaju żywicy osnowy oraz rodzaju wypełniacza, a także w stosowanych systemach wiążących.



RYS. 3. Rozwój szczeliny brzeżnej (procentowo w odniesieniu do długości obwodu wypełnienia) w funkcji ilości termocykli.

FIG. 3. Marginal gap as percentage of restoration's perimeter in dependence of thermocycles.

The marginal integrity of the tooth and restoration interface is dependent upon several factors, for example of restorative material composition, the physical properties of the material and adhesive system, interactions between materials, physical properties of the tissue interface, and the interaction of the oral environment. Both materials represent the same type of composite (nanohybrid) with similar volume of fillers. The main differences reveal in resin matrix composition and components of reinforcement and also adhesive systems.

Początkowa długość szczeliny brzeżnej dla materiału Filtek Supreme była niemal trzykrotnie większa niż dla Ceram X. Rossomado i in. w pracy [7] przedstawili wartości wg skali ocen (0 - najlepsza, 3 - najgorsza) mikroprzecieku dla zębów przed procesem zmęczenia cieplnego, dla których uzyskano wartość 2,40, natomiast po zmęczeniu cieplnym wartość wynosiła 3. Podobne rezultaty uzyskali Wahab i in. [3] przy zastosowaniu tej samej skali oceny. Ich badania wykazały tworzenie szczeliny brzeżnej w 40% przypadków wypełnień materiałami nanohybrydowymi przed procesem zmęczenia cieplnego. Wyniki te są zbieżne z uzyskanymi w niniejszej pracy. Wielkość przecieku wypełnień kompozytowych może być odniesiona do efektu skurczu polimeryzacyjnego. Różnice w tworzeniu szczeliny początkowej dla zębów przed procesem zmęczenia cieplnego wynikać mogą z rodzaju zastosowanego systemu wiążącego oraz z charakterystyki skurczu polimeryzacyjnego [7].

W przypadku materiału Ceram X obserwowano 3-krotnie szybsze powiększanie szczeliny brzeżnej w porównaniu do Filtek Supreme w pierwszym etapie zmęczenia, a końcowa długość szczeliny była niemal równa obwodowi wypełnienia. Materiały te posiadają zbliżone ilości wypełniaczy, a pomimo różnic w ich składzie charakteryzują się podobnymi wartościami współczynnika rozszerzalności cieplnej [12]. W związku z tym przyczyn należy upatrywać w adhezji materiału wypełnienia do tkanek zęba. Istotnym czynnikiem jest tu system wiążący. Żywice bez wypełniacza oraz materiały kompozytowe charakteryzują się relatywnie wysokim współczynnikiem rozszerzalności cieplnej w porównaniu do tkanek zęba, jednakże są one również doskonałymi izolatorami, co powoduje powstawanie złożonego układu oddziaływań cieplno-mechanicznych.

Wnioski

Na obecnym etapie badań sformułowano następujące wnioski:

1. Zmęczenie cieplne istotnie zwiększa mikroprzeciek wypełnień kompozytowych klasy I, rozwój szczeliny brzeżnej może być opisany wielomianem 3-go stopnia, a charakter rozwoju jest typowy dla klasycznych procesów zużycia.

2. Metoda oceny rozwoju szczeliny brzeżnej przedstawiona w niniejszej pracy umożliwia określenie prędkości rozwoju szczeliny i na tej podstawie przewidywania trwałości wypełnienia. Opracowana metoda wydaje się być skutecznym testem oceny dla materiałów stomatologicznych stosowanych na wypełnienia.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008-20011 jako projekt badawczy nr 3260/B/T02/2008/35.

Piśmiennictwo

[1] Gale M.S., Darvell B.W.: Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. Journal of Dentistry 27 (1999), 89-99. [2] Ernst C.P., Canbek K., Euler T., Willershausen B.: In vivo validation of the historical in vitro thermocycling temperature range for dental materials testing. Clin Oral Invest 8 (2004), 130-138.

[3] Wahab F.K., Shaini F.J., Morgano S.M.: The effect of thermocycling on microleakage of several commercially available composite Class V restorations in vitro. The Journal of Prosthetic Dentistry (2003) Vol. 90, No 2, 168-174.

[4] Curtis R.V., Watson T.F. (ed.): Dental biomaterials. Imaging, testing and modeling. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England, 2008.
[5] Palmer DS, Barco MT, Billy EJ: Temperature extremes produced orally by hot and cold liquids. J Prosthet Dent (1992) 67:325-327.
[6] Brown W.S., Jacobs H.R., Thompson R.E.: Thermal fatigue in teeth. J Dent Res 51 (1972), 461-467.

[7] Rossomando K.J., Wendt S.L. Jr.: Thermocycling and dwell times in microleakage evaluation for bonded restorations. Dent. Mater., 11:47-51, 1995.

The initial length of marginal gap was almost 3 times higher for F.Supreme composite than Ceram X. Rossomado et al. [7] showed means values of microleakage scores (0 - the best, 3 - the worst) for non-thermocycled specimens of 2.40 when thermocycled has the value of 3.0. Similar results were obtained by Wahab et al. [3] by using the same scoring system. The research showed marginal gap formed in 40% of non-thermocycled nanohybrid materials, similar to tested in this study. The extent of leakage of the composite restoration can be attributed to the effects of polymerization shrinkage of the bonding resin and the composite restoration. The differences of leakage for the non-thermocycled composite specimens can be due to the quality of bonds of the different bonding resin systems and to the polymerization shrinkage characteristics [7].

In the case of Ceram X composite there was quick increasing of marginal gap (3 times faster than F.Supreme in first stage) and its length was almost equal restoration's perimeter. Both materials had similar filler volume fraction and should have almost the same value of coefficient of thermal expansion [12], which points, that marginal gap formation is the result of bonding material properties and its adhesion to composite restoration and tooth tissues. So the adhesive system is the important thing. While unfilled resins and resin composite restorative materials have relatively high linear coefficients of thermal expansion compared to tooth structures, they are extremely good thermal insulators. This insulating characteristic complicates the influence of thermal expansion.

Conclusions

In the present experimental conditions, it can be concluded that:

1. Thermocycling significantly increased the microleakage of Class I composite restorations, increasing of marginal gap may be described by 3rd degree polynomial line, which represents classic wear curve.

2. The method of evaluation of increasing of marginal gap developed in this work enables determination the velocity of gap formation and prediction of durability. Presented method seems to be an effective test for evaluation of dental restoration materials.

Acknowledgments

.

The authors acknowledge to the support of the Ministry of Science and Higher Education, grant No. 3260/B/ T02/2008/35.

References

[8] Mayer T., Eickholz P.: Microleakage of temporary restorations after thermocycling and mechanical loading. Journal of Endodontics, Vol. 23, No. 5, pp. 320-322, 1997.
[9] Stappert C.F.J., Chitmongkolsuk S., Silva N., Att W., Strub J.R.:

[9] Stappert C.F.J., Chitmongkolsuk S., Silva N., Att W., Strub J.R.: Effect of mouth-motion fatigue and thermal cycling on the marginal accuracy of partial coverage restorations made of various dental materials. Dental materials 24:1248-1257, 2008.

[10] Ehrenberg D., Weiner G.I., Weiner S.: Long-term effects of storage and thermal cycling on the marginal adaptation of provisional resin crowns: A pilot study. The Journal Of Prosthetic Dentistry Vol. 95, No. 3, pp. 230-236, 2006.

[11] Pałka K., Niewczas A.: Badania zmęczenia cieplnego stomatologicznych wypełnień kompozytowych. Inżynieria Biomateriałów (Engineering of Biomaterials), nr 96-98, 2010, str. 61-65.

[12] Versluis A., Douglas W.H., Sakaguchi R.L.: Thermal expansion coefficient of dental composites measured with strain gauges. Dental Materials vol. 12, pp. 290-294, 1996.

BI MATERING OF



STUDIA PODYPLOMOWE Biomateriały – Materiały dla Medycyny 2011/2012

Organizator:	Adres:
Akademia Górniczo-Hutnicza	30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30
im. Stanisława Staszica w Krakowie	Pawilon A3, p. 108 lub 107
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki	tel. 12 617 44 48, 12 617 34 41; fax. 12 617 33 71
Katedra Biomateriałów	email: epamula@agh.edu.pl; stodolak@agh.edu.pl;
	krok@agh.edu.pl
Kierownik:	http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/
Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła	biomaterialy-materialy-dla-medycyny.html

Charakterystyka:

Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów, a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: *in vitro* i *in vivo*). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.

Sylwetka absolwenta:

Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia), a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny.

Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biozgodności materiałów.

Zasady naboru:

Termin zgłoszeń: od 20.09.2011 do 20.10.2011 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej

Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 108, 107 lub 501 Osoby przyjmujące zgłoszenia:

Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Dr inż. Ewa Stodolak (tel. 12 617 34 41, e-mail: stodolak@agh.edu.pl) Mgr inż. Małgorzata Krok (tel. 12 617 44 48, e-mail: krok@agh.edu.pl)

Czas trwania: Opłaty: 2 semestry (od XI 2011 r. do VI 2012 r.) 2 600 zł	
---	--

Informacje dodatkowe:

Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.

Przewidywana liczba godzin. 160.

Przewidywana data rozpoczęcia: 26.11. 2011.