

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

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

**Number 114**

Numer 114

**Volume XV**

Rok XV

**JULY 2012**

LIPIEC 2012

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**

WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Krakow**

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**

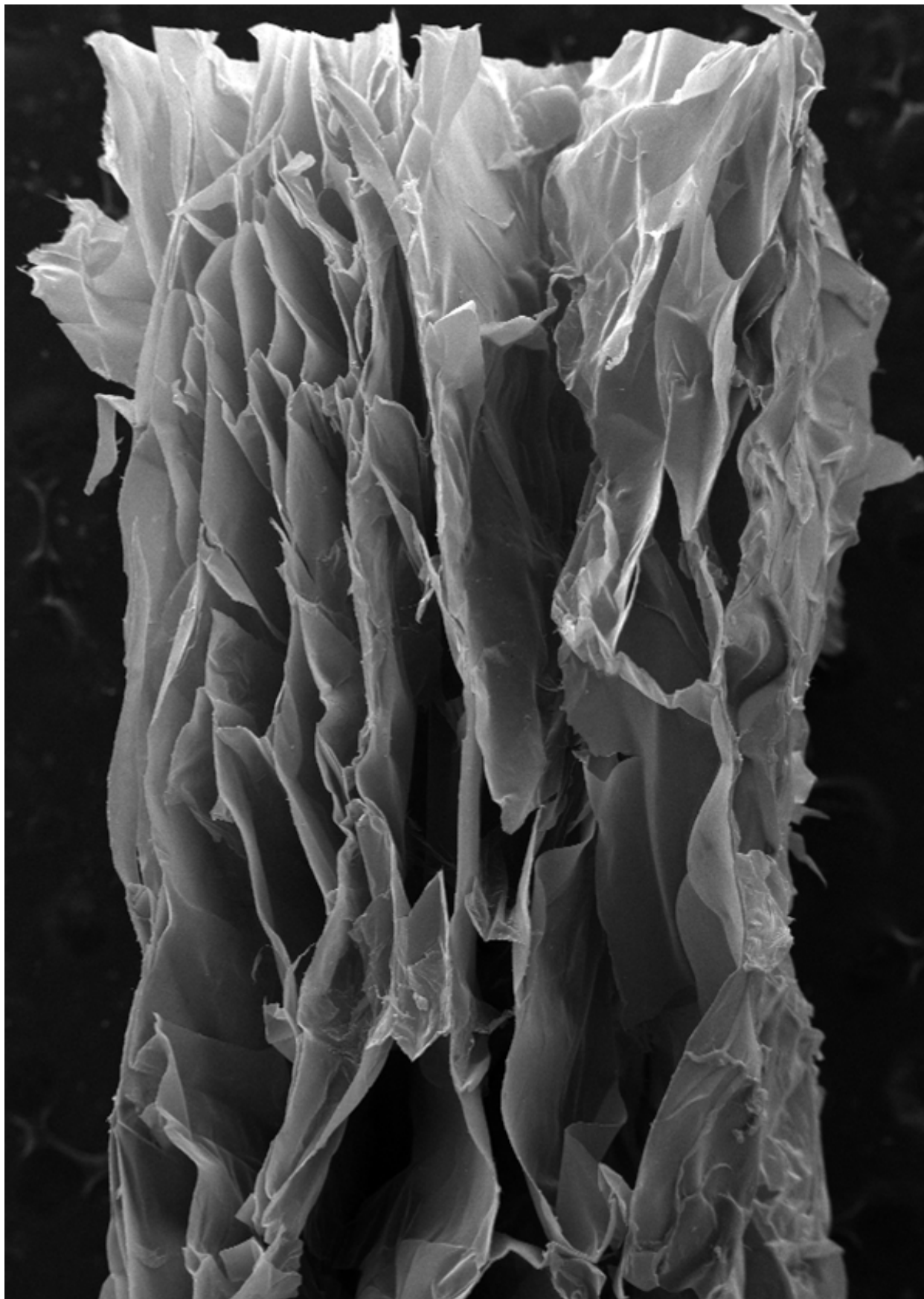
Projekt  
**Katarzyna Trała  
Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF  
EDITORIAL OFFICE:**  
ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland**  
Akademia  
Górnictwo-Hutnicza  
al. Mickiewicza 30/A-3  
30-059 Kraków

**Issue: 200 copies**  
Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing  
House AKAPIT**  
Wydawnictwo Naukowe  
AKAPIT  
e-mail: [wn@akapit.krakow.pl](mailto:wn@akapit.krakow.pl)



**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD**  
**MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

**Iulian Antoniac**

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

**Lucie Bacakova**

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

**Romuald Będziński**

POLITECHNIKA WROCLAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Marta Błażewicz**

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

**Stanisław Błażewicz**

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

**Maria Borczuch-Łączka**

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

**Wojciech Chrzanowski**

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

**Jan Ryszard Dąbrowski**

POLITECHNIKA BIALOSTOCKA / BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

**Matthias Epple**

UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

**Andrzej Górecki**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Robert Hurt**

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

**James Kirkpatrick**

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

**Wojciech Maria Kuś**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Małgorzata Lewandowska-Szumieł**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Jan Marciński**

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Sergey Mikhalovsky**

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

**Stanisław Mitura**

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

**Roman Pampuch**

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

**Stanisław Pielka**

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCLAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

**Vehid Salih**

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

**Jacek Składzień**

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

**Andrei V. Stanishevsky**

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

**Anna Ślósarczyk**

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

**Tadeusz Trzaska**

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

**Dimitris Tsipas**

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzycy 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 (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

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

tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61  
tel./fax: (48) 12 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma:  
[www.biomat.krakow.pl](http://www.biomat.krakow.pl)

## Warunki prenumeraty

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

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial 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. 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.
6. 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.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
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 journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:

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 Krakow, Poland

tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61  
tel./fax: (48) 12 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website:  
[www.biomat.krakow.pl](http://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 Krakow, Poland  
ING Bank Slaski S.A.  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001



*XXII Conference on  
BIOMATERIALS  
IN MEDICINE  
AND  
VETERINARY  
MEDICINE*

*11-14 October 2012  
Hotel "Perła Południa"  
Rytro, Poland*

**[www.biomat.agh.edu.pl](http://www.biomat.agh.edu.pl)**



**PAN**  
POLSKA AKADEMIA NAUK





## SPIS TREŚCI

<b>NOVEL STRATEGIES FOR AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC DELIVERY IN SKELETAL TISSUES - A REVIEW</b> URSZULA POSADOWSKA, ELŻBIETA PAMUŁA	<b>3</b>
<b>SHAPE MEMORY PROCESS IN RESORBABLE POLYMERS: EFFECT ON SURFACE PROPERTIES AND CELL ADHESION</b> ANA M. COSTA, ANA S. FERREIRA, URSZULA POSADOWSKA, MAŁGORZATA KROK, ANNA SMOLA, PIOTR DOBRZYŃSKI, ELŻBIETA PAMUŁA	<b>8</b>
<b>GROWTH OF ANIMAL CELLS ON FLEXIBLE INTERFACE OF LIQUID FLUOROCARBON</b> MACIEJ PILAREK, IWONA GRABOWSKA	<b>12</b>
<b>SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA BIORESORBOWALNYCH TERPOLIMERÓW L-LAKTYDU/GLIKOLIDU/BURSZTYNIANU BUTYLU WYKAZUJĄCYCH PAMIĘĆ KSZTAŁTU</b> NATALIA ŚMIGIEL, ANNA SMOLA, HENRYK JANECZEK, JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI	<b>15</b>
<b>UWALNIANIE GENTAMYCYN Y Z NOŚNIKÓW POLIMEROWYCH</b> ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, JAN CHŁOPEK	<b>21</b>
<b>OCENA HISTOLOGICZNA I RADIOLOGICZNA KOŚCI KRÓLIKÓW PO IMPLANTACJI KOMPOZYTU CHAP-GLUKAN</b> LESZEK BORKOWSKI, MARTA PAWŁOWSKA, IZABELA POLKOWSKA, MIROSLAW KARPIŃSKI, TYMOTEUSZ SŁOWIK, TOMASZ PIERSIAK, ŁUKASZ MATUSZEWSKI, ANNA ŚLÓSARCZYK, GRAŻYNA GINALSKA	<b>28</b>
<b>MODEL MATEMATYCZNY DO WYZNACZANIA PARAMETRÓW FORMOWANIA NANORUREK TiO<sub>2</sub> PODCZAS ANODOWANIA</b> ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK, KATARZYNA ARKUSZ, AGNIESZKA KACZMAREK	<b>34</b>

## CONTENTS

<b>NOVEL STRATEGIES FOR AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC DELIVERY IN SKELETAL TISSUES - A REVIEW</b> URSZULA POSADOWSKA, ELŻBIETA PAMUŁA	<b>3</b>
<b>SHAPE MEMORY PROCESS IN RESORBABLE POLYMERS: EFFECT ON SURFACE PROPERTIES AND CELL ADHESION</b> ANA M. COSTA, ANA S. FERREIRA, URSZULA POSADOWSKA, MAŁGORZATA KROK, ANNA SMOLA, PIOTR DOBRZYŃSKI, ELŻBIETA PAMUŁA	<b>8</b>
<b>GROWTH OF ANIMAL CELLS ON FLEXIBLE INTERFACE OF LIQUID FLUOROCARBON</b> MACIEJ PILAREK, IWONA GRABOWSKA	<b>12</b>
<b>SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BIORESORBABLE L-LACTIDE/GLYCOLIDE/ BUTYLENE SUCCINATE TERPOLYMERS WITH SHAPE MEMORY BEHAVIOR</b> NATALIA ŚMIGIEL, ANNA SMOLA, HENRYK JANECZEK, JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI	<b>15</b>
<b>GENTAMICIN RELEASE FROM POLYMERIC CARRIERS</b> ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, JAN CHŁOPEK	<b>21</b>
<b>HISTOLOGICAL AND RADIOLOGICAL ANALYSIS OF RABBIT BONES AFTER IMPLANTATION OF CHAP-GLUCAN COMPOSITE</b> LESZEK BORKOWSKI, MARTA PAWŁOWSKA, IZABELA POLKOWSKA, MIROSLAW KARPIŃSKI, TYMOTEUSZ SŁOWIK, TOMASZ PIERSIAK, ŁUKASZ MATUSZEWSKI, ANNA ŚLÓSARCZYK, GRAŻYNA GINALSKA	<b>28</b>
<b>A MATHEMATICAL MODEL FOR SELECTION OF FORMATION PARAMETERS OF TiO<sub>2</sub> NANOTUBE BY ANODIZING</b> ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK, KATARZYNA ARKUSZ, AGNIESZKA KACZMAREK	<b>34</b>

WERSJA PAPIEROWA CZASOPISMA „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIALÓW” JEST JEGO WERSJĄ PIERWOTNĄ  
 PRINTED VERSION OF „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIALÓW” IS A PRIMARY VERSION OF THE JOURNAL

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO  
 STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS

EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE AND HIGHER EDUCATION  
 ABSTRACTED IN APPLIED MECHANICS REVIEWS

**WSTĘPNA OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI  
BIOMEDYCZNEGO POLI(ε-KAPROLAKTONU)  
OTRZYMANEGO W OBECNOŚCI OKTANIANU CYNY**

KAROLINA ŻÓŁTOWSKA, MARCIN SOB CZAK,  
GRZEGORZ NAŁĘCZ-JAWECKI, EWA OŁĘDZKA,  
ANDRZEJ JAKLEWICZ, WACŁAW LECHOSŁAW KOŁODZIEJSKI **41**

**CHARAKTERYSTYKA USIECIOWANYCH  
MATERIAŁÓW KOLAGENOWYCH**

JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA, NINA ŁUCZYŃSKA,  
ANNA BAJEK, ALDONA RYNKIEWICZ, ALINA SIONKOWSKA **46**

**OCENA STRUKTURY, MODUŁU YOUNGA  
ORAZ CYTOTOKSYCZNOŚCI KOMPOZYTÓW  
NA BAZIE CHITOZANU**

AGATA PRZEKORA, KRZYSZTOF PAŁKA,  
BEATA MACHERZYŃSKA, GRAŻYNA GINALSKA **52**

**WPŁYW REAKTYWNOŚCI JONOWEJ BIOMATERIA-  
ŁÓW NA ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK IN VITRO**

AGATA PRZEKORA, DOROTA KOŁODYŃSKA,  
GRAŻYNA GINALSKA, ANNA ŚLÓ SAR CZYK **59**

**PRELIMINARY EVALUATION OF CYTOTOXICITY  
OF THE BIOMEDICAL POLY(ε-CAPROLACTONE)s  
OBTAINED IN THE PRESENCE OF TIN OCTANOATE**

KAROLINA ŻÓŁTOWSKA, MARCIN SOB CZAK,  
GRZEGORZ NAŁĘCZ- JAWECKI, EWA OŁĘDZKA,  
ANDRZEJ JAKLEWICZ, WACŁAW LECHOSŁAW KOŁODZIEJSKI **41**

**CHARACTERIZATION OF CROSS-LINKED  
COLLAGEN MATRICES**

JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA, NINA ŁUCZYŃSKA,  
ANNA BAJEK, ALDONA RYNKIEWICZ, ALINA SIONKOWSKA **46**

**STRUCTURAL PROPERTIES, YOUNG'S MODULUS  
AND CYTOTOXICITY ASSESSMENT  
OF CHITOSAN-BASED COMPOSITES**

AGATA PRZEKORA, KRZYSZTOF PAŁKA,  
BEATA MACHERZYŃSKA, GRAŻYNA GINALSKA **52**

**THE EFFECT OF BIOMATERIALS ION REACTIVITY  
ON CELL VIABILITY IN VITRO**

AGATA PRZEKORA, DOROTA KOŁODYŃSKA,  
GRAŻYNA GINALSKA, ANNA ŚLÓ SAR CZYK **59**

# NOVEL STRATEGIES FOR AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC DELIVERY IN SKELETAL TISSUES - A REVIEW

URSZULA POSADOWSKA, ELŻBIETA PAMUŁA\*

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND  
\* E-MAIL: EPAMULA@AGH.EDU.PL

## Abstract

*This paper reviews recent advances concerning antibiotic-loaded microparticles application in osteomyelitis treatment. We discuss different methods utilized for microparticles' preparation, i.e. double emulsification, simple emulsification and spray drying. Materials comprised of sphere-shaped matrices are also presented. We point out that the most commonly used microsphere-building components are biodegradable aliphatic polyesters such as poly(lactide-co-glycolide) PLGA, poly(sebacic-ricinoleic-ester-anhydride) P(SA-RA) and poly(lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid) PLHMGGA. Biopolymers like gelatin, starch or chitosan are also applied as antibiotic carriers. Relationship between preparation method, type of material and its crosslinking degree, microparticles' immobilization steps and the amount of loaded antibiotic are reported as the main factors controlling release rate of drugs in osteomyelitis treatment. And finally, several approaches to produce injectable formulations as well as implantable three dimensional scaffolds with the use of microparticles are described. All in all, this proves that antibiotic-loaded microspheres are a versatile form of biomaterials in osteomyelitis therapy.*

**Keywords:** aliphatic polyesters, biopolymers, gentamicin administration, microparticles, osteomyelitis

[*Engineering of Biomaterials 114 (2012) 3-7*]

## Introduction

Osteomyelitis is thought to be an immediate or chronic result of microbial residence directly in bone or bone marrow, which leads to bone loss and spreading of the infections to surrounding tissues [1-3]. Every year many patients suffer from infections caused by a variety of microbiological agents, mostly *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [4-6]. Usually the localizations at which osteomyelitis is most often encountered are long bones or a part of the upper limb, for example the humerus [4]. Unfortunately, the diagnosis of osteomyelitis is quite complicated, which is a result of the diversity of symptoms. Additionally, it often takes more than two weeks after observation of the onset of signs to firmly identify the origin of bone malfunction as osteomyelitis [4]. Such a highly serious threat is frequently encountered when implants are placed via surgical procedures. The risk of infection is high, because materials which are used for skeletal implant formation demonstrate a strong tendency to adsorb microorganisms onto their surfaces [7].

Furthermore, patient skin and mucosa are areas densely occupied with microbes, which generate extreme danger of implant contamination [7-10]. All in all, risk of serious infections, causing malignant abscesses formation, are substantial. In the above fields, there is an extremely strong attempt to cure and also prevent infections originating from osteomyelitis.

One of the possible solutions to deal with osteomyelitis is aminoglycoside antibiotic application. Gentamicin sulphate is the most widely used antyostemyelitic factor. Currently, there are two main procedures utilized to administer gentamicin during bone regeneration. The first method involves intravenous injections using an indwelling catheter [11] while the second involves local implantation of bone cement composed of polymethylmethacrylate beads or calcium phosphate saturated with gentamicin [12,13]. Overall, the role of gentamicin in skeletal tissue regeneration has been in detail reported in the work of Mourino and Boccaccini [14].

A very promising solution seems to be gentamicin encapsulation, opening the possibility of its local and sustained administration [15]. Local delivery of antibiotics ensures significant increase in bactericidal activity, lowers the extent of bacterial resistance and the allergization quota, and shows higher biological stability by preventing in vivo degradation [5,16-19]. Besides, there is a need to control drug release for the required period of time. Antibiotic administration at a proper level must last at least 3-6 weeks [20,21]. It is believed that this period of time is sufficient to achieve substantial wound vascularization [22]. Other authors claim that such a compulsory period should last no less than 6-8 weeks [23,24]. Fibrin seal coats, PMMA beads available commercially for the last 10 years and collagen sponges showed antibiotic release time no longer than 4 days, which is in general not enough to achieve sufficient therapeutic effects [17]. Thus, application of gentamicin-loaded microspherical particles demonstrating longer gentamicin release times seems to be an effective method to treat osteomyelitis.

This paper reviews recent advances in the method of osteomyelitis treatment using spherical-shaped gentamicin delivery systems. In detail, different methods, materials as well as applicative approaches adopted to antibiotic-loaded spherically shaped implants are discussed. Finally a course for perspective investigations is proposed to researchers.

## Sphere-shaped microcarriers containing gentamicin

There are different methods to produce microparticles for drug delivery systems among which the double emulsification technique is the most widely used. But simple emulsification and spray drying can be applied as well. In general, particles which are characterized as micro-sized spherical constructs (30-300  $\mu\text{m}$ ), are capable of encapsulating gentamicin within its structure up to 6.0% in relation to overall formulation mass, which can confine more than 70% of initial drug ratio. The antibiotic in vitro releases phase reflecting sustained administration in vivo can last up to 60 days or even longer. An overview of materials and manufacturing methods to produce gentamicin loaded microcarriers are discussed in this section and summarized in TABLE 1.



TABLE 1. Methods, materials and characteristics of gentamicin loaded microparticles.

No.	Method	Material	Size [ $\mu\text{m}$ ]	Drug encapsulation efficiency [%]	Drug loading capacity [%]	Drug release profile	Ref.
I.	DOUBLE EMULSIFICATION $W_1/O/W_2$	PLGA (60/40)	$39.0 \pm 0.4$	$75.7 \pm 5.3$	$6.40 \pm 0.41$	ca. 60 days, 60% released, gentle burst release	[27]
		PLHMGA (35/65)	ca. 23.2	$75.4 \pm 12.0$	$6.92 \pm 1.10$	ca. 60 days, 60% released, gentle burst release	[27]
		PLGA (50:50)	$370 \pm 130$	ca. 50	$15 \pm 3$	12 days, 100% released, sigmoidal shape	[30]
		PLGA (50:50) - BATCH HOMOGENIZED	< 20	ca. 17.8	ca. 0.18	ca. 22 days, 100% release, very sharp burst release phase	[31]
		PLGA (50:50) - BATCH ULTRASONICATED	20 - 40	ca. 53.0 - 97.9	ca. 0.53 - 0.97	ca. 30 days, 100% released, very gentle burst release	[31]
II.	SPRAY DRY	PLGA (65/35), PLLA (50/50), PEG, Methylcellulose	150 - 300	ca. 26 - 60		ca. 50 days, 100% released, sigmoidal or delayed release profile (discs)	[32]
III.	EMULSIFICATION	Chitosan	60 - 125	ca. 67 - 55	ca. 4.8 - 27.1	ca. 30 days, 70% released, no burst release	[22]

#### Double emulsification water/oil/water ( $W_1/O/W_2$ )

The  $W_1/O/W_2$  technique in general implies dispersion droplets of water/oil (W/O) primary emulsion into an external aqueous phase, which is thought to constitute the second emulsification step [25]. The primary W/O emulsion, in order to obtain small droplets, demands quite high-shear conditions of preparation, while during the secondary emulsification step, the procedure uses lower shear, necessary to avoid internal droplet rupture [26]. During microparticle preparation for bone tissue regeneration, a primary emulsion is often composed of gentamicin loaded buffered solution, which is dispersed in polymer (e.g. PLGA) in a nonpolar solution only partially miscible or totally immiscible with water, which is further suspended in an external buffered phase. Organic solvent evaporation solidifies double walled microcapsules carrying entrapped antibiotic.

The methodology described here was utilized to obtain sphere-shaped micro-sized particles by Chaisri et al. [27]. The materials used were (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) with a ratio of 60/40 and poly(lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid) (PLHMGA) with a ratio of 35/65. Material substitution allowed development of a system solubilizing ca. 60% of initial drug ratio. Authors also noticed a strong relationship between microparticles' porosity and cumulative gentamicin release. Porosity on the other hand was mainly governed by initial copolymer concentration - increase of PLGA or PLHMGA amount apparently diminished pores' volume, which further was a cause of slower release rate. It was also observed that amount of gentamicin confined to microparticle hydrophobic core depended mostly on osmotic pressure of the inner emulsified buffered phase. All to all, a highly positive effect was achieved when osmotic pressure of inner hydrophilic phase had been, by changing buffer osmolarity, reduced in relation to external water phase.

An indubitable correlation between phase compositions and microparticles fabrication process was also pointed out in the research paper of Kempen et al. [28], where PLGA 50/50 was used. The microobjects were also obtained by a double emulsion technique, but the external aqueous phase was enriched with a little amount of isopropyl alcohol. This step caused immediate organic solvent (methylene chloride) extraction and instantaneous microsphere solidification, which overall greatly reduced microparticles' preparation time.

Shlapp et al. [29,30] on the other hand developed sphere-shaped microcapsules composed of a mixed system of PLGA (50/50). More specifically, a blend of Resomers RG 502H ( $M_w=13,500$  Da) and RG 503 ( $M_w=16,300$  Da) was used. After formation of antibiotic loaded microparticles, the formulation was immersed in a preswollen (pH=4.5) and homogenized suspension (pH~7.0) of insoluble collagen. The mixture obtained was then transferred into polypropylene dishes and freeze dried. By sedimentation studies authors proved a direct relationship between microparticles' fast settling rate and dramatic loss of final collagen/microparticles' composite uniformity. This problem was overcome by viscosity adjustment, which turned out to be a critical control point. The physical feature was further adjusted by pH suspension change, temperature of dispersion, rate of temperature loss during freeze-drying and collagen concentration.

What is also worth mentioning is that a relationship between the details of double emulsification as a microsphere fabrication method and gentamicin release mechanism was noticed by Virto et al. [31]. Significant differences were detected between uniformity of batches obtained when the emulsion was homogenized (batch 1) and ultrasonicated (batch 2). A remarkable initial burst of gentamicin from the homogenized composition (extremely steep slope of cumulative release curve) was noticed, while the ultrasonicated composition showed a much slower profile (gentle slope of cumulative release curve). In order to explain the phenomenon authors postulated that oily solvent evaporation during ultrasonication created a 'labyrinth' porosities winding through the solidifying microstructures. Labyrinth porosities, facilitated water penetration into microsphere structure that directly influenced gentamicin release. Greater water availability through porosities could also cause a greater autocatalytic effect of polymer degradation observed to batch 2, which was also pointed out as a reason for slower drug release. In the case of homogenization this phenomenon was observed to a lesser extent. It should be mentioned that in ultrasonicated microparticles it was possible to encapsulate more gentamicin than in the homogenized composition, which was also advantageous.

### Spray drying

Spray drying is a technique that can be finely tailored to produce antibiotic loaded microparticles. The difference between this method and double emulsification is very small and concerns the last stage - method of organic solvent removal. Narahariseti et al. [32] obtained single-walled microspheres by spray drying of the suspension made of gentamicin solution added drop by drop to polymer (PLGA, PEG or methylcellulose) dissolved in organic solvent (dichloromethane or ethyl acetate) while sonication. A different approach, based on limited solubility of concentrated polymer solutions, was used to create double-walled microparticles. The gentamicin portion was sonicated in organic solution (dichloromethane) and after the antibiotic had been uniformly suspended, PLGA was added to dissolve. This was followed by addition of PLLA concentrated solution (dichloromethane). Finally, the mixture was transferred to surfactant solution (polyvinyl alcohol) and stirred until microspheres were solidified. Then, the particles were pressed to form discs. The effect of performed experiment clearly showed biphasic discs degradation curve causing two-step gentamicin release. An initial burst was observed, which was possibly connected with escape of the outer portion of antibiotic, followed by a lag phase and second burst, attributed to bulk degradation of the polymer. What was also noticed was that 10% PEG addition to discs forming material dramatically increased the pore sizes, which was connected with almost 100% gentamicin release during initial burst phase. What is more, faster release rates were obtained in general for smaller microspheres than for bigger objects. Overall as polylactic acid chains tended to settle as a shell of the microparticle (the outer part) instead of a core (the inner part), antibiotic escaped also much more easily when it was initially solubilized in PLLA than in PLGA.

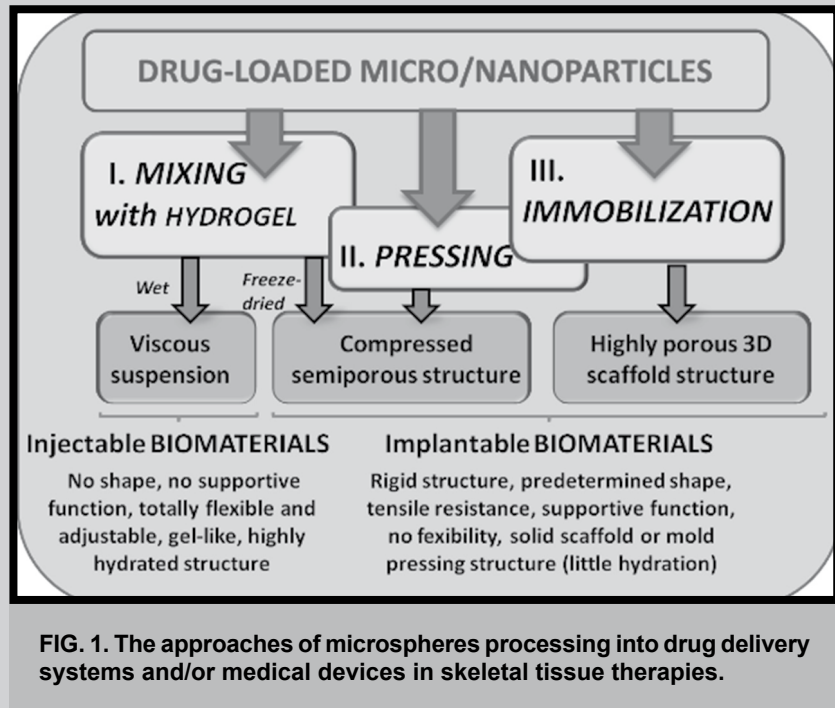
### Emulsification

Although the double emulsification appears to be an effective preparation method, it is not an exclusive option. In the work of Balmayor et al. [22] a single emulsification method was proposed to produce microspheres made of chitosan (poly  $\beta$ -(1-4))N-acetyl-d-glucosamine) and starch. In order to do this chitosan, oxidized starch and gentamicin in solutions were added drop-wise and emulsified in a mixture of water, mineral oil and Tween 80. After the emulsion had completely formed, cold acetone was added which solidified the spherical particles. As final stage crosslinking of microspheres' internal structure was performed by tripolyphosphate (TTP).

In a work of Shi et al. [33] gelatin aqueous solution was emulsified via a simple W/O emulsification technique in olive oil, which was followed by crosslinking with glutaraldehyde. Obtained microparticles were then swollen with buffered antibiotic solution. Formulation was then manually blended with poly(methyl methacrylate), supplied with the methacrylate monomer as well until a dough-like paste was obtained. Interestingly, authors observed a strong link between freeze-drying the final construct and release parameters. Fact of freeze-drying operation significantly reduced burst release and made the sustained release phase much longer. The relationship between construct porosity and release kinetics was, as previously mentioned, also described.

## Methodology of microspheres processing and application

Bone malfunctions resulting from osteomyelitis can be very complex. Taking into account different types of bone defects and treatment procedures gentamicin delivery systems should meet the requirements of individual needs [34]. Spherically-shaped microparticles show great potential in the prevention and treatment of bone infections, since it is possible to create injectable implants based on them, bind them to form semiporous solid structures or immobilize them into highly porous 3D scaffolds. The approaches of microspheres processing into drug delivery systems and/or medical devices are shown in FIG. 1.



### Injectable formulations containing microparticles

According to work of Balmayor et al. [22] gentamicin-carrying chitosan microspheres, after being collected and rinsed with water/acetone mixture, were immersed in sodium carbonate buffer. It allowed a crosslinking reaction between aldehyde groups of oxidized starch, placed in emulsion mixture simultaneously with chitosan, and primary amino acid groups from chitosan. Afterwards, to confer imine bond stabilization as well as reduce excess of aldehyde groups, treatment in  $\text{NaBH}_4$  was applied. So microspheres developed during this experiments were 'starch crosslinked'. Authors made an observation that creation of extra bonds between biopolymers inside microparticles (described in section 2.3 TTP crosslinking) or within overall microcomposite structures (imine bonds formation) could serve as a sensitive control point of gentamicin release rate, since initial burst phase in crosslinked microcomposites was significantly diminished in relation to noncrosslinked.

In another work [35] gentamicin was transferred into a bone defect by injection of polymeric solid suspension obtained by trituration poly(sebacic-co-ricinoleic-ester-anhydride) 3:7 w/w ratio (P(SA-RA)) with antibiotic particles (consistency of paste). Results of a biological assay performed on 10 week male osteomyelitis-induced Wistar rats proved the proper applicability as well as the therapeutic effect of (P(SA-RA)) blended with antibiotic. Exactly the same polymer (P(SA-RA)) 2:8 (w/w) was used by Brin et al. [36] to obtain polymer paste, in which a gentamicin amount as high as 20% (w/w) was triturated.

Prepared implants were injected intramedullarily into right tibias of rats; into left tibias plain polymer was placed, which was thought to constitute a reference. The whole procedure was performed after tibia were infected by *S. aureus*, which induced osteomyelitis confirmed after 21 days by X-ray analysis. Placing polymer paste with gentamicin into osteomyelitic tibia prevented abscess formation as well as the presence of microbes, while on the other hand, in the left tibia abscesses were clearly identified. In the left tibia bacterial colonies were also detected. These two research papers confirm the high utility of injectable formulations in gentamicin administration.

### Semiporous solid structures

The second possible route regarding implant formation is to suspend microspheres in the hydrogel matrix, press or pack the mixture tightly into shape forming molds and subsequently remove water molecules. The strategy described here was used for example by Narahariseti et al. [32] and Shlapp et al. [29] where chitosan/PLGA microspheres were suspended in a collagen hydrogel. In brief, microparticles were mixed with preswollen collagen (enriched with a portion of antibiotic as well), poured into PP dishes and then freeze dried. As a result, a porous collagen carrier bearing tightly packed microparticles was obtained. The manner described turned out to be successful - microcomposites altogether resistant to physical separation upon mechanical stress were produced. Process parameter optimization enabled authors to achieve gentamicin release over 7 days. Gentamicin external solubilization in the collagen carrier was sufficient to reach quickly a high level of antibiotic which was sustained by release from microparticles.

A quite different approach was presented by Jiang et al. [37]. Microcomposite implant was developed by packing chitosan/PLGA microspheres into cylindrical stainless steel molds. Filled molds were then pressed, heated and process parameters (time, temperature) were optimized in order to achieve bond formation between touching microspheres, which sticks them together into a solid implant. Results of experiments performed clearly showed that such microcomposites degraded much more slowly than pure PLGA scaffolds and simultaneously were able to guide new bone formation during in vivo studies. What is more, enrichment PLGA with chitosan provided an opportunity to functionalize the implant surface, which created the possibility of introducing additional modifications.

### Microspheres immobilized into 3D scaffolds

The strategy of microsphere immobilization was demonstrated by Son et al. [38], who introduced PLGA microparticles into porous calcium phosphate granules. First, hydroxyapatite and tricalcium phosphate particles were suspended in alginate solution, poured by syringe into liquid nitrogen to obtain spherical shape granules and freeze-dried. Then polymeric microspheres were obtained via double emulsification, which was followed by poly(ethylene imine) (cationic macromolecule) adsorption onto microspheres' external surface. This step was applied in order to modify surface charge so finally it was possible to embed polymeric microparticles in the calcium phosphate granules via electrostatic attractions.

An interesting approach was presented in the work of Shi et al. [33], where sphericity of antibiotic-loaded microspheres was utilized as a pore forming factor. The mixture composed of gelatin microparticles and PMMA was then transferred into Teflon dishes and left until it completely solidified. Microparticles were used as a precursor of implant porosity, which after disruption and gentamicin release left the PMMA construct highly porous. It was shown that the microparticles, beside drug delivery function, could be employed as a pore forming factor.

Kempen et al. [28] on the other hand prepared various kinds of 3D structures, with internally immobilized microparticles. One such structure was a collagen hydrogel, which was fabricated by mixing a collagen suspension with a crosslinking agent (glutaraldehyde). For microsphere immobilization, dried collagen hydrogels were simply incubated with aliquots containing weighted amounts of spheres. Microparticles were also immobilized in porous poly(propylene fumarate) (PPF) scaffolds by transferring both to a syringe and forced to a cylindrical glass mold. The polymerization reaction was performed under UV light, at room temperature. Microparticles immobilized in PPF scaffolds were subsequently embedded in the collagen hydrogel. Every additional microparticles immobilization step (collagen gel, PPF scaffold, PPF scaffold in collagen gel) significantly reduced burst release effect in drug release studies.

## Conclusions

In summary, it was shown that microspheres can be prepared via different methods, sharing in every case the easiness of preparation. Antibiotic agents can be successfully incorporated into such materials, with quite high quantities. The usage of sphere shaped microcarriers seems to be a perspective procedure and a strategy to deal with the antibiotic burst release problem, as a multilevel drug release rate was demonstrated. Drug release can be finely adjusted, which reflects microparticles' applicability potential if it comes to osteomyelitis cure or prevention. On the other hand, by taking advantage of microparticles sphericity, an implant suitable to almost every complex case of bone trauma in various configurations (injectable or implantable) can be obtained. All in all, microspheres' application in implant manufacturing constitutes an innovative approach and a promising path to solve the problem of infections accompanying treatment of defects in skeletal tissues.



## References

- [1] Kaldau N. K., Brorson S., Jensen P. E., Schultz C., Arpi M.: Bilateral polymicrobial osteomyelitis with *Candida tropicalis* and *Candida krusei*: a case report and an updated literature review. *J Infect Dis* 16 (2012) 16-22.
- [2] Haidar R., Boghossian R., Atiyeh B.: Duration of post-surgical antibiotics in chronic osteomyelitis: empiric or evidence-based. *J Infect Dis* 14 (2010) 752-758.
- [3] Dion A., Langman M., Hall G., Filiaggi M., Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment. *Biomaterials* 26 (2005) 7276-7285.
- [4] Pääkkönen M., Peltola H.: Antibiotic treatment for acute haematogenous osteomyelitis of childhood: Moving towards shorter courses and oral administration. *Int J Antimicrob Agents* 38 (2011) 273-280.
- [5] Lucke M., Schmidmaier G., Sadoni S., Wildemann B., Schiller R., Haas N.P., Raschke M.: Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 32 (2003) 521-531.
- [6] Barth R. E., Vogely C. H., Hoepelman A. I. M., Peters E. J. G.: 'To bead or not to bead?' Treatment of osteomyelitis and prosthetic joint-associated infections with gentamicin bead chains. *Int J Antimicrob Agents* 38 (2011) 371-375.
- [7] Lee D. W., Yun Y. P., Park K., Kim S. E.: Gentamicin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2)-delivering heparinized-titanium implant with enhanced antibacterial activity and osteointegration. *Bone* 50 (2012) 974-982.
- [8] Campoccia D., Montanaro L., Arciola C. R.: The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27 (2006) 2331-2339.
- [9] Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (1999) 1318-1322.
- [10] Schierholz J. M., Beuth J.: Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect*, 49 (2) (2001) 87-93.
- [11] Costerton J. W.: Biofilm theory guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 437 (2005) 7-11.
- [12] Walenkamp G. H., Kleijn L. L., de Leeuw M.: Osteomyelitis treated with gentamicin - PMMA beads: 100 patient followed for 1-12 years. *Acta Orthop. Scand.* 69 (1998) 518-512.
- [13] Sasaki T., Ishibashi Y., Katano H., Nagumo A., Toh S.: In vitro evaluation of vancomycin from calcium phosphate cement. *J Arthroplast* 20 (2005) 1055-1059.
- [14] Mourino V., Boccaccini A. R.: Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *J R Soc Interface* 7(43) (2010) 209-227.
- [15] Gautier H., Merle C., Auget J. L., Daculsi G.: Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate: comparison with a classical method. *Biomaterials* 21 (2000) 243-249.
- [16] Friess W., Schlapp M.: Release mechanisms from gentamicin loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles. *J Pharm Sci* 91(3) (2002) 845-855.
- [17] Changez M., Koul V., Dinda A. K.: Efficacy of antibiotics-loaded interpenetrating network (IPNs) hydrogel based on poly(acrylic acid) and gelatin for treatment of experimental osteomyelitis: in vivo study. *Biomaterials* 26 (2005) 2095-2104.
- [18] Gbureck U., Vorndran E., Barralet J. E.: Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomater* 4 (2008) 1480-1486.
- [19] Ginebra M. P., Traykova T., Planell J. A.: Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J Control Release* 113 (2006) 102-110.
- [20] Calhoun J., Manning M. M., Shirliff M.: Osteomyelitis of the Long Bones, *J. Bone Jt. Surg., Am.* 86(10) (2004) 2305-2318.
- [21] Puga A. M., Rey-Rico A., Magariños B., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A.: Hot melt poly- $\epsilon$ -caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomater* 8 (2012) 1507-1518.
- [22] Balmayor E. R., Baran E. T., Azevedo H. S., Reis R. L.: Injectable biodegradable starch/chitosan delivery system for the sustained release of gentamicin to treat bone infections, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 32-39.
- [23] Li, B., Brown, K. V., Wenke, J. C., & Guelcher, S. A.: Sustained release of vancomycin from polyurethane scaffolds inhibits infection of bone wounds in a rat femoral segmental defect model, *J Control Release* doi:10.1016/j.jconrel.2010.1004.1002.
- [24] Shirliff M. E., Bergquist S. C., Calhoun J.: Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 360 (1999) 47-65.
- [25] Graaf S., van der Schroen C. G., Boom R. M.: Preparation of double emulsions by membrane emulsification - a review. *J Membrane Sci* 251 (2005) 7-15.
- [26] Garti N., Bisperink C.: Double emulsions: progress and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 3 (1998) 657.
- [27] Chaisri W., Ghassemi A. H., Hennink W. E., Okonogi S.: Enhanced gentamicin loading and release of PLGA and PLHMGA microspheres by varying the formulation parameters. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 508-514.
- [28] Kempen D. H. R., Lu L., Hefferan T. E., Creemers L. B., Maran A., Classic K. L., Dhert W. J. A., Yaszemski M. J.: Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29 (2008) 3245-3252.
- [29] Schlapp M., Friess W.: Collagen/PLGA Microparticle Composites for Local Controlled Delivery of Gentamicin. *J Pharm Sci* 92(11) (2003) 2145-2151.
- [30] Friess W., Schlapp M.: Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur J Pharm and Biopharm* 63 (2006) 176-187.
- [31] Virto M. R., Elorza B., Torrado S., de Los Angeles Elorza M., Frutos G.: Improvement of gentamicin poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures. *Biomaterials* 28 (2007) 877-885.
- [32] Narahariseti P. K., Lewa M. D. N., Fub Y. C., Leec D. J., Wang C. H.: Gentamicin-loaded discs and microspheres and their modifications: characterization and in vitro release. *J Control Release* 102 (2005) 345-359.
- [33] Shi M., Kretlow J. D., Spicer P. P., Tabata Y., Demian N., Wong M. E., Kasper F. K., Mikos A. G.: Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate/gelatin/antibiotic constructs for craniofacial tissue engineering. *J Control Release* 152 (2011) 196-205.
- [34] Lee N., Baek S.: Effects of the diameter and shape of orthodontic mini-implants on microdamage to the cortical bone. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 138 (2010) 801-808.
- [35] Krasko M. Y., Golenser J., Nyska A., Nyska M., Brin Y. S., Domb A. J.: Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant. *J Control Release* 117 (2007) 90-96.
- [36] Brin Y. S., Golenser J., Mizrahi B., Maoz G., Domb A. J., Peddada S., Tuvia S., Nyska A., Nyska M.: Treatment of osteomyelitis in rats by injection of degradable polymer releasing gentamicin. *J Control Release* 131 (2008) 121-127.
- [37] Jiang T., Nukavarapu S. P., Deng M., Jabbarzadeh E., Kofron M. D., Doty S. B., Abdel-Fattah W. I., Laurencin C. T.: Chitosan-poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies. *Acta Biomater* 6 (2010) 3457-3470.
- [38] Son S. J., Lee K. B., Kim S. G., Kwon T. Y., Kin K. H.: Porous Calcium Phosphate Granules Containing Drug - loaded polymeric nanoparticles for bone regeneration, doi:10.1016/j.matlet.2012.02.114.

# SHAPE MEMORY PROCESS IN RESORBABLE POLYMERS: EFFECT ON SURFACE PROPERTIES AND CELL ADHESION

ANA M. COSTA<sup>1,2</sup>, ANA S. FERREIRA<sup>1,2</sup>, URSZULA POSADOWSKA<sup>2</sup>,  
MALGORZATA KROK<sup>2</sup>, ANNA SMOLA<sup>3</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>3,4</sup>,  
ELŻBIETA PAMUŁA<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> BIOENGINEERING, FACULTY OF ENGINEERING,  
UP – UNIVERSITY OF PORTO,  
REITORIA DA U. PORTO PRACA GOMES TEIXEIRA,  
PORTO 4099-002, PORTUGAL

<sup>2</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>3</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
UL. M. CURIE SKŁODOWSKIEJ 34, 41-800 ZABRZE, POLAND

<sup>4</sup> INSTITUTE OF CHEMISTRY, ENVIRONMENTAL PROTECTION AND  
BIOTECHNOLOGY, JAN DŁUGOSZ UNIVERSITY IN CZESTOCHOWA,  
AL. ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-200 CZESTOCHOWA, POLAND

\* E-MAIL: EPAMULA@AGH.EDU.PL

## Abstract

*The objectives of this study were to confirm the shape memory behavior of two new bioresorbable terpolymers (L-lactide, glycolide, and trimethylene carbonate: L-PLGTMC and B-PLGTMC), to follow the influence of the shape memory process on their surface properties and to test their cytocompatibility using osteoblast-like cells. For this purpose, foils of both terpolymers were prepared. The terpolymers' ability to recover up to 92-93% of the memorized shape within 10 seconds was obtained. The influence of shape memory process on the surface properties was assessed by water contact angle (WCA) measurement and atomic force microscopy (AFM) and the results suggested that both terpolymers preserved the hydrophilicity after recovery and also that B-PLGTMC polymer was rougher than L-PLGTMC (about 9 folds more). The AFM pictures showed the presence of spherical shape hills on the B-PLGTMC foil surface which after the stretching procedure became oriented toward the direction of the applied load. The terpolymers were seeded on both sides (Top and Bottom faces) with human MG63 osteoblast-like cells. Cell viability was assessed after 1, 3 and 7 days, using MTT assay. Results revealed an increasing number of metabolically active cells with the incubation time, suggesting, together with nitric oxide (NO) level determination, the cytocompatibility of both terpolymers. Cell spreading and morphology were investigated by H&E staining and obtained results corresponded well with ones of MTT and NO.*

**Keywords:** shape memory, PLGA, tissue regeneration, foil

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 8-11]

## Introduction

Shape-memory materials can change their shape upon application of an external stimulus. They have been proposed in biomedical device design because they allow for a minimally invasive surgery and recover to a predetermined shape in vivo [1,2].

Shape-memory alloys are widely used not only in industry but also in medicine [3], however, they still have some disadvantages regarding low biocompatibility for long term applications, corrosion, and high cost of a difficult fabrication and lack of biodegradability [1]. In this context, shape-memory polymers (SMPs) arise as an alternative to shape-memory alloys because they can be bioresorbable, and thus do not require invasive removal operation [4]. SMPs have been already proposed for several medical applications including tissue engineering scaffolds [5], laser-activated vascular stents [6], dialysis needle adapters for the reduction of hemodynamic stress within arteriovenous grafts [7].

Concerning the programming method for shape memory behavior, the activation is most commonly temperature-induced. At first the polymer is mechanically deformed at a temperature above glass transition temperature ( $T_g$ ) to obtain the temporary shape. This shape can be fixed by cooling the material and then the initial and permanent shape can be recovered when the polymer is reheated once again above  $T_g$  [8]. So, the polymer is able to memorize its initial shape. This phenomenon results from a dual-segment system: cross-links that store the permanent shape and switching segments that fix the temporary shape [9,4,10]. The mechanism involves the reversible freezing and activation of polymeric chain motion in the switching segments below and above  $T_g$ , respectively [11].

Poly(lactide) (PLA), poly(glycolide) (PGA), poly(trimethylene carbonate) (PTMC) and their copolymers have been used in many medical applications due to their biodegradability and biocompatibility [12]. The two terpolymers studied in this work are composed of the same three monomers, however they differ in the co-initiators used. Both polymers seem to recover the intended and permanent shape when the temperature is increased up to 37-40°C, which are values around the normal human body temperature. This fact is important taking into account that the polymers are designed to be used as implants [13]. The aims of this study were: i) to confirm the shape memory behavior of both polymers, processed into foils by solvent casting, ii) to study the influence of shape memory process on the surface properties of the foils and iii) to test their cytocompatibility using osteoblast-like cells. These cells were chosen because the ultimate purpose is to use scaffolds produced from these shape-memory polymers to treat bone tissue defects.

## Materials and Methods

### Materials

The terpolymers were synthesized by a ring opening polymerisation of cyclic monomers L-lactide (La), glycolide (Gl) in the presence of a previously synthesized oligomer of trimethylene carbonate (TMC) with the use of zirconium (IV) acetylacetonate as an initiator, according to a procedure earlier described in details [13,17]. The TMC oligomers adopted as one of the substrates of conducted terpolymerization were earlier obtained by ring opening polymerization of cyclic trimethylene carbonate and zinc (II) acetylacetonate as initiator with 1,4 butanediol or pentaerythriol as co-initiator. As a result of this two-step synthesis, two terpolymers were obtained: L-PLGTMC which has more linear chain structure, while B-PLGTMC is much more branched. TABLE 1 summarizes the properties of both polymers.

**TABLE 1. Monomers composition, co-initiator, theoretical and experimental glass transition temperature of two terpolymers.**

Polymer	La:Gl:TMC Composition (%) <sup>*</sup>	Co-Initiator of TMC oligomerization	Theoretical T <sub>g</sub> [°C] <sup>**</sup>	Experimental T <sub>g</sub> [°C] <sup>***</sup>
L-PLGTMC	68:11:21	1,4 Butanediol	38.5	41.5
B-PLGTMC	69:12:19	Pentaerythritol	39.9	44.5

\* The composition of terpolymers specified with <sup>1</sup>H NMR spectrometry measurement,

\*\* Theoretical Glass Transition Temperature values calculated using the Fox Equation [2],

\*\*\* Glass Transition Temperature determined with DSC method.

## Methods

The polymeric foils were prepared by solvent casting: the terpolymers solutions consisting of 10% (w/v) L-PLGTMC and 7.5% (w/v) B-PLGTMC in dichloromethane were casted on glass Petri dishes followed by drying in air and in vacuum (24 and 48 h, respectively).

The shape memory behavior of the terpolymers was quantitatively evaluated on stripes (initial size of 4 cm x 0.7 cm x 0.2 cm) obtained from the foils by a two-step procedure: deformation (at 50°C and 37°C for B-PLGTMC and L-PLGTMC, respectively, elongation strain ( $\epsilon_m$ ) = 75% of initial length) and recovery (at 40°C and 37°C for B-PLGTMC and L-PLGTMC, respectively), both in a water bath. The temporary shape was fixed at 26°C by removal of the strips from the water bath.

The atomic force microscope (AFM) was used to study terpolymers surface topography in contact mode (Thermomicroscopes, Explorer, Veeco) for scan areas of 100  $\mu$ m x 100  $\mu$ m and 300 x 300 data point. For each terpolymer on study there were six samples: top (i.e., air-cured) and bottom (i.e., glass-cured) faces for the three possible states: initial, stretched and recovered.

The water contact angles (WCA) were measured by the sessile-drop method (average UHQ-water volume of 0.25±0.02  $\mu$ l) at room temperature using an automatic drop shape analysis system (DSA 10 MK2, Kruss, Germany) and expressed as mean of at least 8 individual droplets.

For cell culture studies, terpolymers discs (1.5 cm in diameter and 0.2 cm in thickness) obtained from the prepared foils were washed in 70% ethanol, rinsed in sterile PBS and sterilized with UV radiation (20 min). MG63 osteoblast-like cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were seeded on both sides of the foils (top and bottom face) with a concentration of 25 000 cells/mL and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (PAA, Austria) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine (PAA, Austria) at 37°C in 5.0% CO<sub>2</sub> atmosphere. The bottom of 24-wells plate (Tissue Culture Polystyrene, TCPS, SPL Lifescience, Korea) acted as a control. After 1, 3 and 7 days of culture the supernatants were collected for nitric oxide (NO) assay. To study morphology of the cells adhered on the foils and evaluate cell adhesion area (AA) as well as shape factor (SF, i.e. the ratio between the length and the width of each cell) hematoxylin and eosin (H&E) staining method was used [14] (Axiovert 40, Carl Zeiss, Germany). Cell viability (MTT test [15]) was measured spectrophotometrically by the reduction of the tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to formazan by living cells using Multiscan FC Microplate Photometer Thermo Scientific. The nitric oxide (NO) concentration was evaluated by the Griess method [16] to elucidate potential cytotoxicity of the materials (Multiscan FC Microplate Photometer Thermo Scientific).

The results are shown as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Statistical analysis was performed using distribution t-test. Significant differences were assumed at  $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ .

## Results and Discussion

The shape recovery was visually observed for both terpolymers within 10 seconds, with small residual strains (FIG. 1, superior right and left corners). Thus, the strain recovery rates were received with values higher than 90% for one deformation cycle (93±2% and 92±1% for L-PLGTMC and B-PLGTMC, respectively, no significant differences between them;  $p=0.5347$ ). The values obtained are in accordance with the ones presented in the literature [4, 13, 17], with small differences associated probably to other proportions of the three comonomers, different molecular weight and applied co-initiators. These factors have an effect on the number of physical and chemical crosslinks, and thus influence the overall recovery process [18].

Water contact angles values suggest that the hydrophilicity is preserved in both terpolymers between the initial and recovered states (data not shown), constituting an advantage, since the contact angle influences the protein adsorption and consequently cell adhesion, so these changes should be predictable.

Regarding the AFM topographic pictures, it can be observed that generally for L-PLGTMC polymer the surfaces are very smooth in comparison to the results obtained for the B-PLGTMC polymer (FIG. 1, AFM Topography), which could also be verified macroscopically. In fact, the B-PLGTMC surfaces presented bigger irregularities, appearing as hills that on the initial and recovery states have an approximately spherical shape. Contrarily to the stretched state where they have an oval-like shape, which is a result of an orientation along the direction of the applied load (FIG. 1, AFM Topography of B-PLGTMC). Concerning the roughness measurement results obtained for B-PLGTMC (FIG. 1, right inferior corner), there is a difference between the average surface roughness ( $R_a$ ) values obtained for the bottom and top samples whether they are on the initial (top face is about 19 folds rougher) or recovered state (top face is about 6 folds rougher). This fact can be explained by the foil preparation method, since the bottom face was exposed to the Petri dish glass, which makes it more smoother. Comparing the initial, stretched and recovered states for bottom sample the conclusion is that the  $R_a$  value is considerably higher for the stretched state (about 23 folds more than the initial) and decreases when shape recovery takes place. The increase of roughness from the initial to the stretched state can be related to the exposition of the domains that were visible in AFM topographic pictures, as a consequence of the stretching process. The top face roughness values seem to have a lower increase from the initial to the stretched state compared to the bottom face. This fact may indicate that the roughness for this face is preserved between states.



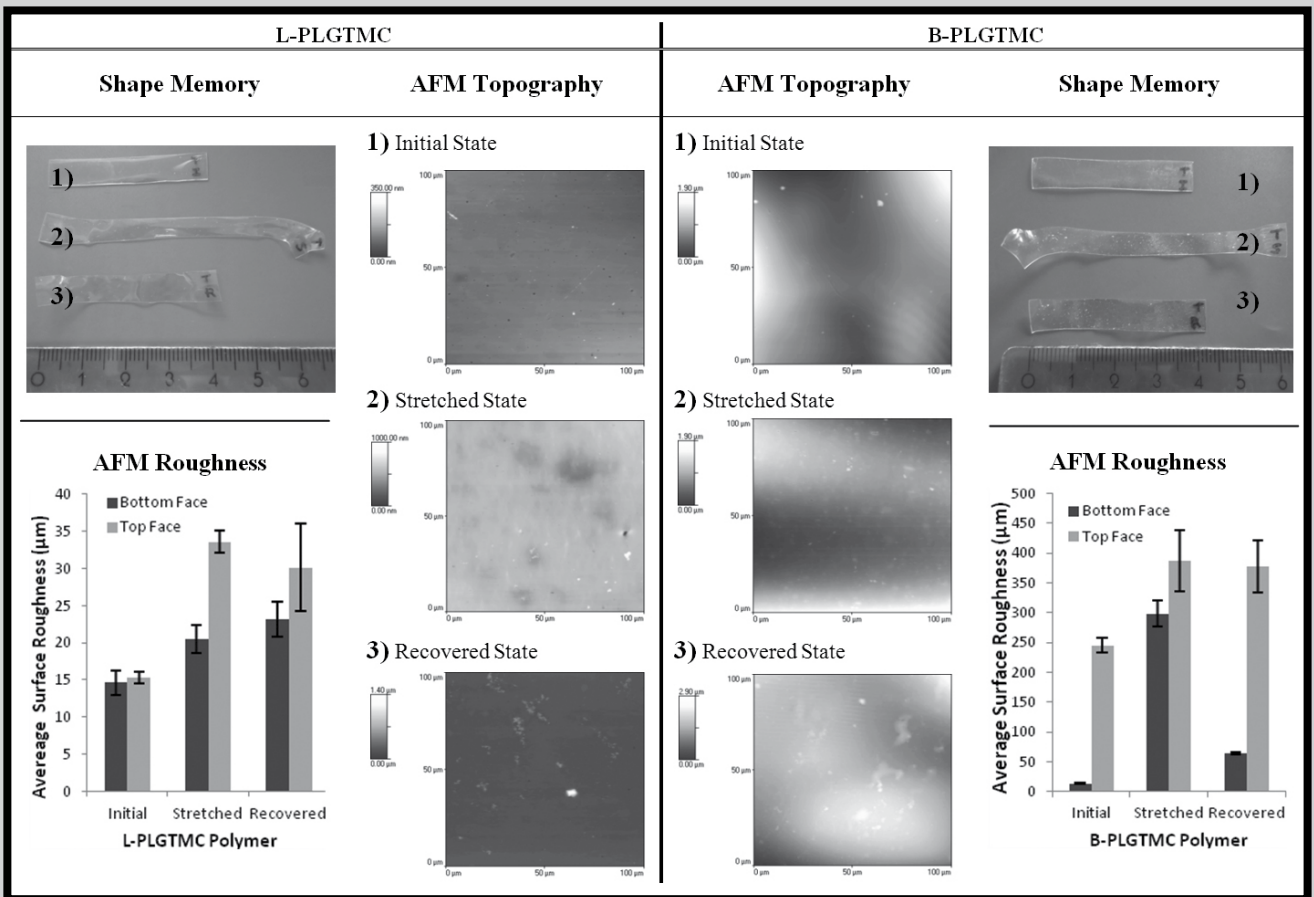


FIG. 1. Shape memory experiment on a strip of L-PLGTMC (superior left corner) and B-PLGTMC (superior right corner) for each state: the initial (1); the stretched (2); the recovered (3) (N=3), AFM Topographic images of both terpolymers (two central columns) and graphs of the average surface roughness (Ra) as a function of the three possible states: initial, stretched and recovered and the two faces: Top and Bottom for the L-PLGTMC (inferior right corner) and B-PLGTMC (inferior left corner) terpolymers (100 x 100  $\mu\text{m}^2$  scan range, N=3).

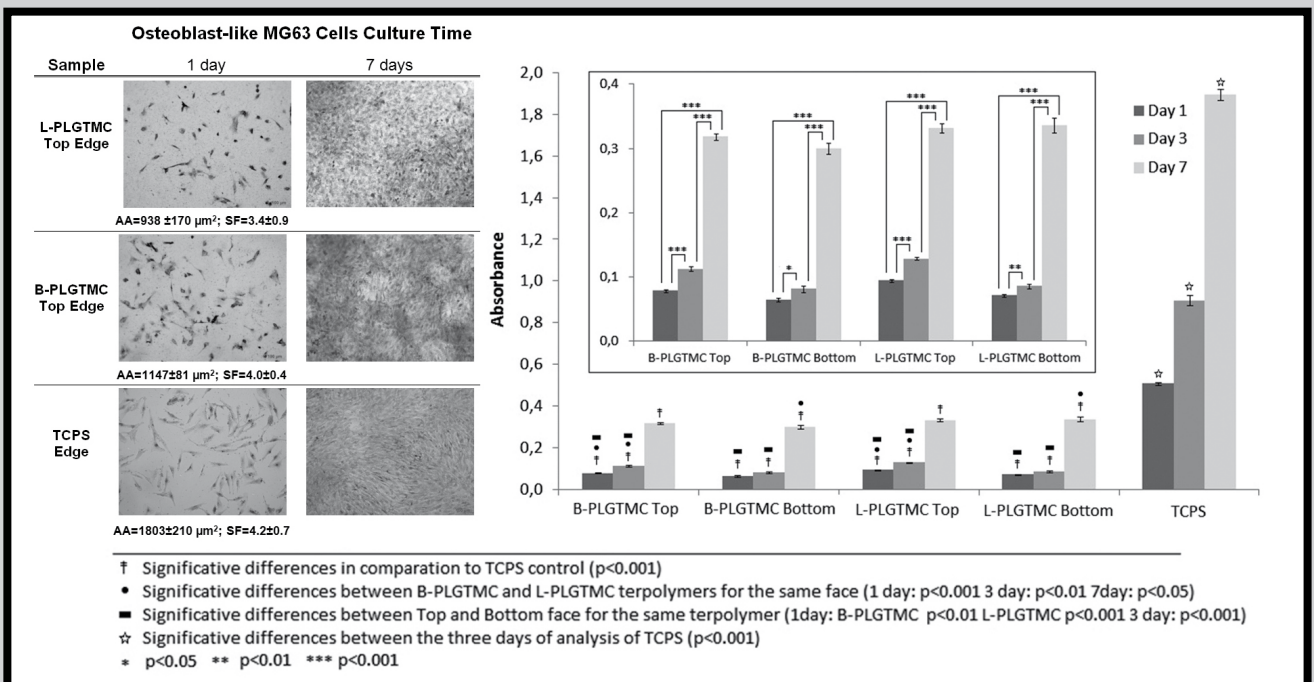


FIG. 2. Microscope images of MG63 osteoblast-like cells after culture for 1 and 7 days (H&E staining). The adhesion area (AA) and shape factor (SF) values were calculated for the 1<sup>st</sup> day of culture and are presented below the respective picture (N=11 cells for picture). The graph on the right represents the absorbance values obtained for the MTT as a function of the face (top and bottom for the L-PLGTMC and B-PLGTMC terpolymers, N=3). TCPS was used as control.

The roughness values reached after the recovery for both faces of B-PLGTMC polymer are still slightly higher than the initial  $R_a$ , showing only a partial recovery of the initial roughness. Considering now the roughness measurement results for L-PLGTMC (FIG. 1, left inferior corner), the top and bottom differences are only noticed for the stretched form. There is an increase of average roughness from the initial state to the stretched form. In addition, it appears to be a small change from the stretched to the recovered form, which shows the partial recovery of the terpolymer as it was verified during the shape memory studies.

The absorbance values obtained for the MTT assay after 1, 3, and 7 days of MG63 cell culture are presented in FIG. 2. A significant increase of absorbance values, and consequently cell number, occurred as the period of incubation increased. Therefore, on both sides of each terpolymer cell proliferated well. Nevertheless, the absorbance corresponding to L-PLGTMC and B-PLGTMC is lower than the one for TCPS ( $p < 0.001$ ), which is a material especially designed to promote cell adhesion and proliferation. For both terpolymers there was a significantly higher number of metabolically active cells on the top face than on the bottom. This can be associated to the higher degree of roughness observed on the top face, possibly creating better conditions for the cells to attach and proliferate. These differences are not visible after a seven-day culture period, which is probably a result of reaching a confluent state. Comparing both terpolymers, the differences were not so evident. If it comes to the cell morphology, the obtained pictures show that the cells effectively adhered on the surface of the terpolymers and that the confluent state was reached after 7 days, including control TCPS. Generally the cells preferred the edge of sample to the middle (data not shown). Comparing both terpolymers, on the top face of B-PLGTMC cells seem more spread and adhered than on the top face of L-PLGTMC. The first surface is the roughest and this can be explained by the fact that osteoblastic cells prefer rougher surfaces [19]. Regarding both faces, in general the top face is more populated with cells than the bottom one, which is in accordance with the MTT results (FIG. 2, MTT results). For the adhesion area analysis, the values obtained show that the cells are more spread in the order TCPS > B-PLGTMC > L-PLGTMC, however for the shape factor values, the differences are not so visible (FIG. 2, H&E staining pictures). The nitric oxide level was the same for all the samples, what also confirms that both terpolymers are not cytotoxic (data not shown).

## Conclusion

This paper confirmed the shape memory behavior of B-PLGTMC and L-PLGTMC terpolymers with high and fast shape recovery at 40°C and 37°C respectively, which are values around the normal temperature of the human body. These results along with the fact that the osteoblast-like cells adhered and proliferated well on the materials, make them good candidates for shape-memory biomaterials used in the human body, especially for bone defects treatment. The results regarding the surface properties as a consequence of shape memory process suggest that the hydrophilicity did not change considerably after recovery, however the roughness values of the recovered state were slightly higher than the initial ones.

## Acknowledgements

*This study was supported from Polish National Science Center (2011/01/B/ST5/06296).*

## References

- [1] Feninat F., Laroche G., Fiset M., Mantovani D.: Shape memory materials for biomedical applications. *Adv Eng Mater* 4(3) (2002) 91-104.
- [2] Yakackia C., Shandsa R., Lanningb C., Recha B., Ecksteina A., Gall K.: Unconstrained recovery characterization of shape-memory networks for cardiovascular applications. *Biomaterials* 28 (2007) 2255-2263.
- [3] Min C., Cui W., Bei J., Wang S.: Biodegradable shape-memory polymer — polylactide-co-poly(glycolide-co-caprolactone) multi-block copolymer. *Polym Adv Technol* 16 (2005) 608-615.
- [4] Zini E., Scandola M., Dobrzynski P., Kasperczyk J., Bero M.: Shape memory behavior of novel (L-lactide-glycolide-trimethylene carbonate) terpolymers. *Biomacromolecules* 8 (2007) 3661-3667.
- [5] Neuss S., Blomenkamp I., Stainforth R., Boltersdorf D., Jansen M., Butz N., Perez-Bouza A., Knuchel R.: The use of a shape-memory poly( $\epsilon$ -caprolactone)dimethacrylate network as a tissue engineering scaffold. *Biomaterials* 30 (2009) 1697-1705.
- [6] Baer G. M., Small W., Wilson T. S., Benett W. J., Matthews D. L., Hartman J.: Fabrication and in vitro deployment of a laser-activated shape memory polymer vascular stent. *Biomed Eng Online* 6 (2007) 43.
- [7] Ortega J. M., Small W., Wilson T. S., Benett W. J., Loge J. M., Maitland D. J.: A shape memory polymer dialysis needle adapter for the reduction of hemodynamic stress within arteriovenous grafts. *IEEE Trans Biomed Eng* 54(9) (2007) 1722-1724.
- [8] Lendlein A., Kelch S., WILEY-VCH, Germany 2002.
- [9] Leng J. S., Lan X., Liu Y. J., Du, S. Y.: Shape-memory polymers and their composites: Stimulus methods and applications. *Prog Mater Sci* 56 (2011) 1077-1135.
- [10] Sokolowski W.: Shape memory polymer foams for biomedical devices. *Open Med Dev J* 2 (2010) 20-23.
- [11] Xu X., Song J.: Thermal Responsive Shape Memory Polymers for Biomedical Applications, USA.
- [12] Davachi S.M., Kaffashi B., Mohammadi J., Roushandeh M., Torabinejad B.: Investigating thermal degradation, crystallization and surface behavior of l-lactide, glycolide and trimethylene carbonate terpolymers used for medical applications. *Mater Sci Eng C* 32 (2012) 98-104.
- [13] Smola A., Dobrzynski P., Pastusiak M., Sobota M., Kasperczyk J.: New Semi-crystalline bioresorbable materials with shape-memory properties. *Eng Biomater* 89-91 (2009) 82-87.
- [14] Fischer A. H., Jacobson K. A., Rose J., Zeller R.: Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections, Cold Spring Harb Protoc 2008.
- [15] Life Technologies, Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit, 2002.
- [16] Molecular Probes, Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (G-7921), 2003.
- [17] Smola A., Dobrzynski P., Sobota M., Pastusiak M., Kaczmarczyk B.: Preliminary tests of forming bioresorbable stent models with shape memory properties intended to use in lower respiratory tract Treatment. *Eng Biomater* 96-98 (2010) 96-98.
- [18] Ferry J. D.: Viscoelastic Properties of Polymers; John Wiley & Sons: New York, 1980.
- [19] Bacakova L., Filova E., Parizek M., Ruml T., Svorcik V.: Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 29(6) (2011) 739-67.

# GROWTH OF ANIMAL CELLS ON FLEXIBLE INTERFACE OF LIQUID FLUOROCARBON

MACIEJ PILAREK<sup>1\*</sup>, IWONA GRABOWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING, DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, UL. WARYŃSKIEGO 1, 00-645 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF BIOLOGY, INSTITUTE OF ZOOLOGY, DEPARTMENT OF CYTOLOGY, UL. MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSAW, POLAND

\* E-MAIL: PILAREK@ICHIP.PW.EDU.PL

## Abstract

*The aim of this work was to study BHK-21 fibroblasts cultured on the interfacial area of two immiscible liquids: perfluorodecalin (hydrophobic; PFD) and cell culture medium (aqueous; DMEM) what allows creating 3-D multicellular structures. We showed that the robust growth of 3-D aggregated animal cells could be achieved on flexible PFD/DMEM interfacial area. We also indicated that 3-D aggregates of BHK-21 cells could be successfully subcultured on solid hydrophobic surface and cells could migrate from those multicellular structures, spread on solid surface and further grow in typical monolayered form. Results of our experiments showed that the PFD/medium system is simple and ready-to-use method without need of any inserts traditionally used for 3-D cultures of animal cells. Formed multicellular 3-D aggregates could be directly used in the same culture system for inoculation of biomaterial elements or scaffolds.*

**Keywords:** perfluorochemical (perfluorocarbon), liquid/liquid culture system, flexible interfacial area, animal cell aggregates

[*Engineering of Biomaterials* 114 (2012) 12-14]

## Introduction

The traditional systems of in vitro culture of anchorage-dependent animal cells use solid surfaces, i.e. polystyrene dishes or flasks, as well as hydrophobic microcarriers and macroporous carriers. However, their application is strongly limited by the fact that cells grown under such conditions usually form surface-attached monolayers [1,2]. Intensive development of tissue and implant engineering involving biocompatible scaffolds testing requires new methods of in vitro culture of multicellular aggregates [3]. Insufficient cell migration into the scaffolds and limited oxygen transfer inside cell aggregates/tissue containing implants are remaining problems. Such elaborate and susceptible to hydrodynamic shear stress culture systems cannot be directly aerated by traditional ways (e.g. bubble aeration or air-lift aeration) commonly applied to cultures of suspended cells. Supplying sufficient amount of oxygen to the living multicellular or aggregated structures is essential for survival and growth of cells, otherwise necrosis occurs. In the case when in vitro cultured cells form multilayer colonies, sheets or aggregates, the oxygen supply to every cell might be a limiting factor [4,5].

Liquid perfluorochemicals (perfluorocarbons, PFCs) are synthetic, fully or partially fluorine-substituted derivatives of hydrocarbons. Such compounds are characterized by a high solubility of respiratory gases (oxygen, carbon dioxide) and other non-polar gases. Liquid PFCs have raised much interest in biomedical and technical applications [6-8]. One of the biotechnological approaches of PFCs involves culture of 3-D anchorage-dependent animal cells aggregates on a flexible liquid/liquid interfacial area created between PFC and culture medium layers [9-11]. Due to PFCs hydrophobicity and immiscibility with water animal and human cells adhere gently to the flexible PFC/medium interface, spread and create multicellular aggregates or sheets. In contrast to the traditional methods of proteolytic treatment where cell to cell junctions and also ECM are disrupted the multicellular formations can be easily collected from liquid/liquid culture system in intact 3-D forms by centrifugation or by pipetting, along with extracellular matrix elements, and their structure can be preserved during subcultivation. Thus, multicellular aggregates, produced in such a 2-phase PFC-containing system will be an ideal starting point for inoculation of a biodegradable scaffolds or implants.

The previously published data of animal cell cultures on PFC/medium surface [12,13] are brief and only indicate that cells could be cultured on flexible interface of liquid/liquid system supported with protein based layer formed between two immiscible liquids. The aim of this work was to study mammalian cells cultured on the interfacial area directly between PFC and culture medium what allows creating 3-D multicellular structures. The fibroblast cell line (BHK-21) has been chosen to study the effects of flexible interface. It has been also indicated that formed multicellular 3-D aggregates of analyzed cells could be directly used in the same liquid/liquid culture system for inoculation of biomaterial elements or scaffolds.

## Materials and Methods

### Liquid perfluorinated phase

Perfluorodecalin (PFD; C<sub>10</sub>F<sub>18</sub>; 1,1,2,2,3,3,4,4a,5,5,6,6,7,7,8,8,8a-octadecafluorodecalin; ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) was used as a liquid hydrophobic phase. PFD was sterilized by autoclaving, cooled to 37°C and additionally it was filtered using membrane filters (0.2 µm; Sartorius, Germany) to remove any microbial or solid contaminations. Then PFD was saturated by compressed air and pure oxygen in aseptic conditions [8] to obtain the oxygen concentration as 10.08 µMO<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> PFD. Such oxygen level in PFD has been determined as favourable for animal cell cultures in our previous investigations [14].

PFD created separate phase on bottom of culture dishes after pipetting. PFD was collected after experiments, recovered (first by filtration to remove solid remains and then by washing with ethanol and deionized water), and then reused after sterilization and gas saturation procedure.

### Animal cells, culture medium and inoculum preparation

The anchorage-dependent, i.e. adherent, hamster BHK-21 fibroblasts were evaluated in this work. The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (0.05 u mL<sup>-1</sup> penicillin, 0.05 u mL<sup>-1</sup> streptomycin) at 37°C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> incubator. The culture medium was also supplemented with 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as buffering agent. The culture medium, FCS, and all chemicals were obtained from Invitrogen Co. (USA) and were of animal cell culture quality.



Inoculum was prepared from standard nearly, i.e. 75-80% confluent cultures. The cells were washed with PBS (Invitrogen Co.; USA), and then they were enzymatically detached by using 0.25% trypsin (Invitrogen Co.; USA) and incubated for 2-3 minutes at 37°C. Next the cells suspended in culture medium were counted in Malassez hemocytometer (Brand, Germany) to obtain initial cell density as  $0.48 \cdot 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>. Finally, the cells were plated into the culture dishes.

### Experiment procedure

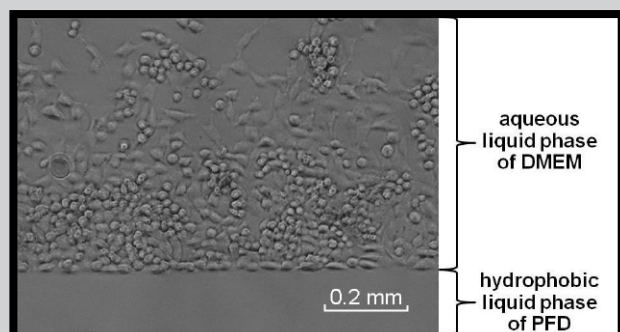
The BHK-21 cells were cultured on PFD/DMEM interface in closed and sealed 24-well plates (24-WPs) and vertically oriented 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (Becton-Dickinson, USA). 2 mL of PFD and 2 mL of DMEM have been used in 24-WPs and 6 mL of PFD and 6 mL of culture medium were poured into vertically-oriented culture flask to create flexible PFD/medium interfacial area. The cell cultures on solid surface of 24-WPs were used as reference system. In the case of reference cultures, the cells were passaged every 3-4 days. In the case of the liquid/liquid culture system cells were passaged every 3 days by simply pipette out (without trypsinization needed) used DMEM and PFD and addition of fresh liquid elements of culture system to preserve multicellular aggregates formed during experiment. At least 5 independent cultures have been performed for each variant of experiment.

The multicellular aggregates of BHK-21 cells were also passaged from PFD/DMEM interface directly onto solid surface of 24-WPs. First, almost all amount of DMEM medium has been removed out from BHK-21 cultures conducted in liquid/liquid system for 7 days. Then all phase of PFD has been gently pipetted out from culture system. The aggregates of BHK-21 cells fell down on solid surface of culture dish. Next, 2 mL of fresh DMEM were added to cells very gently to preserve the 3-D structure of BHK-21 aggregates. Such subcultured multicellular aggregates of BHK-21 cells were incubated at 37°C for next 2 days.

Cultures of cells and aggregates were monitored and digitally photographed with Eclipse TS-100/F (Nikon, Japan) inverted light microscope supported with digital camera (Nikon, Japan) and Nikon CoolView software.

## Results and Discussions

Cells of BHK-21 line which were referentially cultured on solid polystyrene surface of 24-well culture dishes had typical morphology of monolayered cells which strongly adhere to solid surface. Next, these cells were cultured on the flexible interfacial area of PFD and DMEM in the liquid/liquid culture system with the presence of air saturated and oxygen enriched liquid PFD on the bottom of each well of 24-well culture plate. FIG. 1 presents the representative image of the BHK-21 cells cultured on flexible PDF/DMEM interface.



**FIG. 1. Growth of the BHK-21 cell aggregates on flexible interfacial area formed between PFD (hydrophobic) and DMEM (aqueous) layers. The scale bar indicates 0.2 mm.**

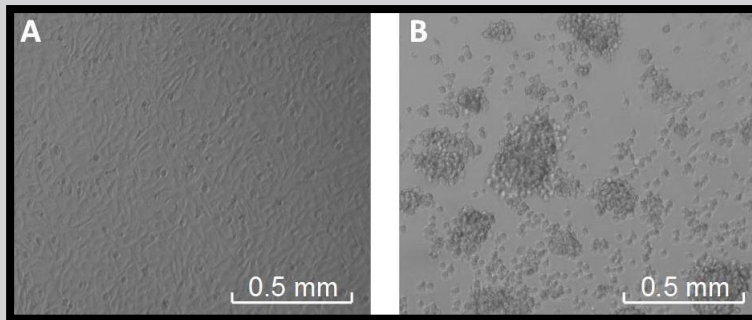
In the case of all experimental cultures on the liquid/liquid interfacial area the cells were located on the interface of two immiscible liquid phases, i.e. PFD and DMEM, at the hydrophilic side (i.e. DMEM) of the interface. Growth of none cells was noted at hydrophobic side (i.e. PFD) of interfacial area. The BHK-21 cells also grew on the culture dish walls, in the immediate vicinity of interfacial area of two immiscible liquids. The number of cells on walls diminished along the distance from the interface. The cells located on PFD/DMEM interface and on the solid walls of culture dish have been counted separately. Almost all of them were localized on the interfacial area of the PFD/PDMS system. Not more than 1% of analyzed cells grown on the solid walls, so they were neglected in further investigations. In comparison to the BHK-21 cells cultured on solid surface in the control cultures the cells which grew directly on flexible PFD/DMEM interface had isometric 3-D morphology, i.e. were closely packed in 3-D multicellular aggregates. In our studies suspension of single isometric cells was also observed after gently shaking of the liquid/liquid culture system. Just cells which attached to side-surface of culture plate were adhered and elongated, i.e. similar to cells in control cultures.

Next, we compared control BHK-21 cells cultured on solid surface and those ones cultured in flexible PFD/DMEM system (FIG. 2). Cells cultured on the flexible interface of two immiscible liquid phases did not adhere to the PFD surface but remained spherical for as long as 7 days of culture. Multicellular aggregates were formed after 48 hours of culture. Finally, over 1 mm diameter 3-D aggregates of the BHK-21 cells were visible in studied liquid/liquid system. Obtained aggregates were localized directly on the flexible interface of two contacting liquid phases of PFD and DMEM and floated if culture medium was pipetted or plate was shaken. It proves that adherent BHK-21 cells in the liquid hydrophobic/aqueous culture system grow without the attachment to the hydrophobic interface. Thus, in the case of BHK-21 cells PFD/medium system could be classified as 3-D cell culture. As a result, harvesting cells in order to analyze their viability and growth was greatly facilitated. Disintegration of aggregates to smaller pieces or single cells could be easily obtained by simply shaking or pipetting of culture before sample harvest. So, the enzyme-mediated detachment of aggregated BHK-21 cells was unnecessary in the case of culture them in the presented PFD/medium system.

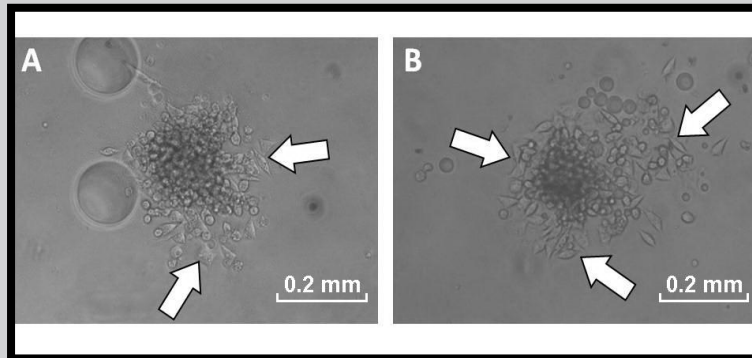
The morphology of BHK-21 cells observed in this study is in accordance with results obtained for mouse-derived L-929 fibroblasts cultures on layer of liquid perfluorinated amines previously presented by Shiba et al. [12]. Shiba et al. did not use PFCs saturated with any gas and the growth of L-929 was rather minor and strongly limited to small aggregates consisting of few cells. Rappaport [13] reported more traditional monolayered morphology of human liver carcinoma HepG2 cells cultured on layer of perfluorinated aldehyde. But in the case of Rappaport's study the cells were cultured not directly on layer of liquid PFC but on thin layer of collagen covering the flexible interfacial area of PFC/medium system.

To document that morphology changes of aggregated cells in PFD/DMEM system are fully reversible we checked the ability of cells forming aggregates on layer of PFD to be grown on solid surface. To address this issue the multicellular aggregates of BHK-21 cells were passaged from PFD/DMEM interface directly onto solid surface of 24-WPs. The aggregates of BHK-21 cells fell down on solid surface of culture dish after gently pipetted out of PFD from culture system. Microscopic analysis performed after 24 hours revealed that BHK-21 cells located in the middle of aggregates retained their 3-D spherical morphology. But some of the cells located near the edge of aggregates became flatten, elongated and started to adhere to solid surface (FIG. 3).





**FIG. 2. Morphology of the BHK-21 cells (4<sup>th</sup> day of cultures): typical monolayer of cells in control culture on solid surface (A) and 3-D multicellular aggregates in control on flexible interfacial area of the PFD and DMEM layers (B). The scale bars indicate 0.5 mm.**



**FIG. 3. Morphology of the BHK-21 cells after subcultivation of 3-D aggregates from the PFD/DMEM interface onto the solid surface: 12 (A) and 24 (B) hours after transfer. The typically elongated fibroblasts migrated from the multicellular aggregates which adhered to the bottom of 24-well plate have been marked with arrows. Closely packed 3-D aggregated BHK-21 cells remained inside the multicellular aggregates. The scale bars indicate 0.2 mm.**

Such effect has not been discussed previously by any published data concerning the results of animal cells cultured on layer of liquid PFC [12,13].

## Conclusions

Based on our observations we conclude that the proposed flexible interfacial area of PFD/DMEM culture system may have practical application in cultures of multicellular aggregates or single or in any animal cell cultures where the 3-D structure of cells/aggregates should be retained. The PFD/medium system is simple and ready-to-use method without need of any inserts traditionally used for 3-D cultures of animal cells and also without any needed coating or supporting of the liquid/liquid interfacial area. We have also revealed the fully reversible morphology changes of 3-D aggregated BHK-21 fibroblasts cultured on flexible interface of PFD and ability of such aggregates to undergo the changes in morphology and their further growth on solid surface.

To sum up, the robust growth of 3-D aggregated animal cells could be achieved on flexible PFD/DMEM interfacial area. We have concluded that hypothetical benefit of the PFC/medium system is a possibility to use them directly for testing and improving of cell growth on any solid biomaterial examined for use as scaffolds. For example, the two-phase liquid/liquid system culture system could be used as simple device for culture of multicellular aggregates of chondrocytes or osteoblasts. Formed multicellular 3-D aggregates could be directly used in the same culture system for inoculation of biomaterial elements or scaffolds. Then after migration of cells from aggregate onto solid surface of scaffold such implant could be in vitro or in vivo analyzed.

## Acknowledgments

*This work was partially supported by MNT-ERA.NET Project "ArtiCart" financed by The National Centre for Research and Development (NCBiR; Poland).*

## References

- [1] Thomson H.: Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery. *Trends in Biotechnology* 25 (2007) 224-230.
- [2] Ulloa-Montoya F., Verfaillie C.M., Hu W.: Culture Systems for Pluripotent Stem Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (2005) 12-27.
- [3] Piersma A.H.: Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. *Toxicology Letters* 149 (2004) 147-153.
- [4] Fassnacht D., Portner R.: Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed-bed reactors. *Journal of Biotechnology* 72 (1999) 169-184.
- [5] Harrison S., Eberli D., Lee S.J., Atala A., Yoo J.J.: Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. *Biomaterials* 28 (2007) 4628-4634.
- [6] Riess J.G.: Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology* 34 (2006) 567-580.
- [7] Pilarek M., Glazyrina J., Neubauer P.: Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures. *Microbial Cell Factories* 10 (2011) 50.
- [8] Pilarek M., Szewczyk K.W.: Effects of perfluorinated oxygen carrier application in yeast, fungi and plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal* 41 (2008) 38-42.
- [9] Pilarek M., Neubauer P., Marx U.: Biological cardio-micro-pumps for microbioreactors and analytical micro-systems. *Sensors and Actuators B: Chemical* 156 (2011) 517-526.
- [10] Lowe K.C.: Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems. *Journal of Fluorine Chemistry* 118 (2002) 19-26.
- [11] Pilarek M., Szewczyk K.W.: Perfluorochemicals as liquid vectors of respiratory gases used in medicine and biotechnology. *Biotechnologia (in Polish)* 69 (2005) 125-150.
- [12] Shiba Y., Ohshima T., Sato M.: Growth and morphology of anchorage-dependent animal cells in liquid/liquid interface system. *Bioeng.* 57 (1998) 583-589.
- [13] Rappaport C.: Review - Progress in concept and practice of growing anchorage-dependent mammalian cells in three dimension. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 39 (2003) 187-192.
- [14] Pilarek M., Kaczmarczyk M., Olak S., Grabowska I., Szewczyk K.W.: Cultures of 3-D aggregated mammalian cells in a two-phase liquid/liquid system containing perfluorinated carrier of respiratory gases. *Acta Biochimica Polonica* 58 Supplement 4 (2011) 5.

# SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA BIORESORBOWALNYCH TERPOLIMERÓW L-LAKTYDU/GLIKOLIDU/BURSZTYNIANU BUTYLU WYKAZUJĄCYCH PAMIĘĆ KSZTAŁTU

NATALIA ŚMIGIEL<sup>1</sup>, ANNA SMOLA<sup>2</sup>, HENRYK JANECZEK<sup>2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT CHEMII, OCHRONY ŚRODOWISKA I BIOTECHNOLOGII, AKADEMIA JANA DŁUGOSZA W CZĘSTOCHOWIE, AL. ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-200 CZĘSTOCHOWA

<sup>2</sup> CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN, UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE

\* E-MAIL: PDOBZYNSKI@CMPW-PAN.EDU.P

## Streszczenie

*W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań nad otrzymywaniem i charakterystyką nowych bioresorbowalnych terpolimerów laktydu/glikolidu/bursztynianu butylu. Łańcuchy otrzymanych terpolimerów zawierały alifatyczne mikrobloki estrowe - bursztynianu butylenu i laktydylu, zapewniające temu materiałowi własność zapamiętywania kształtu. Scharakteryzowano własności i składy otrzymanych materiałów, oceniono parametry zapamiętywania kształtu. Na podstawie przedstawionych wyników wstępnych badań można oba materiały określić, jako perspektywiczne w zastosowaniach biomedycznych i wydaje się celowym kontynuacja badań nad ich syntezą, charakterystyką i aplikacją.*

**Słowa kluczowe:** bioresorbowalne polimery, poliestry alifatyczne, pamięć kształtu, ROP

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 15-20]

## Wprowadzenie

Biodegradowalne materiały polimerowe otrzymywane w reakcjach kopolimeryzacji laktydów i glikolidu ze względu na swoje specyficzne właściwości są powszechnie stosowane w wielu obszarach życia. Bardzo cennym okazało się zastosowanie biokompatybilnych i biodegradowalnych kopolimerów w medycynie, jako materiału w formowaniu nośników leków, w procesie ich kontrolowanego uwalniania, tymczasowych implantów i podłoży komórkowych do zastosowań w inżynierii tkankowej [1]. Bardzo interesującą własnością niektórych biodegradowalnych polimerów jest pamięć kształtu [2,3]. To zjawisko, wyraźnie poszerza zastosowanie tego typu materiałów, o szczególnie obiecujące w technice chirurgii małoinwazyjnej, bioresorbowalne urządzenia - implanty reagujące na bodźce termiczne. W pracy przedstawiono możliwość otrzymywania kopolimerów z pamięcią kształtu zawierających w strukturze łańcucha, obok typowych jednostek laktydylowych i glikolidylo- wych dłuższe segmenty bursztynianu butylenu. Segmenty te powodują duże uelastycznienie otrzymanego materiału i zmniejszenie jego hydrofobowości. Poli(bursztynian butylenu) (PBS) jest podobnie, jak najbardziej popularne w zastosowaniach biomedycznych polilaktydy czy kopolimery laktydu z glikolidem, poliestrem alifatycznym w pełni biodegradowalnym i biokompatybilnym [4,5].

# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BIORESORBABLE L-LACTIDE/GLYCOLIDE/BUTYLENE SUCCINATE TERPOLYMERS WITH SHAPE MEMORY BEHAVIOR

NATALIA ŚMIGIEL<sup>1</sup>, ANNA SMOLA<sup>2</sup>, HENRYK JANECZEK<sup>2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF CHEMISTRY, ENVIRONMENTAL PROTECTION AND BIOTECHNOLOGY, JAN DŁUGOSZ UNIVERSITY IN CZESTOCHOWA, AL. ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-200 CZESTOCHOWA, POLAND

<sup>2</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, UL. M. CURIE SKŁODOWSKIEJ 34, 41-800 ZABRZE, POLAND

\* E-MAIL: PDOBZYNSKI@CMPW-PAN.EDU.PL

## Abstract

*The paper presents the preliminary results on the synthesis and characterization of new bioresorbable terpolymers of lactide/glycolide/butyl succinate. The chains of obtained terpolymers were built of butylene succinate and lactidyl microblocks, which endow this material with shape memory behavior. The method of synthesis, the properties and composition of the obtained terpolymers, and shape memory parameters are described in the article. On the basis of the results of preliminary studies, the obtained material appears applicable for biomedical applications, and it seems advisable to continue research on their synthesis, characterization and application.*

**Keywords:** bioresorbable polymers, aliphatic polyester, shape memory behavior, ROP

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 15-20]

## Introduction

Biodegradable polymeric materials obtained in the process of copolymerization of lactides and glycolide due to the specific properties are widely used in many areas of biomedicine. Biocompatible and biodegradable copolymers proved useful for application in medicine, as materials for drug carriers formation in the process of controlled drug release, temporary implants used in surgery and scaffolds for application in tissue engineering [1]. A very interesting property of some biodegradable polymers is their shape memory behavior [2,3]. This phenomenon clearly extends the application possibilities of such materials. Application of bioresorbable devices - implants responsive to thermal stimuli, is particularly essential for minimally invasive surgical techniques. The present paper demonstrates the possibility of obtaining terpolymers with shape memory properties containing butylene succinate (BS) microblocks in their chains, besides the lactidyl segments and glycolidyl units. The BS blocks guarantee great flexibility of the resulting material and decrease its hydrophobicity. Poly(butylene succinate) (PBS) is similar to fully biodegradable and biocompatible aliphatic polyesters commonly used in biomedical applications, such as polylactides or copolymers of lactide with glycolide [4,5].

W dotychczasowych publikowanych badaniach, ze względu na duże różnice we własnościach fizycznych, elastyczności łańcucha i przebiegu biodegradacji, wykazano bardzo interesujące własności fizykochemiczne blend polilaktydu i PBS, czy kopolimerów blokowych LA/BS [6] szczególnie przydatne w zastosowaniach tego materiału w kontrolowanym uwalnianiu leków, czy formowaniu bioresorbowalnych implantów o dużej elastyczności.

## Materiały i metody

### Materiały

L-laktyd, glikolid (Purac Biomaterials) wstępnie oczyszczano poprzez rekrytalizację z roztworu octanu etylu, następnie suszono w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej. Acetylacetonian cyrkonu (IV) (Aldrich Corp.), 1-4-butanediol (Aldrich Corp.), alkohol metylowy, chloroform (Poch Gliwice), bursztynian dimetylu 98% (SAFC, USA) oraz butanolan tytanu(IV) 97% (Aldrich Corp.) użyto w postaci handlowej.

### Synteza oligomeru BS

Synteza oligomeru bursztynianu butylenu polegała na transestryfikacji diestru metylowego kwasu bursztynowego z 1,4-butanediolem, prowadzono ją przy 7% nadmiarze molowym diolu. Reakcję przeprowadzono dwuetapowo w stopie, w reaktorze zaopatrzonym w układ destylacyjny, wydajne mieszanie, doprowadzenie argonu i podłączonego do pompy próżniowej. Jako katalizator transestryfikacji zastosowano  $Ti(OC_4H_9)_4$ . W pierwszym etapie reakcji, zawartość reaktora stopiono i ogrzewano pod poduszką argonu, w temperaturze 150°C do momentu całkowitego oddestylowania wydzielającego się produktu ubocznego zachodzącej transestryfikacji – alkoholu metylowego. W etapie drugim obniżono ciśnienie poniżej 100 mb i stopniowo podnoszono temperaturę do 200°C. W tej temperaturze zawartość reaktora ogrzewano przez następne 3 godziny, kontrolując lepkość inherentną powstającego produktu i odbierając powstający w trakcie prowadzonego procesu 1,4-butanediol. Gdy lepkość inherentna produktu wynosiła około 0,08 dL/g, co odpowiadało założonej masie molowej produktu – około 4 kD [7], zakończono syntezę. Produkt rozpuszczono w chloroformie i oczyszczono przez wytrącanie z zimnego metanolu. Suszono do stałej masy w suszarce próżniowej.

### Przebieg terpolimeryzacji

Terpolimery otrzymano na drodze kopolimeryzacji otwarcia pierścienia (ROP) cyklicznych monomerów L-laktydu, glikolidu, w obecności wcześniej otrzymanego oligomeru BS, zakończonego grupami hydroksylowymi. Kopolimeryzację prowadzono w stopie, w temperaturze 120°C, w obecności  $Zr(acac)_4$  jako inicjatora (I/M = 1:1200). Reakcję prowadzono pod poduszką argonu w zamkniętym reaktorze szklanym zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne. Otrzymane terpolimery oczyszczano poprzez rozpuszczenie w chloroformie i wytrącanie w zimnym metanolu. Próbki suszono w próżni, w temperaturze pokojowej i poddawano dalszym badaniom.

### Otrzymanie kształtek do badania pamięci kształtu

Kształtki do badania pamięci kształtu otrzymano formując je poprzez prasowanie na gorąco, na prasie hydraulicznej w temperaturze około 180°C i pod ciśnieniem ponad 2 MPa. Otrzymane płytki pocięto na prostokątne paski o wymiarach 50 mm x 10 mm x 0,4 mm.

As described in previously published studies, significant differences in physical properties (chain flexibility and biodegradation profile) between PLA and PBS, some very interesting physicochemical properties of PLA/PBS blend or block copolymers of were revealed [6]. These polymeric materials appear to be particularly useful for controlled release of drugs, or during formation of bioresorbable implants with high flexibility.

## Materials and synthesis methods

### Materials

L-Lactide, glycolide (Purac Biomaterials) were purified by recrystallization from ethyl acetate solution, then dried in a vacuum oven at room temperature. Zirconium(IV) acetylacetonate (Aldrich Corp.), 1-4-butanediol (Aldrich Corp.), methyl alcohol, chloroform (Poch Gliwice), dimethyl succinate 98% (SAFC, USA) and titanium(IV) butoxide 97% (Aldrich Corp.) were applied in commercial form.

### Synthesis of BS oligomer

Synthesis of polyester was carried out by transesterification of methyl diester of succinic acid with 1,4-butanediol catalyzed with  $Ti(OC_4H_9)_4$ . The reaction was conducted at 7% molar excess of diol in bulk with two stages. The reaction vessel was equipped with a distillation system, efficient mixing, supply argon and connected to a vacuum pump. During the first stage of the reaction, the reactor content was melted and heated under argon pillow at 150°C until complete distillation of evolved by-product (methyl alcohol). During the second stage, the reactor was connected to vacuum (pressure below than 100 mbar) and temperature was gradually raised to 200°C. At this temperature, the reactor contents were heated for 3 hours, constantly controlling the inherent viscosity of the resulting product and collecting arising butyndiol. When the inherent viscosity of the product was about 0.08 dL/g, corresponding to the assumed molecular weight of the product - about 4 kD [7], the synthesis was finished. The product was dissolved in chloroform and purified by precipitation from cold methanol and then dried to constant weight in a vacuum oven.

### Terpolymerization reaction

Terpolymers were obtained by ring opening copolymerization (ROP) of cyclic monomers; L-lactide, glycolide and in the presence of previously synthesized BS oligomer, the chain of which was terminated with hydroxyl groups. The terpolymerization was carried out in the melt at 120°C in the presence of  $Zr(acac)_4$  as initiator (ratio I/M = 1:1200) under argon in a sealed glass reactor equipped with a magnetic stirrer. The obtained product was purified by dissolving in chloroform and then precipitation in cold methanol. Samples were dried under vacuum at room temperature and subjected to further testing.

### Receipt of molders to study the shape memory

Samples for shape memory tests were obtained with hot molding, on hydraulic press at 180°C, under pressure of more than 2 MPa. Obtained plates were cut into smaller strips (dimensions 50 x 10 x 0.4 mm).

### Method of investigation

The composition and chain microstructure of the terpolymers were determined on the basis of NMR analysis conducted with Bruker Avans (600 Mhz) spectrometer, where deuterated chloroform was used as solvent.



## Metoda badań

Skład i mikrostrukturę łańcucha terpolimerów oznaczono na podstawie pomiarów protonowego rezonansu jądrowego NMR wykonanych z pomocą spektrometru Bruker Avans (600 Mhz). Jako rozpuszczalnik użyto deuterowanego chloroformu. Średnią liczbowo masę cząsteczkową ( $M_n$ ) i rozrzut mas cząsteczkowych ( $D$ ) oznaczono za pomocą chromatografii żelowej GPC stosując aparat Viscotek Rimax (chloroform, temperatura 35°C, przepływ 1 mL/min, zastosowano 2 kolumny Viscotek 3580, detektor refrakcyjny, kalibracja z wykorzystaniem standardów polistyrenowych).

Lepkość inherentną oligomeru PBS wyznaczano z pomocą wiskozymetru Ubbelohde (Pollena, nr kapilary I,  $K=0,00750$ ), w temperaturze 25°C w chloroformie.

Analizę termiczną metodą różnicowej kalorymetrii skaninowej DSC prowadzono na aparacie DSC Du Pont 1090B (kalibracja galem i indem, szybkość grzania 20°C/min).

W celu podstawowego scharakteryzowania termicznego efektu pamięci kształtu mierzono czas powrotu kształtki do kształtu pierwotnego ( $t_p$ ) oraz stopień powrotu ( $k\%$ ) (stosunek zmierzonej długości kształtki po powrocie do długości kształtki mierzonej przed deformacją). Kształtki rozciągano o 50% długości w temperaturze 38°C. Kształt przejściowy utrwalał się poprzez ochłodzenie w temperaturze pokojowej. Po ponownym umieszczeniu kształtki w łaźni wodnej, w temperaturze ciała ludzkiego 37°C, obserwowano przebieg procesu powrotu do wyjściowego kształtu permanentnego.

## Wyniki i dyskusja

Pierwszy etap otrzymania terpolimeru L-Laktyd/glikolid/bursztynianu butylenu polegał na syntezie oligomeru bursztynianu butylenu, o łańcuchu zakończonym grupami hydroksylowymi. W tym celu syntezę prowadzono przy 7% mol. nadmiarze stechiometrycznym butandiolu, a postęp reakcji kontrolowano mierząc lepkość inherentną tworzącego się PBS. RYS. 1 przedstawia widmo  $^1\text{H}$  NMR otrzymanego oligomeru. Na podstawie otrzymanego widma, w wyniku analizy grup końcowych, wyznaczono masę molową oligomeru. Otrzymany poliester wykazywał dużą semikrystaliczność. Wyznaczono temperaturę zeszklenia  $T_g$ , temperaturę topnienia  $T_m$  oraz ciepło topnienia  $\Delta H$  fazy krystalicznej otrzymanego oligomeru. Wyniki przedstawiono w TABELI 1.

Average number molar mass ( $M_n$ ) and molar mass dispersity ( $D$ ) were determined by gel permeation chromatography GPC (Viscotek apparatus Rimax, chloroform, temperature 35°C, flow 1 mL/min, using two Viscotek 3580 columns, refractive detector, calibration with polystyrene standards).

The inherent viscosity of the PBS oligomer was determined using Ubbelohde viscometer (Pollena, capillary number I,  $K=0,00750$ ) at 25°C in chloroform.

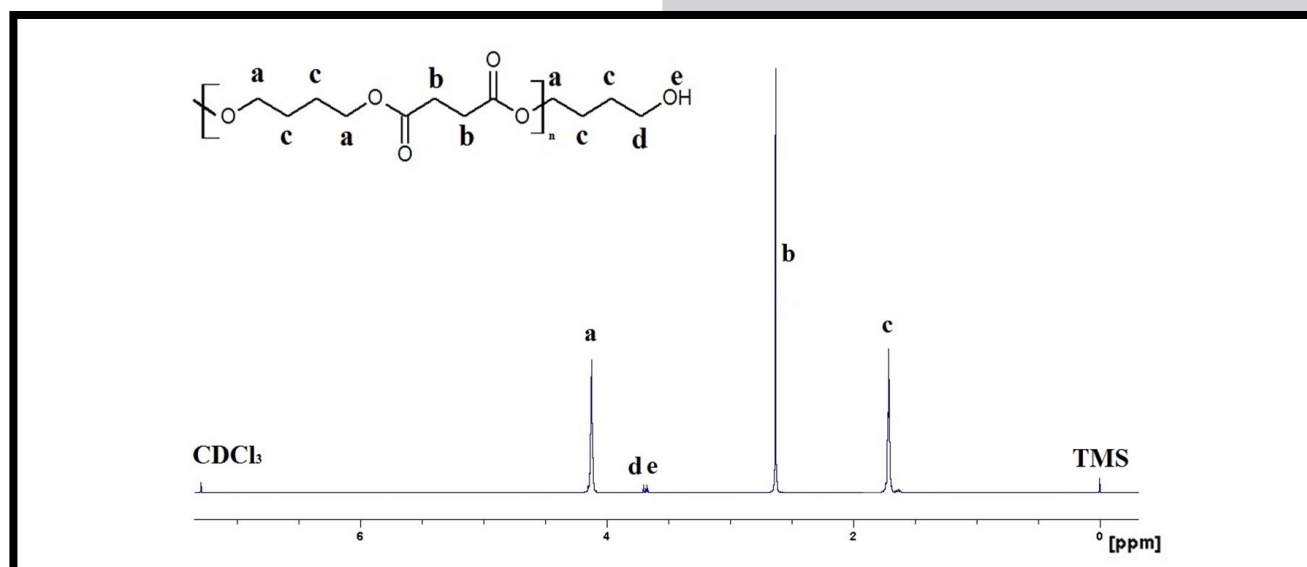
In order to characterize the basic shape memory effect the time required to return to original shape ( $t_p$ ) and the degree of return ( $k\%$ ) (the ratio of the measured length of the strip after restoring to the length measured before the deformation) were measured. The plates were stretched to 50% of the original length at 38°C. The resulting deformed temporary shape of samples has been fixed by cooling at room temperature. The strip was then again placed in water bath at temperature of human body 37°C, after which the process of regaining the previous shape took place.

## Results and Discussion

The first stage of L-Lactide/glycolide/butylene succinate terpolymer synthesis consisted of manufacturing butyl succinate oligomer (PBS), whose chain was terminated with hydroxyl groups. For this purpose, the synthesis was carried out at 7% mol. butanediol stoichiometric excess, and the reaction progress was monitored by measuring the inherent viscosity of the resulting of PBS. FIG. 1 presents the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the obtained oligomer. On the basis of the spectrum, molar mass of synthesized oligomer was determined by analysis of end groups. The resulting polyester demonstrated high semi-crystallinity degree. The glass transition temperature  $T_g$ , melting temperature  $T_m$  and heat of fusion  $\Delta H$  crystalline phase of the resulting oligomer were measured and are included in TABLE 1.

**TABELA 1. Charakterystyka otrzymanego oligomeru.**  
**TABLE 1. Characteristics of obtained oligomer PBS.**

$M_n$ [Da]	$T_g$ [°C]	$T_m$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
4000	-27.5	115.6	79.2



**RYS. 1. Widmo  $^1\text{H}$  NMR otrzymanego oligomeru PBS.**  
**FIG. 1.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the oligomer PBS.**

Otrzymany oligomer BS, wykorzystano następnie, jako jeden z substratów w syntezie terpolimerów. Naszym zamierzeniem było otrzymanie terpolimerów z pamięcią kształtu o temperaturze zeszklenia zbliżonej do temperatury ciała ludzkiego, co raczej gwarantuje, że potencjalna temperatura powrotu takiego materiału z nadanego kształtu tymczasowego do permanentnego jest bliska temperaturze ciała [8,9]. W tym celu odpowiednio dobrano skład mieszaniny reakcyjnej, korzystając z równania Foxa [10] i znajomości temperatur zeszklenia poli(L-laktydu), poli(glikolidu) i zsyntezowanego oligomeru PBS. Zsyntezowano dwie serie terpolimerów L-Laktyd/glikolid/bursztynian butylenu, których skład i właściwości zebrano w TABELI 2. Otrzymane terpolimery miały skład bardzo zbliżony do składu wyjściowej mieszaniny reakcyjnej. Skład terpolimerów obliczono na podstawie uzyskanych widm  $^1\text{H NMR}$ , przedstawionych na RYS. 2. Terpolimery charakteryzowały się jednak masą cząsteczkową znacznie niższą od oczekiwanej teoretycznie.

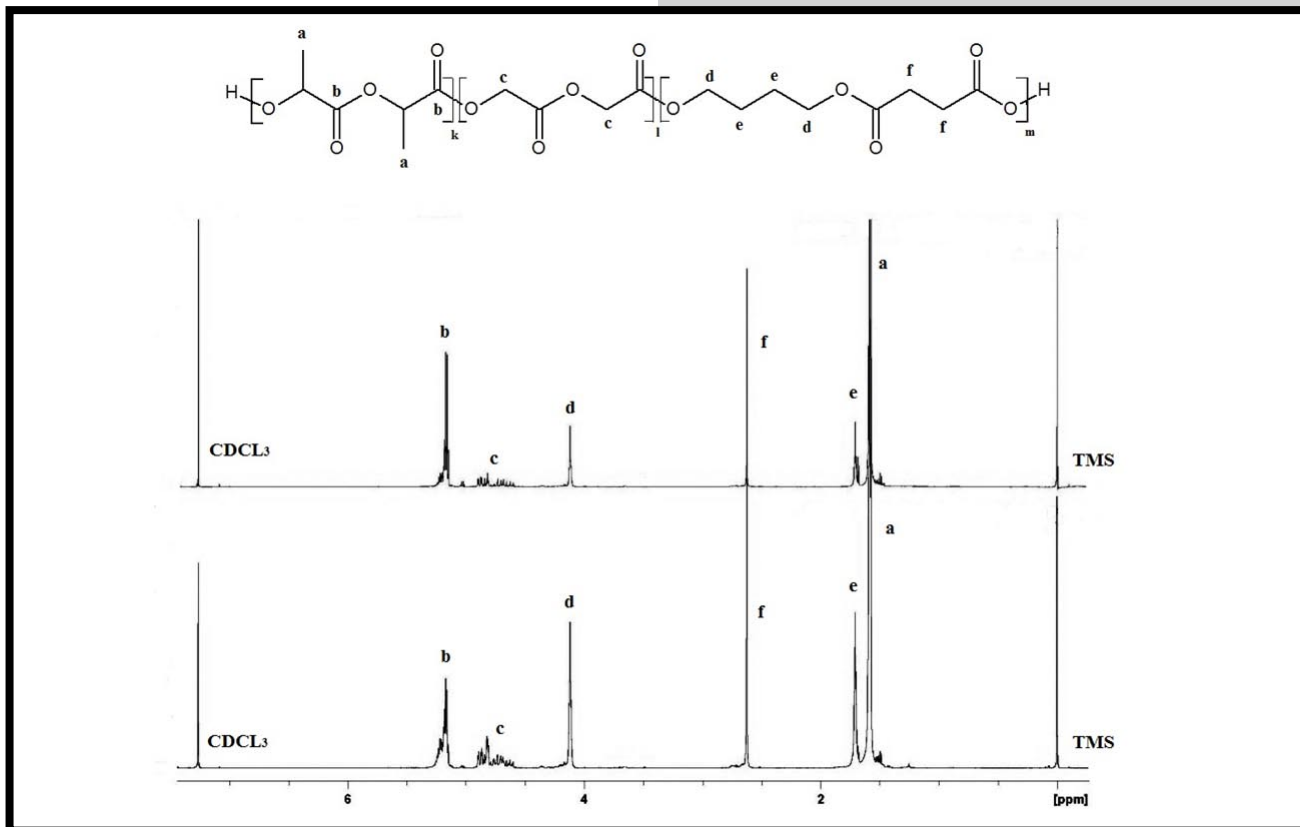
The obtained BS oligomer was used as one of the substrates in the synthesis of terpolymers. Our intention was to obtain shape memory terpolymers with glass transition temperature close to human body temperature, which ensures that the potential temperature of return from assigned temporary to permanent shape is close to body temperature [8,9]. For this purpose we selected the initial composition of the reaction mixture, using the Fox equation [10] and basing on the knowledge of the glass transition temperature of poly(L-lactide), poly(glycolide) and the synthesized oligomer PBS. Two series of L-lactide/glycolide/butylene succinate terpolymers were synthesized. The composition and properties are summarized in TABLE 2. The composition of the obtained terpolymers was very similar to the composition of the starting mixture. The composition of terpolymers was calculated on the basis of the  $^1\text{H NMR}$  spectra, shown in FIG. 2. However, molar mass of both products were much lower than theoretically expected.

**TABELA 2. Charakterystyka otrzymanych terpolimerów i ich własności zapamiętywania kształtu.**  
**TABLE 2. Characteristic of obtained terpolymers and parameters of the shape memory effect.**

No. Nr próbki	Założony skład terpolimeru Started composition of reaction mixture [% w.]	Rzeczywisty skład terpolimeru Composition of terpolymer [% w.]	Wydajność reakcji Yield [%]	$M_w$ [Da]	D	$T_{gt}$ [°C]	$T_g$ [°C]	$t_p$ [s]	k [%]
NS 1	L-La 77/GI 09/PBS 14	L-La 74/ GI 10/BS 16	96	43 000	2.8	42	39	180	98
NS 2	L-La 64/ GI 17/PBS 19	L-La 57/ GI 18 /BS 25	95	30 000	2.6	29	25	180	92

$M_w$  – średnio wagowa masa molowa, D – dyspersja mas molowych,  $T_{gt}$  - temperatura zeszklenia wyliczona z równania Fox'a,  $T_g$  – temperatura zeszklenia,  $t_p$  – czas powrotu kształtki z kształtu tymczasowego do permanentnego, k – stopień powrotu do kształtu tymczasowego. Stopień deformacji z kształtu permanentnego do tymczasowego wynosił 50%.

$M_w$  - weight average molecular weight, D - dispersion of molecular weights,  $T_{gt}$  – glass transition temperature calculated with Fox equation,  $T_g$  - glass transition temperature,  $t_p$  - the recovery time, k - the ratio of return to the temporary shape. The ratio of deformation was 50%.



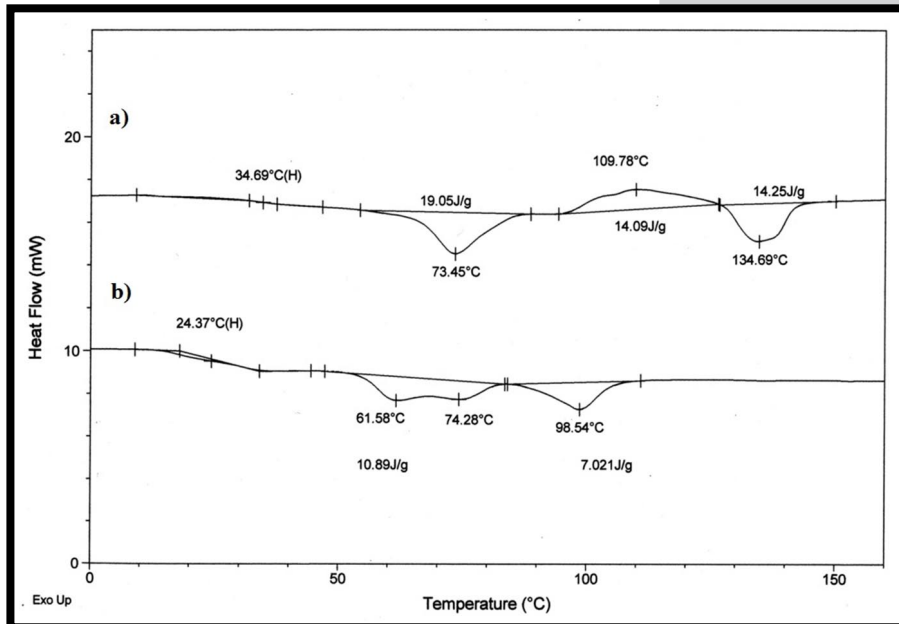
**RYS. 2. Widmo  $^1\text{H NMR}$  terpolimerów NS1 i NS2.**

**FIG. 2.  $^1\text{H NMR}$  spectra of the terpolymers NS1 and NS2.**

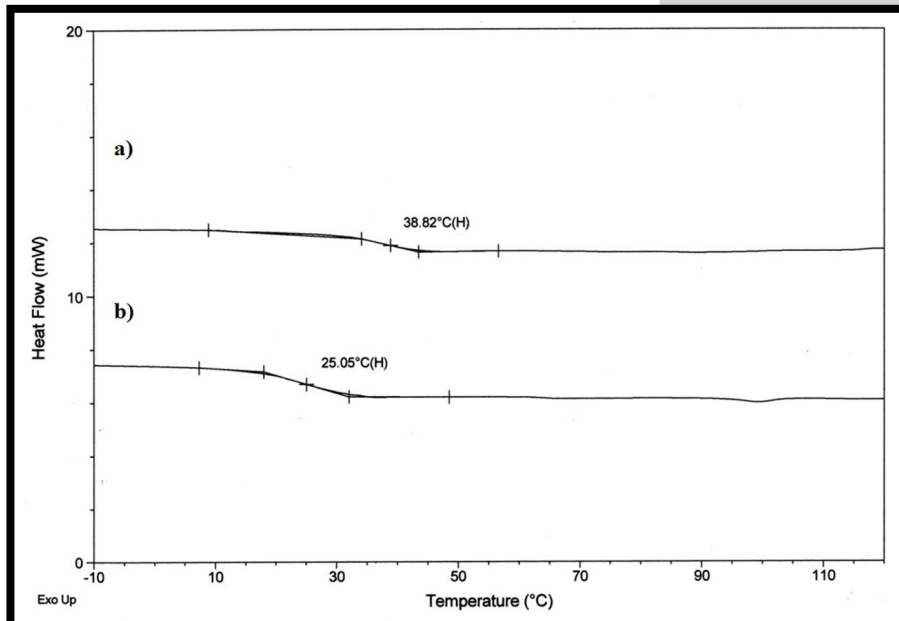
RYS. 3 przedstawia termogramy DSC próbek NS1 i NS2 otrzymane przy szybkości ogrzewania 20°C/min i pierwszym przebiegu. W wypadku analizy próbki NS1 zaobserwowano przejście z fazy szklistej w 35°C, proces topnienia fazy krystalicznej w 74°C, krystalizację kolejnej fazy krystalicznej z maksimum przy 110°C, a następnie endotermę topnienia tej fazy w 134,7°C. Natomiast dla drugiego terpolimeru NS2 obserwuje się temperaturę zeszklenia około 24°C, szeroką endotermę topnienia z dwoma maksimami przy 62°C i 74°C a następnie kolejną endotermę topnienia przy 99°C. Obserwowana egzoterma krystalizacji i endoterma topnienia związane są z krystalizacją i topieniem obszarów krystalicznych, prawdopodobnie związanych z obecnością dłuższych mikrobloków laktydylowych. W wypadku próbki NS2, zawartość laktydylu była niższa, co spowodowało, iż długość tworzonych mikrobloków laktydylowych była zbyt mała, aby utworzyć domeny uporządkowane. Pomimo tego, obecność ciepła topnienia  $\Delta H = 19\text{J/g}$  dla NS1 i  $\Delta H = 17\text{J/g}$  dla NS2 sugeruje, że oba materiały wykazują semikrystaliczność. Zjawisko to związane jest z obecnością domeny krystalicznej powstałej w wyniku uporządkowania mikrobloków bursztynianu butylenu.

FIG. 3 shows the calorimetric thermograms for NS1 and NS2 sample. The two calorimetric traces at heating rate 20°C/min are plotted. During the first heating scan at 20°C/min the following transitions are observed for NS1 sample: glass transition at 35°C, melting process at 74°C, cold crystallization exotherm with maximum at 110°C and melting endotherm with maximum at 135°C.

The second sample NS2 heated at 20°C/min shows the glass transition temperature at 24°C, broad melting endotherm with two maxima at 62°C and 74°C and next melting endotherm at 99°C. The observed crystallization exotherm and melting endotherms are connected with the crystallization and then melting of one of the terpolymer lactidyl microblocks. Melting enthalpies  $\Delta H=19\text{J/g}$  for NS1 and  $\Delta H=17\text{J/g}$  for NS2 suggest that the initial sample demonstrates semi-crystalline character. The second heating runs at 20°C/min after rapid cooling from melt (FIG. 4), shows only the glass transition temperature,  $T_g$ , for both samples. The  $T_g$  was calculated as the temperature at the inflection point of the phenomenon, and for the NS1 and NS2 were founded at 39°C and at 25°C respectively. The actual glass transition temperatures were only several degrees lower than the values calculated theoretically from the Fox equation (TABLE 2).



RYS. 3. Porównanie pierwszych przejść otrzymanych z DSC dla a) NS1 i b) NS2. Szybkość ogrzewania 20°C. FIG. 3. Comparative first scan of the DSC thermograms for a) NS1 and b) NS2. Heating rate 20°C/min.



RYS. 4. Porównanie drugich przejść otrzymanych z DSC dla a) NS1 i b) NS2. Szybkość ogrzewania 20°C po szybkim schłodzeniu. FIG. 4. Comparative second scan of the DSC thermograms for a) NS1 and b) NS2. Heating at 20°C/min after rapid cooling from melt.



Analizując II przebieg ogrzewania ze szybkością 20°C/min i szybkim chłodzeniu (RYS. 4) obserwujemy jedynie temperatury zeszklenia obu terpolimerów. Temperatury zeszklenia zostały obliczone w punkcie przegięcia i wynoszą odpowiednio 39°C dla NS1 oraz 25°C dla NS2. Były one tylko kilka stopni niższe od temperatur wyliczonych teoretycznie z równania Foxa (TABELA 2).

Badano efekt pamięci kształtu wyprasek otrzymanych z obu terpolimerów. Otrzymane terpolimery wykazywały pamięć kształtu. Szybkość powrotu do kształtu tymczasowego do permanentnego ( $t_p$ ), wywoływana podgrzaniem do temperatury ciała ludzkiego (37°C), dla otrzymanych terpolimerów wynosiła około 3 minut. Stopień powrotu do kształtu permanentnego (k%), po rozciągnięciu kształtki o 50% i zamrożeniu tego tymczasowego kształtu wynosił ponad 90%. W odróżnieniu od wcześniej badanych poliestrowęglańców [8,9] obserwowane zjawisko pamięci kształtu związane jest głównie z istnieniem domen krystalicznych spełniających rolę węzłów molekularnych, a nie z tworzeniem międzycząsteczkowych wiązań wodorowych czy silnym splątaniem łańcuchów.

## Wnioski

Na podstawie przedstawionych wyników badań można stwierdzić, że otrzymane bioresorbowalne materiały terpolimerowe charakteryzują się zakładanymi podstawowymi właściwościami fizykochemicznymi – wysoką elastycznością i dobrymi parametrami efektu zapamiętywania kształtu. Konieczna jest jednak optymalizacja syntezy tak, aby otrzymać produkt o wyższej masie molowej, co powinno polepszyć własności mechaniczne opisanych terpolimerów. Skład kopolimeru został tak dobrany, aby temperatura powrotu z nadanego kształtu tymczasowego do permanentnego była nieco niższa od temperatury ciała ludzkiego, co gwarantuje, iż implant wykonany z tego materiału automatycznie w ciągu kilku minut od momentu wprowadzenia w miejsce zabiegu ulegnie rozprężeniu do zaplanowanego kształtu. Na podstawie przedstawionych wyników wstępnych badań można oba materiały określić, jako perspektywiczne w zastosowaniach biomedycznych i wydaje się celowym kontynuacja badań nad ich syntezą, charakterystyką i aplikacją.

## Podziękowania

Pracę wykonano w ramach projektu MNiSW Nr 2011/01/N/ST5/02257 „Wpływ struktury łańcucha, składu, wiązań wodorowych na właściwości bioresorbowalnych kopolimerów z pamięcią kształtu”.

## Piśmiennictwo

- [1] Introduction to Biomaterials, ed. D.L. Shi, Tsinghua University Press and World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2006.
- [2] Shape-Memory Polymers and Multifunctional Composites, ed. J. Leng, S. Du, CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton 2010.
- [3] Ukielski R., Sobecki P. P.: Inteligentne polimery z termicznym efektem pamięci kształtu. *Polimery* 53, 11-12, (2008) 793-798.
- [4] Li H., Chang J., Cao A., Wang J.: In vitro Evaluation of Biodegradable Poly(butylene succinate) as a Novel Biomaterial. *Macromolecular Bioscience* 5 (2005) 433-440.
- [5] Pamuła E., Rutkoska M. M.: Hydrolytic and enzymatic degradation of poly(glycolide-co-L-lactide). *Engineering of Biomaterials* 47-53 (2005) 49-52.
- [6] Ba Ch., Yang J., Hao Q., Liu X.: Syntheses and physical characterization of new aliphatic tri-block poly(L-lactide-b-butylene succinate-b-L-lactide)s bearing soft and hard biodegradable building blocks. *Biomacromolecules* 4 (2003) 1827-1834.

The both obtained terpolymers exhibited shape memory effect. The duration of return from temporary to permanent shape ( $t_p$ ), which was a return of the human body temperature stimulation (37°C) was about 3 minutes. The degree of return to the permanent shape (k%) was over 90%.

## Conclusion

On the basis of obtained results it can be concluded that the obtained bioresorbable terpolymers are characterized by assumed basic physicochemical properties - high elasticity and good functional shape memory effect. However, it is necessary to optimize the synthesis, so as to obtain a product with a higher molar mass, which should improve the mechanical properties of the described terpolymers. The composition of the copolymer was chosen so that the temperature of return from assigned temporary to permanent shape was slightly lower than human body temperature, which ensures that the implant made of this material will be automatically allowed to expand into the desired shape within a few minutes after implantation. On the basis of the results of preliminary studies, the obtained material appears applicable for biomedical applications, and it seems advisable to continue research on their synthesis, characterization and application.

## Acknowledgments

A financial support has been provided by NCN, project No. 2011/01/N/ST5/02257 "Effect of chain structure, composition, the importance of hydrogen bonding on the properties of shape memory bioresorbable copolymers".

## References

- [7] Nikolic M.S., Djonlagic J.: Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene adipate)s. *Polymer Degradation and Stability* 74 (2001) 263-270.
- [8] Zini E., Scandola M., Dobrzynski P., Kasperczyk J., Bero M.: Novel (L-lactide-glycolide-trimethylene carbonate) terpolymers with shape memory properties. *Biomacromolecules* 8 (2007) 3661-3667.
- [9] Smola A., Dobrzyński P., Sobota M., Pastusiak M., Kaczmarczyk B., Kasperczyk J.: Preliminary tests of forming bioresorbable stent models with shape memory properties intended to use in lower respiratory tract treatment. *Engineering of Biomaterials* 96-98 (2010) 93-98.
- [10] Fox T.G.: Influence of diluent and copolymer composition on the glass temperature of copolymers, *Bull. Am. Phys. Soc.* 1 (1965) 123-128.

# UWALNIANIE GENTAMYCYN Z NOŚNIKÓW POLIMEROWYCH

ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ\*, JAN CHŁOPEK

AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW  
\* E-MAIL: MORAWSKA@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

*Siarczan gentamycyny jest skutecznym antybiotykiem stosowanym w leczeniu głębokich infekcji kości. Jednak jego miejscowe dostarczenie za pomocą implantowanych nośników leków wymaga znajomości mechanizmu i kinetyki jego uwalniania, co powinno pozwolić w sposób kontrolowany na jego dozowanie w zależności od potrzeb i miejsca implantacji.*

*Celem pracy była ocena wpływu lokalizacji gentamycyny w materiale nośnika (matryca/modyfikator) oraz typu modyfikatora zawierającego lek (kapsułki alginianowe/włókna PLA) na szybkość uwalniania gentamycyny. Jako matrycę w przypadku wszystkich badanych materiałów zastosowano polilaktyd (PLA).*

*Szybkość uwalniania leku określono metodą spektrofotometryczną UV-vis. Wyniki te poparto pomiarami pH i przewodnictwa płynów inkubacyjnych. Dodatkowo wykonano obserwacje mikroskopowe wraz z mikroanalizą rentgenowską (SEM+EDS). Wykonano również badania spektroskopowe w podczerwieni (FTIR).*

*Uwalnianie gentamycyny z polimerowego nośnika zachodzi najintensywniej w czasie pierwszego tygodnia inkubacji pomimo braku degradacji osnowy w tym okresie. Większej szybkości uwalniania oraz większej ilości uwalnianego leku sprzyja obecność granic międzyfazowych. Oznacza to, że umieszczenie gentamycyny w fazie modyfikującej osnowę (włókna, kapsułki) ułatwia uwalnianie leku z materiału. Uwalnianie antybiotyku z kapsułek z alginianu wapnia przebiega szybciej niż z włókien PLA, co wiąże się prawdopodobnie z ich znacznym pęcznieniem w środowisku wodnym, co tym samym ułatwia uwalnianie leku.*

**Słowa kluczowe:** nośnik leku, gentamycyna, uwalnianie, polilaktyd, kompozyty

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 21-27]

## Wprowadzenie

Wprowadzenie ciała obcego w postaci implantu do organizmu żywego, jak również sama interwencja chirurgiczna sprzyja rozwojowi infekcji bakteryjnych w leczonej tkance oraz tworzeniu biofilmu na powierzchni implantów, co w konsekwencji może prowadzić do poważnych powikłań pooperacyjnych [1-3]. Szczególnie utrudnione jest leczenie infekcji kości ze względu na trudności z miejscową penetracją podawanego ogólnoustrojowo antybiotyku. Wiąże się to z koniecznością długotrwałego stosowania leku, którego działanie obejmuje cały organizm. Dlatego coraz częściej skłania się do opracowania implantów stanowiących równocześnie nośnik leku, co umożliwia bezpośrednią iniekcję antybiotyku w miejsce zakażenia. Skutecznym antybiotykiem w leczeniu głębokich infekcji kości jest siarczan gentamycyny [4-5].

# GENTAMICIN RELEASE FROM POLYMERIC CARRIERS

ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ\*, JAN CHŁOPEK

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND  
\* E-MAIL: MORAWSKA@AGH.EDU.PL

## Abstract

*Gentamicin sulfate is an effective antibiotic used in the treatment of deep bone infections. However, its local provision by means of implanted medicine carriers requires the knowledge of the mechanism and kinetics of its release, which should allow for its dosage in a controlled manner, depending on the need and the implant's location.*

*The aim of the work was an evaluation of the effect of the gentamicin's location in the carrier material (matrix/modifier) and the type of the medicine-containing modifier (alginate capsules/PLA fibres) on the rate of the gentamicin release. In the case of the examined materials, polylactide (PLA) was applied as the matrix.*

*The rate of the medicine's release was determined with the spectrophotometric method, UV-vis. These results were supported by the measurements of the pH and the conductivity of the incubation fluids. Additionally, microscopic observations were performed, together with an X-ray microanalysis (SEM+EDS). Fourier-transform infrared spectroscopic tests were also conducted (FTIR).*

*The gentamicin release from the polymer carrier proceeds the most intensely within the first incubation week, despite the lack of the matrix's degradation at that time. A greater release rate and a bigger amount of the released medicine are stimulated by the presence of phase boundaries. This means that locating gentamicin in the phase modifying the matrix (fibres, capsules) facilitates the medicine's release from the material. The antibiotic's release from calcium alginate capsules proceeds faster than from PLA fibre ones, which is probably connected with their significant swelling in the water environment, facilitating the medicine release.*

**Keywords:** drug carrier, gentamicin, release, polylactide, composites

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 21-27]

## Introduction

Introducing a foreign matter in the form of an implant into a living organism, as well as the surgical intervention itself, favour the development of bacterial infections in the treated tissue and the creation of a biofilm on the implant's surface, whose consequence can be serious post-operational complications [1-3]. The treatment of bone infections seems to be especially hindered, due to the difficulties in the local penetration of the systemically applied antibiotic. This is connected with the necessity of a long-term application of the medicine, which operates throughout the organism.

Dotychczasowe prace w tej dziedzinie obejmowały próby zastosowania na nośniki leku w chirurgii kostnej bioaktywnych materiałów ceramicznych (HAP, TCP) oraz degradable materials polimerowych (polilaktyd, poliglikolid i ich kopolimery, chitozan, kolagen), głównie w postaci jednofazowych podłoży lub mikrokapsuł [6-8]. Nowym rozwiązaniem jest zastosowanie materiałów kompozytowych pełniących funkcje implantów wypełniających ubytki, ale równocześnie zdolnych do uwalniania leku. Zarówno w przypadku materiałów kompozytowych jak i jednofazowych głównym problemem jest określenie jakie czynniki wpływają na mechanizm i kinetykę uwalniania leku. Ich poznanie powinno dać możliwość sterowania w sposób kontrolowany szybkością i ilością uwalnianego leku, czyli niejako pozwoli w sposób zaplanowany na jego dozowanie w zależności od potrzeb i miejsca implantacji.

Celem pracy była ocena wpływu lokalizacji gentamycyny w materiale nośnika (matryca/modyfikator) oraz typu modyfikatora zawierającego lek (kapsułki alginianowe/włókna PLA) na szybkość uwalniania gentamycyny. Jako matrycę w przypadku wszystkich badanych materiałów zastosowano polilaktyd (PLA).

## Materiały i metody

### Materiały i przygotowanie próbek

W pracy badaniom poddano trzy typy materiałów różniących się sposobem wprowadzenia siarczanu gentamycyny. Stosowano dla nich następujące oznaczenia:

PLA(gent) – siarczan gentamycyny wprowadzony do matrycy poli(L-laktydu),

PLA+CaAlg(gent) – kapsułki alginianowe stanowiące nośnik siarczanu gentamycyny umieszczone w matrycy poli(L-laktydu),

PLA+PLA-F(gent) – włókna z poli(L-laktydu) stanowiące nośnik siarczanu gentamycyny umieszczone w matrycy poli(L-laktydu).

Jako materiały odniesienia zastosowano materiały nie zawierające leku: PLA i PLA+CaAlg.

Siarczan gentamycyny (Gentamicin Sulfas Ph. Eur.) wyprodukowano w Interforum Pharma Sp. z o.o. Kraków. Jako matrycę zastosowano poli(L-laktyd) (PLA) Ingeo 3051D Nature work. Włókna PLA z gentamycyną (20% mas. gentamycyny) otrzymano z tego samego polimeru poprzez wyciąganie ze stopu (165°C). Enkapsulację gentamycyny w alginianie wapnia przeprowadzono metodą klasyczną poprzez żelowanie i podmianę jonową alginianu sodu (FMC BioPolymer – Pharmaceutical PROTANAL 60) w CaCl<sub>2</sub> (POCH) [9]. W przypadku kapsulek z lekiem zastosowano proporcję 1 g siarczanu gentamycyny / 3 g alginianu sodu. Obrazy SEM powierzchni kapsulek z lekiem i bez leku oraz analizę EDS wykazującą obecność siarki pochodzącej od siarczanu gentamycyny przedstawia RYS. 1.

Próbki PLA(gent) otrzymano poprzez rozpuszczenie PLA w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 g / 50 ml) oraz dodanie roztworu siarczanu gentamycyny w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 g / 25 ml). Z roztworu odlano folie, które po odparowaniu rozpuszczalnika pocięto, sklejono przygotowanym roztworem i sprasowano w postaci kostek o masie ok. 1 g i wymiarach 1,5 x 1,5 cm. Udział leku wyniósł 20% mas.

Sam PLA otrzymano poprzez rozpuszczenie polilaktydu w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 g / 75 ml), dalsze kroki były analogiczne jak w przypadku próbek z gentamycyną.

Próbki PLA+CaAlg(gent) oraz PLA+CaAlg otrzymano poprzez zmieszanie odpowiednich kapsulek alginianowych (z lekiem i bez leku) z roztworem PLA oraz odlanie folii, z których po odparowaniu rozpuszczalnika wycięto i sklejono próbki jak wyżej. Udział leku w próbkach wyniósł 20% mas.

That is why, more and more often, one can see the development of implants which simultaneously constitute the medicine carrier, and this allows for a direct antibiotic injection into the infected area. An effective antibiotic in the treatment of bones is gentamicin sulfate [4,5]. The previous works in this field included the application of bioactive ceramic materials (HAP, TCP) and degradable polymer materials (polylactide, polyglycolide and their co-polymers, chitosan and collagen) as medicine carriers in bone surgery, mainly in the form of mono-phase bases or microcapsules [6-8]. A new solution is the application of composite materials playing the role of the implants filling the decrements and, at the same time, capable to release the medicine. Both in the case of the composite materials and the mono-phase ones, the main problem is determining the factors which affect the mechanism and kinetics of the medicine release. Their knowledge should make it possible to control the rate and amount of the released medicine, that is, it will allow for its scheduled dosage, depending on the need and the implant's location.

The aim of the work was an evaluation of the effect of the gentamicin's location in the carrier material (matrix/modifier) and the type of the medicine-containing modifier (alginate capsules/PLA fibres) on the rate of the gentamicin release. In all the tests, polylactide (PLA) was used as the matrix.

## Materials and methods

### Materials and sample preparation

The tests included three types of materials, differing in the manner of the gentamicin sulfate introduction. The following designations were applied:

PLA(gent) – gentamicin sulfate introduced into the poly(L-lactide) matrix,

PLA+CaAlg(gent) – alginate capsules as the gentamicin sulfate carriers introduced into the poly(L-lactide) matrix,

PLA+PLA-F(gent) – poly(L-lactide) fibres as the gentamicin sulfate carriers introduced into the poly(L-lactide) matrix.

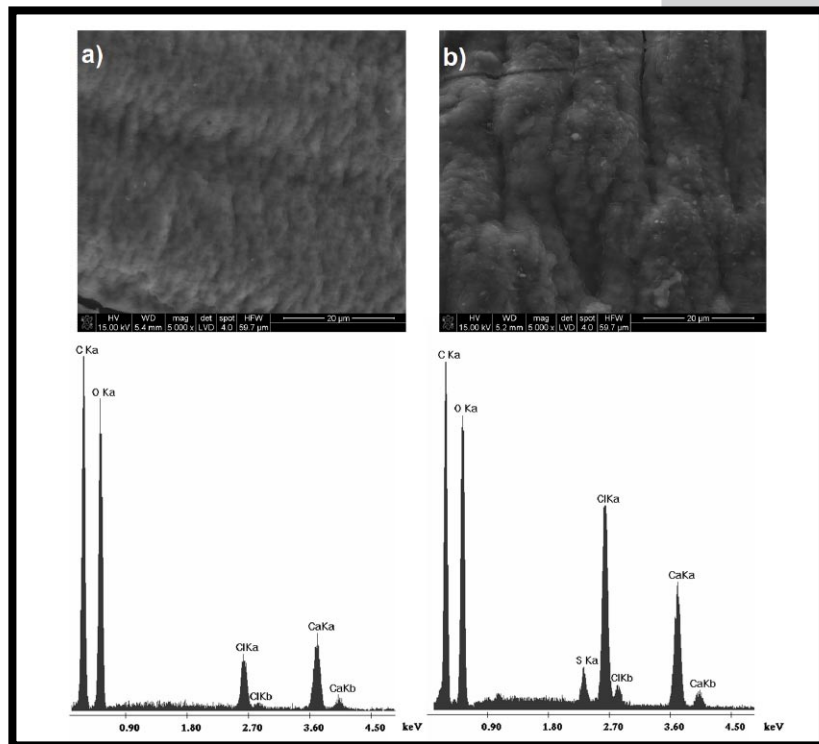
Materials with no content of gentamicin sulfate were used as the reference materials: PLA and PLA+CaAlg.

Gentamicin sulfate (Gentamicin Sulfas Ph. Eur.) was produced at Interforum Pharma Sp. z o.o., Krakow. The poly(L-lactide) (PLA) Ingeo 3051D Nature work was used as the matrix. The PLA fibres with gentamicin (20% mass) were obtained from the same polymer through melt drawing (165°C). The gentamicin's encapsulation in the calcium alginate was performed with the classical method of gelation and ionic substitution of sodium alginate (FMC BioPolymer – Pharmaceutical PROTANAL 60) in CaCl<sub>2</sub> (POCH) [9]. In the case of the capsules with the medicine, the following preparation was applied: 1 g gentamicin sulfate/3 g sodium alginate. The SEM images of the surface of the capsules with and without the medicine and the EDS analysis show the presence of sulphur originating from the gentamicin sulfate (FIG. 1).

The PLA(gent) samples were obtained through dissolving PLA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 g / 50 ml) and adding a gentamicin sulfate solution in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 g / 25 ml). The solution was used to cast foils, which, after the solvent's evaporation, were cut, glued with the prepared solution and pressed in the form of blocks, 1 g in mass and 1.5 x 1.5 cm in dimension. The mass fraction of the medicine equaled 20%.

The PLA itself was obtained by dissolving the polylactide in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 g / 75 ml); the further steps were analogous to those in the case of the gentamicin sample.





**RYS. 1. Obrazy SEM oraz skład pierwiastkowy kapsulek z alginianu wapnia:**  
**a) bez siarczanu gentamycyny,**  
**b) z siarczanem gentamycyny.**  
**FIG. 1. SEM images and element composition of calcium alginate capsules:**  
**a) without gentamicin sulfate,**  
**b) with gentamicin sulfate.**

Próbki PLA+PLA-F(gent) otrzymano poprzez zalanie włókien PLA(gent) roztworem PLA. Aby zabezpieczyć włókna PLA przed działaniem rozpuszczalnika zawartego w roztworze PLA pokryto je uprzednio warstwą ochronną przez zanurzenie w zolu krzemionkowo-wapniowym przygotowanym w oparciu o wniosek patentowy P-317 174. Odlane folie po wysuszeniu sklejono i prasowano jak wyżej. Udział leku w próbce wynosił 7,5% mas. Mniejsza zawartość gentamycyny w przypadku tego materiału wynika z trudności w otrzymaniu włókien PLA o większym udziale leku niż 20% mas.

## Metody

Próbki z gentamycyną oraz odniesienia poddano badaniom w warunkach in vitro w symulowanym środowisku biologicznym poprzez ich inkubację w roztworze PBS (bufor fosforanowy do uwalniania pH = 7,4) oraz w wodzie destylowanej w temperaturze 37°C. Dla wszystkich materiałów stosowano stałą proporcję 1 g próbki / 25 ml płynu. Ocena mikrostruktury materiałów wraz z mikroanalizą rentgenowską została przeprowadzona dla próbek początkowych oraz po 4 tyg. inkubacji przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) NovaNanoSEM FEJ zaopatrzonego w przystawkę EDAX (FEJ Europe Company). Badania spektroskopowe w podczerwieni (FTIR) zostały wykonane dla próbek wyjściowych oraz po 8, 16 i 20 tyg. inkubacji w roztworze PBS. Badanie wykonano techniką pastylkową na spektrometrze Fourierowskim BIO-RAD FTS-60V. Ponadto, co tydzień wykonywano pomiary przewodnictwa i pH wody destylowanej, w której inkubowano próbki przez okres 12 tygodni.

Ilości uwalnianego siarczanu gentamycyny określano przy użyciu spektrofotometru UV-vis przy długości fali 333 nm. Po wyznaczonych okresach inkubacji w PBS (1, 2, 4, 7, 14 i 28 dni) pobierano po 0,5 ml nadsącza, które zastępowano świeżym roztworem PBS. Inkubację każdego typu materiału prowadzono w trzech niezależnych pojemnikach, stąd oznaczanie gentamycyny prowadzone było trzykrotnie dla każdej z próbek. Pobrane 0,5 ml nadsącza dodawano do 0,5 ml roztworu ftaldialdehydu oraz 0,5 ml iso-propanolu. Roztwór ftaldialdehydu przygotowano wg metody Zhanga [10], poprzez dodanie 2,5 g ftaldialdehydu, 62,5 ml metanolu i 3 ml 2-merkaptioetanolu do 560 ml 0,04M boranu sodu.

The PLA+CaAlg(gent) and PLA+CaAlg samples were obtained through mixing the appropriate alginate capsules (with and without the medicine) with the PLA solution, as well as through casting the foils, which, after the solvent's evaporation, were cut and glued, as above. The medicine's mass fraction in the samples equaled 20%.

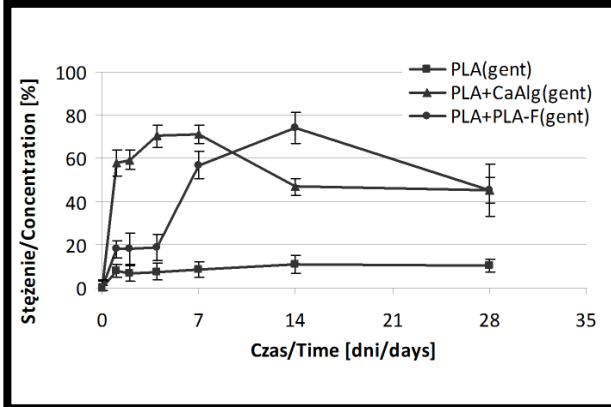
The PLA+PLA-F(gent) samples were obtained by pouring the PLA solution on the PLA(gent) fibres. In order to protect the PLA fibres from the operation of the solvent present in the PLA solution, they were coated with a protective layer, by immersion in a silica-calcium sol, prepared on the basis of the patent application no. P-317 174. After they have dried, the cast foils were glued and pressed, as above. The mass fraction of the medicine in the samples equaled 7.5%. The lower concentration of drug in this samples is caused by difficulty with obtaining PLA fibres with higher mass fraction than 20%.

## Methods

The samples with gentamicin and the reference materials were investigated under in vitro conditions in a simulated biological environment through incubation in a PBS solution (Phosphate Buffered Saline, pH=7.4) and distilled water, at the temperature of 37°C. For all the materials, one constant dosage was applied, that is 1 g of sample/25 ml of fluid. Microstructure observations with the application of the roentgen microanalysis were performed for the initial samples and after 4 weeks of incubation, with the use of a scanning electron microscope (SEM) NovaNanoSEM FEJ, connected with EDAX (FEJ Europe Company). Infrared spectroscopy (FTIR) tests were performed for the samples before and after 8, 16 and 20 weeks of incubation in PBS, with the use of pellet techniques and a fourier spectrometer BIO-RAD FTS-60V. Additionally, the conductivity and pH of the incubation fluids (distilled water) were measured every week, for a 12-week period.

The amounts of the released gentamicin sulfate were determined with the use of a spectrophotometer UV-vis, with the wavelength of 333 nm. After the established PBS incubation times (1, 2, 4, 7, 14 and 28 days), 0.5 ml of the supernatant was sampled, which was then replaced by a fresh PBS solution. Incubation of each type of samples was performed in three independent flasks, therefore the release of gentamicin was assayed in triplicate. The sampled 0.5 ml of the supernatant was added to 0.5 ml of a phthaldialdehyde solution and 0.5 ml of an iso-propanol solution. The phthaldialdehyde solution was prepared according to the Zhang method [10], by way of adding 2.5 g of phthaldialdehyde, 62.5 ml of metanol and 3 ml of 2-mercaptoethanol to 560 ml 0.04M of sodium borate.

Szybkość uwalniania gentamycyny określono na podstawie pomiarów stężenia leku w nadsączu po wyznaczonych okresach inkubacji badanych materiałów w roztworze PBS. W pierwszym tygodniu pomiary wykonywano po 1, 2 i 4 dniach, a następnie po 1, 2 i 4 tygodniach. Wyniki zamieszczono na RYS. 2. Najgwałtowniej uwalnianie gentamycyny nastąpiło z kapsułek alginianowych rozproszonych w matrycy PLA (PLA+CaAlg(gent)). Już po pierwszym dniu inkubacji stężenie uwolnionej gentamycyny osiągnęło wartość prawie 60%. Maksymalną wartość osiągniętego stężenia odnotowano po 7 dniach i wynosiła ona 71%.



RYS. 2. Stężenie uwolnionej gentamycyny w funkcji czasu inkubacji.

FIG. 2. Concentration of the released gentamicin in the function of incubation time.

W kolejnym tygodniu uległa ona obniżeniu w związku z podmianą roztworu PBS, możliwe również że gentamycyna uległa powtórnemu osadzeniu.

Umieszczenie gentamycyny we włóknach polilaktydowych znajdujących się w osnowie PLA spowodowało bardziej stopniowy przebieg uwalniania niż to miało miejsce w przypadku kompozytu z kapsułkami. Po pierwszym dniu stężenie osiągnęło niecałe 20%, największy wzrost nastąpił między 4 a 7 dniem z wartości ok. 20% do prawie 60% a w przeciągu kolejnego tygodnia stężenie osiągnęło wartość maksymalną wynoszącą 74%.

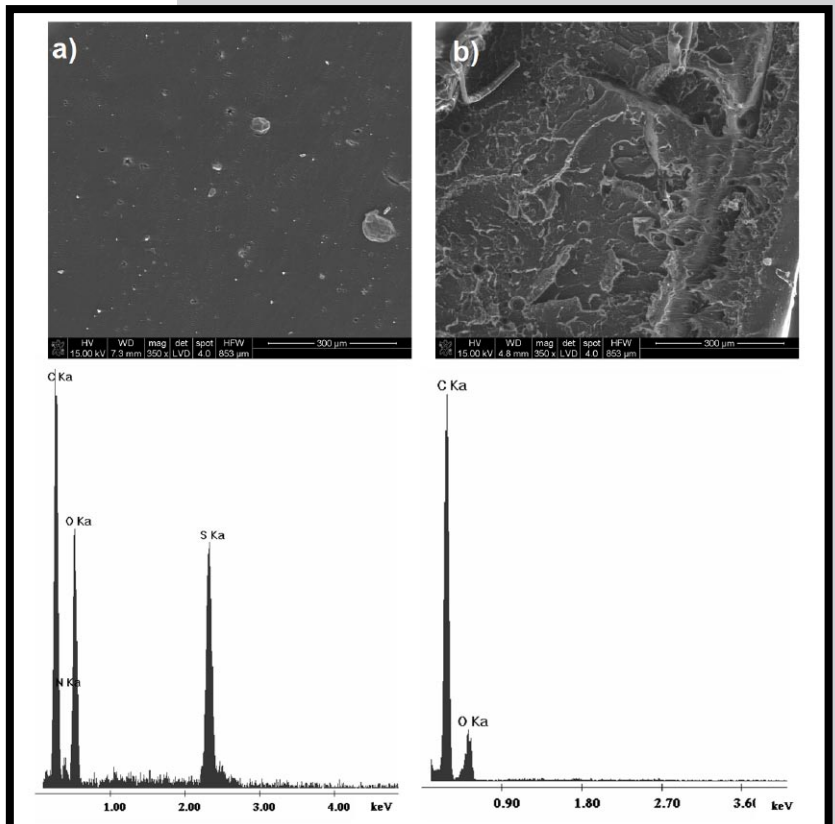
Najmniejsze zmiany w uwalnianiu gentamycyny nastąpiły dla PLA(gent). Odnotowane wartości nie przekraczają 11% w całym okresie obserwacji, co wskazuje, że uwalnianie leku z matrycy PLA jest utrudnione ze względu na utrudnioną dyfuzję z wnętrza materiału. Uwalnianie nastąpiło prawdopodobnie wyłącznie z warstw powierzchniowych próbek, na co wskazuje brak siarki w analizie EDS wykonanej na powierzchni próbki po 4 tyg. inkubacji w przeciwieństwie do powierzchni materiału wyjściowego (RYS. 3). Natomiast wprowadzenie do osnowy PLA dodatkowych granic rozdziału faz osnowa – modyfikator w znacznym stopniu ułatwia dyfuzję płynu do wnętrza kompozytów i odprowadzanie leku z fazy modyfikatora. Obecność granic rozdziału faz potwierdzają obrazy mikroskopowe powierzchni materiałów z włóknami PLA oraz z kapsułkami alginianowymi (RYS. 4).

## Results and Discussion

The rate of the gentamicin release was determined on the basis of the measurements of the medicine concentration in the supernatant after the established times of incubation of the tested materials in the PBS solution. In the first week, the measurements were performed after 1, 2 and 4 days, and next, they were conducted after 1, 2 and 4 weeks. The results are compiled in FIG. 2. The gentamicin was released the most rapidly from the alginate capsules dispersed in the PLA matrix (PLA+CaAlg(gent)). Already after the first incubation day, the concentration of the released gentamicin reached the value of nearly 60%. The maximum value of the obtained concentration was recorded after 7 days and it equalled 71%. In the following week, it decreased, due to the replacement of the PBS solution. It is also possible that the gentamicin underwent another deposition process.

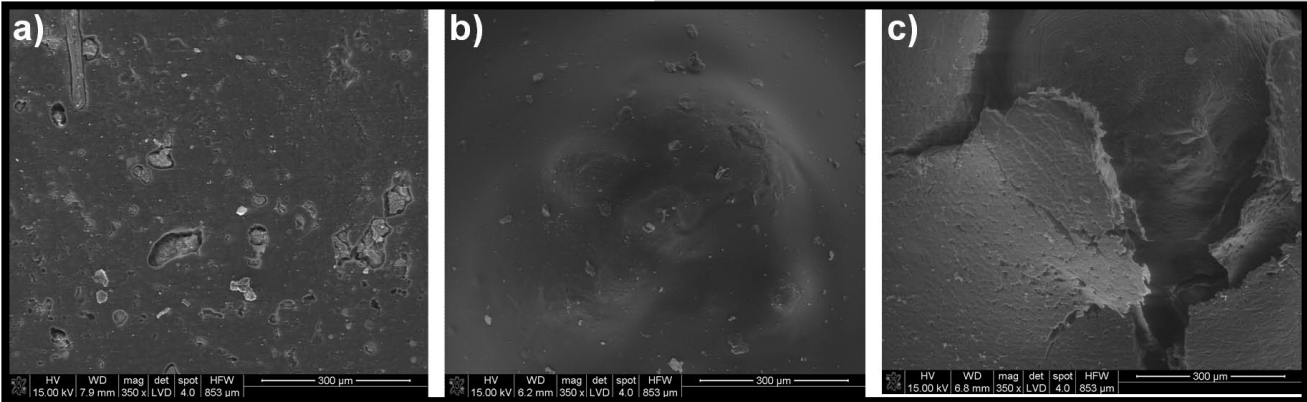
Locating the gentamicin in the polylactide fibres present in the PLA matrix caused a more gradual course of release than that in the case of the composite with capsules. After the first day, the concentration reached almost 20%. The highest increase occurred between the 4th and the 7th day - from about 20% to nearly 60% - and within the following week, the concentration reached the maximum value of 74%.

The smallest changes in the gentamicin release took place in the case of PLA(gent). The recorded values did not exceed 11% in the whole incubation period, which points to the fact that the release of the medicine from the PLA matrix is made difficult due to the hindered diffusion from the inside of the material. The release probably occurred exclusively from the surface layers of the samples, which points to the lack of sulphur, in the EDS analysis performed on the surface of the sample after the 4th incubation week, contrary to the surface of the initial material (FIG. 3).



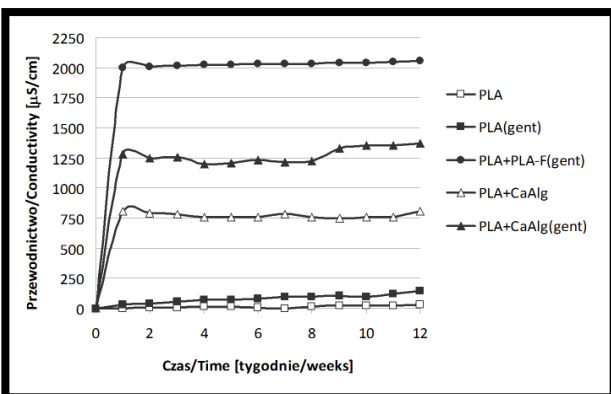
RYS. 3. Obrazy SEM oraz skład pierwiastkowy PLA(gent): a) wyjściowego, b) po 4 tyg. inkubacji w PBS.

FIG. 3. SEM images and PLA(gent) element composition: a) initial, b) after 4 weeks of incubation in PBS.

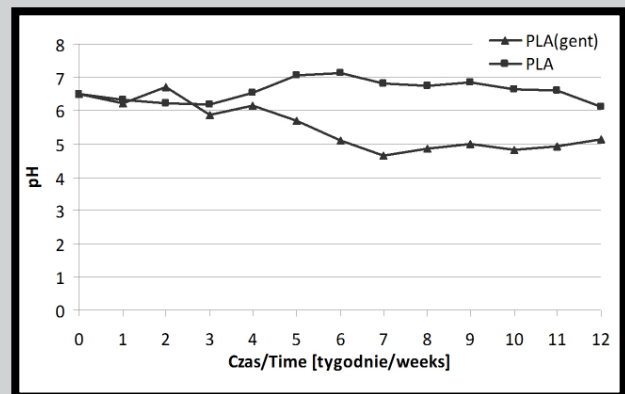


**RYS. 4. Obrazy SEM powierzchni materiałów: a) PLA+PLA-F(gent) wyjściowy, b) PLA+CaAlg(gent) wyjściowy, c) PLA+CaAlg(gent) po 4 tyg. inkubacji w PBS.**

**FIG. 4. SEM images of the materials' surface: a) initial PLA+PLA-F(gent), b) initial PLA+CaAlg(gent), c) PLA+CaAlg(gent) after 4 weeks of incubation in PBS.**



**RYS. 5. Zmiany przewodnictwa wody destylowanej w funkcji czasu inkubacji badanych materiałów.**  
**FIG. 5. Conductivity changes of distilled water in the function of incubation time of the tested materials.**



**RYS. 6. Zmiany pH wody destylowanej w funkcji czasu inkubacji samego PLA i PLA z gentamycyną.**  
**FIG. 6. pH changes of distilled water in the function of incubation time of pure and gentamicin-containing PLA.**

Obniżenie stężenia leku w nadsączu pobranym po 28 dniach inkubacji kompozytu z włóknami PLA jest zbyt znaczne, aby mogło być jedynie wynikiem podmiany płynu PBS, dlatego można podejrzewać, że jest związane z wytrącaniem gentamycyny. Procesowi temu może sprzyjać obecność krzemu pochodzącego z warstwy ochronnej zolu.

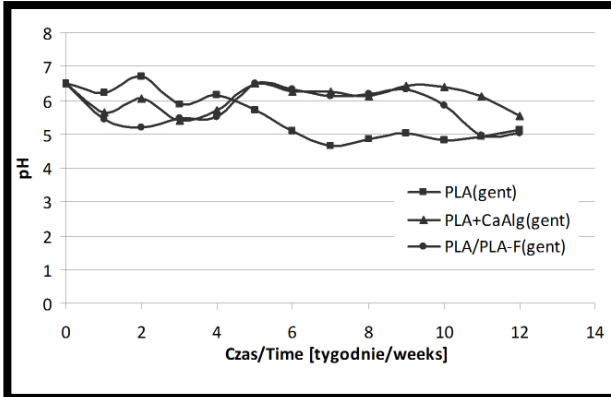
Powyższe wyniki potwierdzają się w pomiarach przewodnictwa wody destylowanej, w której inkubowano badane próbki oraz materiały odniesienia nie zawierające gentamycyny (RYS. 5). O procesie uwalniania antybiotyku świadczy wyraźnie wyższy poziom przewodnictwa w przypadku materiałów zawierających lek w porównaniu do ich materiałów odniesienia. Najmniejsza różnica jest widoczna pomiędzy PLA a PLA(gent), co świadczy o niewielkiej ilości uwolnionego leku, natomiast w przypadku materiałów zawierających fazę modyfikującą różnice te są znacznie większe. Wysoki poziom przewodnictwa obserwowany dla kompozytu PLA+PLA-F(gent) wynika dodatkowo z uwalniania zolu krzemionkowo-wapniowego pokrywającego włókna PLA. Podkreślenia wymaga, że w przypadku kompozytów z modyfikatorami największa zmiana przewodnictwa nastąpiła już po 1 tygodniu inkubacji, natomiast w przypadku PLA(gent) wzrost przewodnictwa jest stopniowy i zachodzi aż do 12 tygodnia inkubacji. Świadczy to o stopniowym ale systematycznym uwalnianiu gentamycyny z matrycy PLA. Potwierdza to stopniowe zakwaszenie środowiska związane z uwalnianiem gentamycyny (RYS. 6).

On the other hand, introducing additional matrix-modifier interphase boundaries into the PLA matrix significantly facilitates the fluid's diffusion into the inside of the composites as well as carrying the medicine off from the modifier's phase. The presence of the interphase boundaries is verified by the microscopic images of the surface of the materials with the PLA fibres and the alginate capsules (FIG. 4). Decreasing of drug concentration after 28 days for composite with PLA fibres is too high then only caused by replacement of the PBS, therefore it is probably connected with its precipitation. This process can be stimulated by the presence of silicon ions from protective layer of sol.

The above results are verified by the measurements of the conductivity of the distilled water, in which the samples and the reference materials without gentamicin were incubated (FIG. 5). The process of the antibiotic release is testified by the clearly higher conductivity level in the case of the medicine-containing materials than that of the reference materials. The smallest difference is visible between PLA and PLA(gent), which proves a small amount of the released medicine, whereas in the case of the materials containing the modifying phase, these differences are significantly bigger. The high conductivity level observed for the PLA+PLA-F(gent) composite additionally results from the release of the silica-calcium sol coating the PLA fibres.



Roztwór gentamycyny w zależności od jej stężenia przyjmuje pH w przedziale 5,5-3,5. Zmiany te nie są widoczne dla samego PLA, co wskazuje że obniżenie pH nie jest wynikiem degradacji PLA, a pochodzi wyłącznie od uwalniania gentamycyny. Dla materiałów kompozytowych zawierających fazę nośnikową pH ulega obniżeniu, następnie wzrostowi i ponownemu obniżeniu, co jest wynikiem nakładania się wpływów związanych z uwalnianiem gentamycyny oraz z degradacją pozostałych faz, jak alginianu wapnia i zolu krzemionkowo-wapniowego (RYS. 7).



**RYS. 7.** Zmiany pH wody destylowanej w funkcji czasu inkubacji badanych materiałów zawierających gentamycynę.

**FIG. 7.** pH changes of distilled water in the function of incubation time of the gentamicin-containing materials.

Jak pokazują widma FTIR wyraźne zmiany związane z degradacją osnowy PLA w przypadku wszystkich badanych materiałów widoczne są dopiero od 16 tygodnia inkubacji w roztworze PBS (RYS. 8-10). Jest to przede wszystkim zanik pasm w zakresie 2850-3000  $\text{cm}^{-1}$  związanych z drganiami grup CH,  $\text{CH}_3$ , a także wyraźne rozdzielanie pasm w zakresie 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$  (głównie grupy C-O) i 1350-1480  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ) oraz zmniejszenie szerokości połówkowej pasma związanego z drganiami grup C=O przy ok. 1760  $\text{cm}^{-1}$ .

W związku z tym, omówione uwalnianie gentamycyny mierzone w przeciągu 4 tygodni zachodzi pomimo braku degradacji matrycy polimerowej. Z uwagi na niewielką ilość uwalnianego leku z matrycy PLA, można wnioskować o decydującej roli granic międzyfazowych na kinetykę uwalniania gentamycyny. Natomiast brak granic rozdziału faz wyraźnie utrudnia proces dyfuzji leku do płynu inkubacyjnego.

## Wnioski

Uwalnianie gentamycyny z polimerowego nośnika zachodzi najintensywniej w przeciągu pierwszego tygodnia inkubacji pomimo braku degradacji osnowy w tym okresie czasu.

Większej szybkości uwalniania oraz większej ilości uwalnianego leku sprzyja obecność granic międzyfazowych. Oznacza to, że umieszczenie gentamycyny w fazie modyfikującej osnowę (włókna, kapsułki) ułatwia uwalnianie leku z materiału.

Uwalnianie antybiotyku z kapsulek z alginianu wapnia przebiega szybciej niż z włókien PLA, co wiąże się prawdopodobnie z ich znacznym pęcznieniem w środowisku wodnym, co tym samym ułatwia uwalnianie leku.

## Podziękowania

Praca finansowana z badań statutowych nr 11.11.160.937.

It is necessary to emphasize that in the case of the composites with modifiers, the biggest conductivity change took place already after the 1st incubation week, whereas in the case of PLA(gent), the conductivity increase was gradual and occurred only up to the 12th incubation week. This proves a gradual but systematic gentamicin release from the matrix and is verified by the gradual acidification of the environment connected with the gentamicin release (FIG. 6).

The gentamicin solution, depending on its concentration, assumes its pH within the range of 5.5-3.5. These changes are not visible for the pure PLA, which suggests that the pH decrease is not a result of the PLA degradation, but it originates exclusively in the gentamicin release. In the case of the carrier phase-containing materials, the pH decreases, and next increases and decreases again, which is a result of the overlapping of the influences of the gentamicin release and the other phases' degradation, such as calcium alginate and silica-calcium sol (FIG. 7).

As is shown by the FTIR spectra, the clear changes connected with the degradation of the PLA matrix, in the case of all the tested materials, are visible only after 16 weeks of incubation in the PBS solution (FIG. 8-10). This means mostly the fading of the bands in the range of 2850-3000  $\text{cm}^{-1}$  connected with the vibrations of the CH and  $\text{CH}_3$  group, and also the clear separation of the bands in the range of 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$  (mainly the C-O groups) and 1350-1480  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ), as well as a drop in the peak width at half height of the band connected with the vibrations of the C=O groups, with about 1760  $\text{cm}^{-1}$ .

Thus, the discussed gentamicin release measured within a period of 4 weeks takes place despite the lack of degradation of the polymer matrix. Due to the small amount of the medicine released from the PLA matrix, one can conclude a determining role of the interphase boundaries in the effect on the gentamicin release. The lack of phase boundaries significantly hinders the process of the medicine's diffusion into the incubation fluid.

## Conclusions

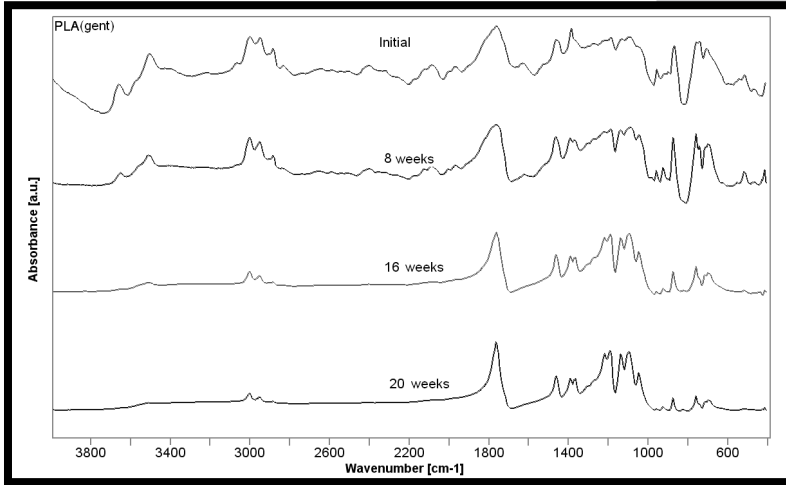
The gentamicin release from a polymer carrier takes place more intensely within the first incubation week, despite no matrix degradation at that time.

A more rapid release and a bigger amount of the released medicine are stimulated by the presence of interphase boundaries. This means that locating the gentamicin in the phase modifying the matrix (fibres, capsules) facilitates the release of the medicine from the material.

The release of the antibiotic from the calcium alginate capsules proceeds faster than that from the PLA fibres, which is probably connected with their significant swelling in the water environment, facilitating the medicine release.

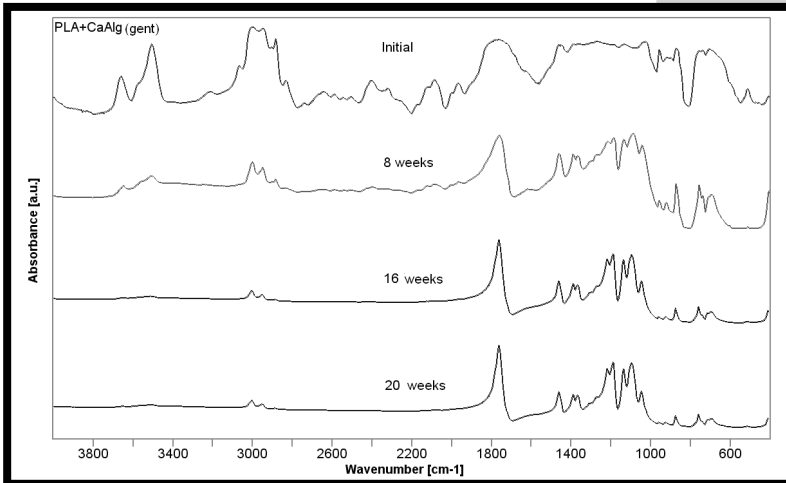
## Acknowledgements

*This work was financially supported from the 11.11.160.937 – statutory researches.*



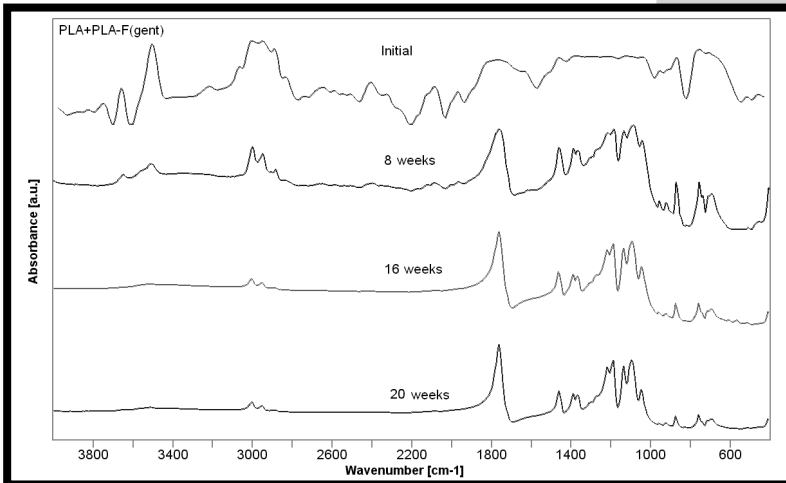
**RYS. 8.** Widma FTIR materiału PLA(gent) wyjściowego oraz po inkubacji w roztworze PBS.

**FIG. 8.** FTIR spectra of the initial PLA(gent) and after incubation in the PBS solution.



**RYS. 9.** Widma FTIR materiału PLA+CaAlg(gent) wyjściowego oraz po inkubacji w roztworze PBS.

**FIG. 9.** FTIR spectra of the initial PLA+CaAlg(gent) and after incubation in the PBS solution.



**RYS. 10.** Widma FTIR materiału PLA+PLA-F(gent) wyjściowego oraz po inkubacji w roztworze PBS.

**FIG. 10.** FTIR spectra of the initial PLA+PLA-F(gent) and after incubation in the PBS solution.

## Piśmiennictwo

- [1] Ciampolini J., Harding K.G.: Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad. Med. J.* 76, 898 (2000) 479-483.
- [2] Mader J.T., Cripps M.W., Calhoun J.H.: Adult posttraumatic osteomyelitis of the tibia. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 360 (1999) 14-21.
- [3] Costerton J.W.: Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 437 (2005) 7-11.
- [4] Krasko M.Y., Golenser J., Nyska A., Nyska M., Brin Y.S., Domb A.J.: Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant. *J Control Release* 117 (2007) 90-96.
- [5] Sanchez E., Baro M., Soriano I., Perera A., Evora C.: Research paper - In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. *Eur J Pharm Biopharm* 52 (2001) 151-158.

## References

- [6] Phromsopa T., Baimark Y.: Chitosan microparticles prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for drug delivery. *Biotechnology* 9, 1 (2010) 61-66.
- [7] Wang G.H., Liu S.-J., Ueng S. W.-N., Chan E.-C.: The release of cefazolin and gentamicin from biodegradable PLA/PGA beads. *Int. J. Pharm.* 273 (2004) 203-212.
- [8] Mainardes R.M., Silva L.P.: Drug delivery systems: past, present, and future. *Curr. Drug Targets* 5 (2004) 449-455.
- [9] Murua A., Portero A., Orive G., Hernández R.M., de Castro M., Pedraz J.L.: Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J. Control. Release* 132 (2008) 76-83.
- [10] Zhang X., Wyss U.P., Pichora D., Gossen M.F.A.: Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: Optimization of release properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 718-724.

## OCENA HISTOLOGICZNA I RADIOLOGICZNA KOŚCI KRÓLIKÓW PO IMPLANTACJI KOMPOZYTU CHAP-GLUKAN

LESZEK BORKOWSKI<sup>1\*</sup>, MARTA PAWŁOWSKA<sup>2</sup>, IZABELA POLKOWSKA<sup>3</sup>, MIROSLAW KARPIŃSKI<sup>4</sup>, TYMOTEUSZ SŁOWIK<sup>5</sup>, TOMASZ PIERSIAK<sup>1</sup>, ŁUKASZ MATUSZEWSKI<sup>6</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>7</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII, UNIwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin

<sup>2</sup> ZAKŁAD FIZJOLOGII ZWIERZĄT, UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

<sup>3</sup> KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII ZWIERZĄT, UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin

<sup>4</sup> ZAKŁAD HODOWLI AMATORSKICH I ZWIERZĄT DZIKICH, UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

<sup>5</sup> SAMODZIELNA PRACOWNIA RADIOLOGICZNA PRZY LUBELSKIM CENTRUM MAŁYCH ZWIERZĄT, ul. Stefczyka 11, 20-151 Lublin

<sup>6</sup> KLINIKA ORTOPEDII I REHABILITACJI DZIECIĘCEJ, UNIwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 2, 20-093 Lublin

<sup>7</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA TECHNOLOGII CERAMIKI I MATERIAŁÓW OGNIOTRWAŁYCH, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

\* E-MAIL: LESZEK.BORKOWSKI@UMLUB.PL

### Streszczenie

*W eksperymencie in vivo zbadano podstawowe cechy dwufazowego kompozytu kośćcozastępczego tj. biogodność i osteokonduktywność, a także jego właściwości osteoindukcyjne. Testowany kompozyt, przeznaczony do wypełniania ubytków kostnych, został wykonany z granul hydroksyapatytu węglanowego i polimeru polisacharydowego. Biomateriał został wszczepiony do kości piszczelowych królików na okres 1 lub 3 miesięcy. Po tym czasie zbadano stopień regeneracji kości na podstawie badań makroskopowych (radiologicznych) i mikroskopowych. Stwierdzono zaawansowane procesy osteointegracji i przebudowy kostnej w okolicy implantu, co wskazuje zarówno na osteokonduktywne, jak i osteoindukcyjne właściwości badanego biomateriału.*

**Słowa kluczowe:** biomateriał kośćcozastępczy, hydroksyapatyt węglanowy, osteointegracja, przebudowa kości

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 28-33]

### Wstęp

Proces gojenia kości to równoległe przebiegające procesy resorpcji i osteogenezy, określane mianem przebudowy kości (remodelling). W zależności od przewagi jednego z tych procesów dochodzi do regeneracji kości lub jej destrukcji, prowadzącej do ubytków struktur kostnych. Poimplantacyjne tworzenie nowej tkanki kostnej nazywane gojeniem kości (tzw. wgajanie implantów i przeszczepów kostnych) podlega tym samym procesom biologicznym [1].

## HISTOLOGICAL AND RADIOLOGICAL ANALYSIS OF RABBIT BONES AFTER IMPLANTATION OF CHAP-GLUCAN COMPOSITE

LESZEK BORKOWSKI<sup>1\*</sup>, MARTA PAWŁOWSKA<sup>2</sup>, IZABELA POLKOWSKA<sup>3</sup>, MIROSLAW KARPIŃSKI<sup>4</sup>, TYMOTEUSZ SŁOWIK<sup>5</sup>, TOMASZ PIERSIAK<sup>1</sup>, ŁUKASZ MATUSZEWSKI<sup>6</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>7</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF ANIMAL BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IN LUBLIN, AKADEMICKA 12, 20-033 LUBLIN, POLAND

<sup>3</sup> DEPARTMENT AND CLINIC OF ANIMAL SURGERY, UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IN LUBLIN, GŁĘBOKA 30, 20-612 LUBLIN, POLAND

<sup>4</sup> DEPARTMENT OF PET BREEDING AND WILDLIFE MANAGEMENT, UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IN LUBLIN, AKADEMICKA 13, 20-950 LUBLIN, POLAND

<sup>5</sup> INDEPENDENT RADIOLOGY UNIT AT LUBLIN SMALL ANIMALS MEDICAL CENTRE, STEFCZYKA 11, 20-151 LUBLIN, POLAND

<sup>6</sup> CHILDREN'S ORTHOPAEDIC CLINIC AND REHABILITATION DEPARTMENT, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, CHODŹKI 2, 20-093 LUBLIN, POLAND

<sup>7</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF TECHNOLOGY OF CERAMICS AND REFRACTORIES, MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

\* E-MAIL: LESZEK.BORKOWSKI@UMLUB.PL

### Abstract

*Basic characteristics of a hydroxyapatite-glucan biomaterial such as biocompatibility, osteoconductivity and osteoinductive properties were tested in in vivo experiment. The two-phase composite, intended for filling bone defects, was made of carbonated hydroxyapatite granules and polysaccharide polymer. The biomaterial was implanted to the tibial metaphysis in rabbits for the 1- or 3-month period. Bone regeneration after that time was evaluated by radiology and histology. Our analysis showed advanced osseointegration and extensive bone remodelling in the direct vicinity of implants indicating osteoinductive and osteoconductive properties of the material studied.*

**Keywords:** bone substitute, carbonated hydroxyapatite, osteointegration, remodelling

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 28-33]

### Introduction

The healing of bone defects consists of two simultaneous processes: osteolysis and osteogenesis, labelled as bone tissue remodelling. Predominance of one process over the another one leads to bone regeneration or destruction of its structure. Post-implantation formation of the new bone tissue (i.e. implant healing) undergoes the same biological processes [1].



Podstawowym i dotychczas nie w pełni poznany problem jest wpływ implantów na mineralizację tkanki kostnej penetrującej wszczep i tkanki kostnej wokół wszczepu. Wiadomo natomiast, że szybkość budowy beleczek kostnych oraz namnażanie osteoblastów uzależnione jest między innymi od stężenia wapnia i fosforu [2,3].

Skuteczność leczenia ubytków kostnych poprzez wprowadzenie materiału implantacyjnego w przeważającym stopniu zależy od osteointegracji wszczepu, a podstawowym klinicznym potwierdzeniem osteointegracji jest brak ruchomości wszczepu oraz objawów odczynu zapalnego. Dodatkowym warunkiem powodzenia jest także odpowiedni dobór materiału implantacyjnego, co w zabiegach wypełniania ubytków kości może eliminować ewentualne powikłania [4,5]. Aby implanty mogły łączyć się bezpośrednio z kością, tworzywo kompozytowe powinno być biokompatybilne i bioaktywne oraz mieć właściwości osteokondukcyjne, a w mniejszym stopniu także osteoindukcyjne [1,6].

Celem pracy jest analiza histologiczna i RTG procesu gojenia ubytków kości u królików po implantacji nowego materiału kościozastępczego do kości piszczelowych. Badany materiał jest kompozytem składającym się z dwóch faz: (1) porowatych granul hydroksyapatytu węglanowego (CHAP) oraz (2)  $\beta$ -1,3-glukanu. Hydroksyapatyt wykazuje chemiczne podobieństwo do frakcji mineralnej kości i jest uznany za składnik materiałów kościozastępczych z powodu swej osteokonduktywności, biogodności, bioaktywności oraz minimalnego ryzyka wystąpienia reakcji alergicznych [7,8]. Drugi składnik kompozytu nadaje elastyczność i potencjalnie może zostać użyty, jako nośnik leków [9,10].

## Materiały i metody

### Wytworzenie kompozytu dwufazowego

Implanty, w kształcie walca o średnicy 4 mm i długości 6 mm, przygotowano z granul hydroksyapatytu węglanowego [11] i polimeru glukanowego, wg procedury opisanej w patencie [12]. Do wytworzenia kompozytu wykorzystano dwie frakcje granul CHAP (0,2-0,3 mm i 0,4-0,6 mm) o następujących parametrach: porowatość otwarta - 66%, nasiąkliwość - 68%, gęstość pozorną - 0,97 g/cm<sup>3</sup>. Próbkę kompozytu suszono przez 4 dni w 37°C, a następnie umieszczono w plastikowo-papierowych rękawach i wysterylizowano tlenkiem etylenu (55°C, 5 godzin).

### Procedura implantacyjna

W badaniu wykorzystano 22 króliki nowozelandzkie białe (samce) o wadze 3-3,5 kg w wieku 6 miesięcy. Podzielono je na grupę badaną (16 królików) i grupę kontrolną (6 królików).

Wszystkie króliki poddano premedykacji medetomidyną (Domitor®, Orion Corp., Finlandia; dawka 80-150 mg/kg m.c.) oraz znieczulono podając dożylnie ketaminę (Bioketan®, Biowet, Polska; dawka 30-50 mg/kg m.c.). Wygolono skórę po wewnętrznej stronie podudzia i stawu kolanowego, odtłuszczono i odkażono, wykonano ok. 3 cm nacięcie skóry ponad proksymalną nasadą kości piszczelowej. U królików z grup doświadczalnych, w odległości ok 2,5-3 cm poniżej chrząstki nasadowej nawiercono otwór głębokości ok. 6 mm wiertłem o średnicy 4 mm. Nawierty wykonano w obu kościach piszczelowych, wypełniono materiałem kompozytowym, a następnie założono szwy na mięśnie i skórę używając nici chirurgicznych (Dexon 3-0, Tyco Healthcare, Wielka Brytania). Królikom kontrolnym nie nawiercano otworów w kościach, pozostałe etapy jak u królików z wszczepionym implantem.

The effect of implants on mineralization of the bone tissue penetrating and directly surrounding the implantation site is the essential and not fully explained problem. It is known that the rate of trabeculae formation and osteoblast proliferation depends on calcium and phosphorus concentrations [2,3].

Effectiveness in treating bone defects by implantation of bone substitutes depends mostly on the rate of osseointegration of such implants, clinically confirmed by implant immobility and lack of inflammation signs. Moreover, the success depends on the use of adequate implantation materials, which could eliminate possible complications [4,5]. The direct implant-bone tissue integration can be achieved once the composite material with bioactive, biocompatible, osteoconductive, and osteoinductive (albeit to a lesser degree) properties are used [1,6].

The aim of the present study was to analyse radiologically and histologically the healing process in bone defects after implantation of a novel substitute material to rabbit tibiae. The biomaterial tested is a composite consisting of two phases: (1) porous carbonated hydroxyapatite (CHAP) granules and (2)  $\beta$ -1.3-glucan. Hydroxyapatite (HAP) exhibits chemical similarity with the bone mineral phase, and is an appreciated component of bone substitutes due to its biocompatibility, osteoconductivity, bioactivity and minimal risks of allergic reactions [7,8]. The second component accounts for elasticity of the composite and may be used as a drug delivery vehicle [9,10].

## Materials and Methods

### Composite preparation

Cylindrical implants 4 mm in diameter and 6 mm in length were prepared by mixing carbonated HAP granules [11] with polysaccharide polymer according to the procedure described in patent document [12]. Two fractions of CHAP granules were used, i.e. 0.2-0.3 mm and 0.4-0.6 mm, having the following properties: effective porosity – 66%, soaking capacity – 68%, bulk density – 0.97 g/cm<sup>3</sup>. Composite samples were dried at 37°C for 4 days, put into sterilization reels and sterilized by ethylene oxide (55°C, 5 h).

### Implantation procedure

The experimental animals were 22 New Zealand white rabbits (bucks), aged 6 month and weighing 3-3.5 kg. Rabbits were divided into experimental group (16 animals) and control group (6 animals).

The rabbits were premedicated with medetomidine (Domitor®, Orion Corp., Finland; dose 80-150 mg/kg). Anesthesia was induced with ketamine (Bioketan®, Biowet, Poland; 30-50 mg/kg). After shaving and disinfection, a straight 3 cm incision was made over the proximal tibial metaphysis. A hole, 4 mm in diameter and 6 mm in depth, was drilled 2.5-3 cm below the epiphyseal cartilage. The cavities were filled with the composite material and the skin was sutured (Dexon 3-0, Tyco Healthcare, UK). Both tibiae of each rabbit were operated on. Control animals were under the same operation, but was not drilled, neither implanted with material.

Half of the experimental and half of the control rabbits were sacrificed (Morbital®, Biowet, Poland; 3-8 ml/kg) one month and the rest three months after surgery. The left isolated tibiae were radiologically examined and secured for histological analysis.

The protocol was approved by the Local Ethic Committee for Animal Studies (agreement no 16/2010).

Połowę zwierząt grupy kontrolnej i doświadczalnej poddano eutanazji (Morbital®, Biowet, Polska; 3-8 ml/kg m.c.) po pierwszym miesiącu, a drugą połowę w trzecim miesiącu eksperymentu. Wyizolowane lewe kości piszczelowe poddano badaniu radiologicznemu, a następnie zabezpieczono do badań histologicznych.

Procedura implantacyjna została zatwierdzona przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (zgoda nr 16/2010).

### Badania radiologiczne

Radiogramy kości piszczelowych wykonano za pomocą aparatu rentgenowskiego ZooMax (Control-X Medical, USA) w 3 projekcjach: bocznej (lateralis), (przednio-tylnej (anterior-posterior AP) oraz skośnej (oblique). Parametry ekspozycji były następujące: 40 kV, 30 mA, 300 mAs, bez zastosowania kratki przeciwróżniowatej.

### Badania histologiczne

Do oceny histologicznej pobrano ok. 2 cm fragmenty kości w części przynasady bliższej prawej kości piszczelowej. Wykorzystano 2 metody do analizy histologicznej, w celu wykluczenia wpływu preparatyki na uzyskane obrazy tkanki kostnej i implantu. Połowę materiału kostnego z każdej grupy utrwalono w 4% roztworze zobojętnionej formaliny (pH 7.2; POCH, Polska), odwapniono w roztworze kwasu wersenowego (EDTA, pH = 7; POCH, Polska), odwodniono w szeregu roztworów etanolu o wzrastającym stężeniu, a na końcu w ksylenie. Zatopiono w bloczki parafinowe (Paraplast, Sigma Aldrich, USA), a następnie krojono na skrawki o grubości 7-10 µm przy zastosowaniu mikrotomu rotacyjnego (Microm, Niemcy). Druga połowa fragmentów kości została odwapniona w roztworze EDTA, a następnie zatopiona w żelu OCT (Optimal Cutting Temperature medium; CellPath, Wielka Brytania) i zamrożona w ciekłym azocie. Zamrożony materiał krojono na skrawki grubości 7-10 µm przy zastosowaniu kriotomu (Thermo Scientific, USA). Uzyskane skrawki barwiono hematoksyliną - Ht i eozyną - E (Sigma Aldrich, USA). Oceny struktury trzonu kości dokonano przy zastosowaniu mikroskopu świetlnego Axiovert 200M i kamery AxioCam HR3 (Carl Zeiss Germany). Zastosowano obiektywy Plan Neofluar 40x.

## Wyniki i dyskusja

Kompozyt dwufazowy hydroksyapatytowo-polimerowy był łatwy w przygotowaniu i wykazywał dobrą poręczność chirurgiczną. Przejawiał adaptację do kształtu i wymiarów ubytku kostnego oraz utrzymywał się w miejscu implantacji.

Po operacji nie zaobserwowano działań niepożądanych, związanych z wszczepieniem implantu. Do czasu uśpienia zwierzęta pozostały zdrowe.

### Badania radiologiczne makroskopowe

RYS. 1A przedstawia radiogramy kości piszczelowej królika z grupy kontrolnej w projekcjach przednio-tylnej (AP), bocznej i skośnej.

W 1-miesięcznej grupie doświadczalnej zlokalizowanie implantów było stosunkowo łatwe i możliwe do wykonania za pomocą zdjęć radiologicznych. Obraz radiologiczny miejsc implantacji badanych kompozytów, był podobny we wszystkich preparatach. W obrębie struktury gąbczastej guzowatości większej kości piszczelowej jest widoczny początek procesu naprawczego. Na radiogramach z wszczepami, po 1-miesięcznym procesie gojenia, widoczne są obszary inicjowania i stymulacji procesów odbudowy kości (RYS. 1B).

### Radiological examination

Anteroposterior, lateral and oblique macroradiographs of the tibiae were taken at the end of the observation periods (ZooMax X-ray generator, Control-X Medical, USA). The exposure parameters were: 40 kV, 30 mA, 300 mAs, without the use of an anti-diffusion grid.

### Histological analysis

Approximately 2-cm fragments of the proximal right tibial metaphysis were sampled for the histological analysis. Two techniques for histological analysis were used to exclude a possible influence of preparation on final images of bone tissue and implant. Half of the bone material was fixed in solution of 4% phosphate-buffered formalin (pH 7.2; POCH, Poland), decalcified in ethylenediaminetetraacetic acid solution (EDTA, pH = 7; POCH, Poland), dehydrated through ethanol solutions and cleared in xylene (POCH, Poland). Then embedded in paraffin blocks (Paraplast, Sigma Aldrich, USA) and cut into 7-10 µm thick sections using the rotation microtome (Microm, Germany). The second half of the bone samples were decalcified in EDTA solution, embedded in optimal cutting temperature medium (OCT, CellPath, UK), and frozen in liquid nitrogen. The frozen material was cut into 7-10 µm thick sections using a cryotome (Thermo Scientific, USA). The sections were stained with haematoxylin - Ht and eosin - E (Sigma Aldrich, USA). The structure of the diaphysis was assessed using the Axiovert 200M light microscope and the AxioCam HR3 camera (Carl Zeiss Germany). Plan Neofluar 40x lenses were applied.

## Results and Discussion

The two-phase hydroxyapatite-glucan composite was easy-to-prepare and proved high operational handiness. The material indicated adaptability to the shape/size of the bone cavity and held steady in implantation site.

After the operation, no adverse reaction occurred. All the animals remained in good health.

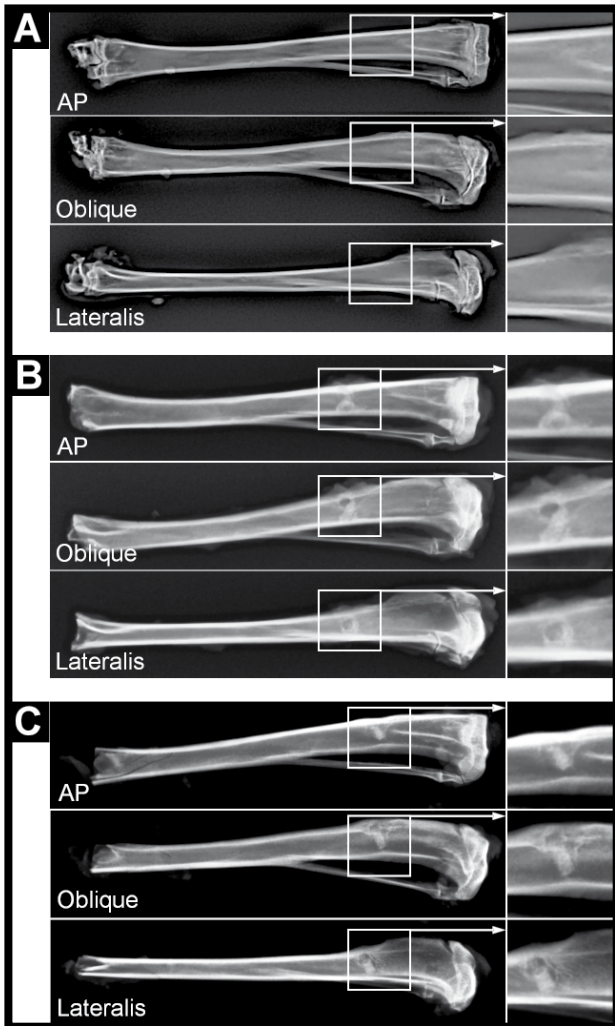
### Radiological macroscopic examination

FIG. 1A presents anteroposterior (AP), oblique and lateral radiographs of control rabbit tibiae.

In the 1-month experimental group, the implants were easily localised using radiography. The radiographs of implantation places of the composites were similar in all the specimens. The initial stage of regeneration was observed within the cancellous bone of tibial tuberosity. The radiographs with implants after one-month healing showed the areas where bone regeneration was initiated and stimulated (FIG. 1B). Around the implants, an irregular fibrocartilage callus appeared in the form of thickened tangled bone trabeculae characteristic of the cancellous bone. In two cases, the fibrocartilage callus of the rim of the regeneration process was visible as the cortical bone: in the remaining cases, the implants were loosely connected to the bone. The cortical bone remaining in direct contact with the implant retained its proper structure. In the abovementioned specimens, there was no septic inflammation observed. Tuberosities of the tibia had proper shape, size and density. The areas of drilling in the periosteum and cortical bone demonstrated that the composite material adhered to the bone void edge tightly, with the exception of three specimens, in which resorption distinctly outweighed productive osseous changes.

During the third post implantation month, the implant penetration by the osseous tissue was more advanced. The mineralization of the osseous tissue directly adhering to the implant was only slightly higher than after 1 month.



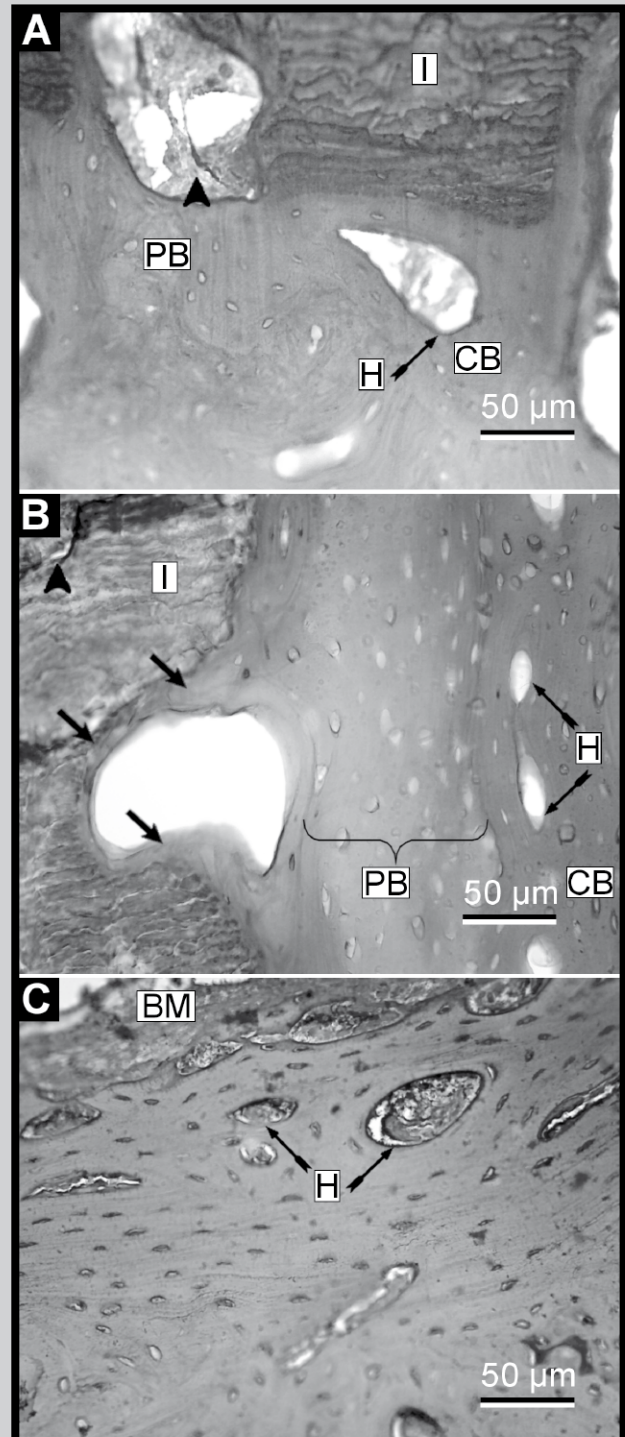


**RYS. 1.** Radiogramy kości piszczelowych królików w projekcjach przednio-tylnej (AP), bocznej i skośnej. A) kość grupy kontrolnej, B) kość z implantem po 1 miesiącu, C) kość z implantem po 3 miesiącach.

**FIG. 1.** Anteroposterior (AP), oblique and lateral radiographs of rabbit tibiae. A) control bone, B) bone with implant after 1 month, C) bone with implant after 3 months.

Wokół wszczepów pojawiła się nieregularna kostnina w postaci pogrubiałych, splecionych beleczek kostnych charakterystycznych dla istoty gąbczastej. W dwóch preparatach kostnina obwódki procesu naprawczego przyjmowała obraz istoty zbitiej kości, a w pozostałych przypadkach wszczepy były luźno związane z kością. Tkanka kostna zbita będąca w bezpośrednim kontakcie z wszczepem, zachowywała prawidłową budowę. Guzowatości piszczelowe większe miały prawidłowy kształt, wielkość i wysycenie cieniowe. Uwidocznione miejsca nawiercania okostnej i struktury zbitiej kości świadczą o ścisłym przyleganiu materiału kompozytowego do krawędzi ubytku kostnego. Wyjątkami są 3 preparaty, w których widać wyraźną przewagę resorpcji nad zmiernymi wytwórczymi.

W 3 miesiącu po wszczepieniu obszar penetracji implantu tkanką kostną był pełniejszy. Mineralizacja tkanki kostnej bezpośrednio przylegającej do implantu jest w niewielkim stopniu wyższa, niż po 1 miesiącu. Wszczepy były ściśle zintegrowane z kością z wyjątkiem jednego preparatu, w którym doszło do częściowej resorpcji zaimplantowanego materiału. W dwóch przypadkach, w bezpośrednim sąsiedztwie materiału implantacyjnego, wyraźnie cieniuje warstwa wiążąca powierzchnie wszczepu z pierwotną tkanką kostną (RYS. 1C).



**RYS. 2.** Fragment przekroju poprzecznego trzonu, w części przynasadowej nasady bliższej kości piszczelowej królików po zabiegu chirurgicznego wszczepienia biomateriału (po 1 miesiącu – A, po 3 miesiącach – B oraz grupy kontrolnej – C. BM – szpik kostny, H – osteon, PB – kość splotowata, CB – kość zbita, I – implant; grotem zaznaczono uszkodzenia w obrębie implantu; strzałką zaznaczono kość wnikającą w implant. Barwienie H+E (powiększenie 400x).

**FIG. 2.** Cross section of the diaphysis in the metaphyseal proximal tibia after surgical implantation of the biomaterial (after 1 month – A, after 3 months – B and in control rabbits – C. BM – bone marrow, H – osteone, PB – plexiform bone, CB – cortical bone, I – implant; the arrowhead indicates damage within the implant; the arrow indicates the bone penetrating the implant. H+E staining (400x magnification).



W kolejnych czterech preparatach obszar penetracji wykazuje wyraźne nieregularne „punktowe” rozdzielanie materiału kompozytowego z bardzo rozwiniętym procesem osteogenezy. Wysycenie cieniowe tkanki kostnej penetrującej implant rozwija się osiągając poziom charakteryzujący tkankę kostną w okresie ich progresji rozwojowej. Zaciemnienie badanego implantu zarówno 1 jak i 3 miesiące po wszczępieniu jest wyraźne i porównywalne do implantów składających się z granul hydroksyapatytowych [13] i cementów fosforanowo-wapniowych (TCP) [14].

### Analiza obrazu mikroskopowego

W części przynasadowej kości piszczelowej u królików (1 miesiąc po chirurgicznym zabiegu umieszczenia implantu) na podstawie analizy mikrofotografii stwierdzono nieznaczne zespolenie materiału z tkanką kostną, bez widocznych oznak wnikania tkanki kostnej w biomateriał. W niektórych obszarach kontaktu kości z implantem stwierdzono wytworzenie nieznacznej ilości tkanki kostnej splotowatej (RYS. 2A). W bezpośrednim sąsiedztwie kości splotowatej i biomateriału zaobserwowano występowanie tkanki kostnej zbitej jeszcze bez oznak przebudowy (RYS. 2A).

Kości piszczelowe 3 miesiące po zabiegu wszczępienia implantu, cechowały się znacznym stopniem osteointegracji biomateriału z tkanką kostną. Na granicy kości i implantu stwierdzono warstwę tkanki splotowatej, która miejscami wnikała w biomateriał. Warstwa kości splotowatej przechodziła w tkankę kostną zbitą posiadającą liczne osteony (RYS. 2B).

Zauważalne było, że w trakcie preparatyki histologicznej biomateriał po 1 miesiącu często ulegał wypadaniu lub uszkodzeniu (RYS. 2A), natomiast po 3 miesiącach odnotowano jedynie nieznaczne uszkodzenia implantu (RYS. 2B), co pokrywa się z powyższymi spostrzeżeniami dotyczącymi integracji biomateriału z tkanką kostną.

Dla porównania struktury tkanki kostnej z implantem wykonano preparaty kontrolne kości piszczelowych bez ingerencji chirurgicznej. W części przynasadowej kości piszczelowych królików grupy kontrolnej ściana kości zbitej z obecnymi licznymi osteonami graniczyła ze szpikiem kostnym poprzedzielanym beleczkami kostnymi (RYS. 2C).

Wrastanie tkanki kostnej w pory wszczępionego w nią implantu, postępowало w czasie, jednakże po 3 miesiącach, obserwuje się tworzenie nowej kości jedynie na obwodzie wszczępionego materiału. Podobne rezultaty otrzymali Uchida i in., po wszczępieniu ceramiki hydroksyapatytowej do ubytków w kościach u ludzi [15]. W przeciwieństwie do wyników Scarano i in., badających implanty zawierające hydroksyapatyt pochodzący z alg, nie zaobserwowaliśmy tworzenia się nowej tkanki kostnej w centralnej części wszczępionego biomateriału [16].

### Wnioski

Badany biomateriał, oparty na hydroksyapatycie węglanowym, wykazuje bioaktywność i biogodność z tkanką kostną organizmu. W przeprowadzonym badaniu pilotażowym nie zaobserwowano zjawiska odrzucenia wszczępiów, lecz stwierdzono postępujący w czasie proces osteointegracji kompozytu CHAP-glukan z kością. Radiogramy kości piszczelowych 1 miesiąc po zabiegu przedstawiają ściśle przyleganie materiału kompozytowego do krawędzi ubytku kostnego, natomiast w badaniu histologicznym zauważono początek procesu integracji z tkanką kostną. W 3 miesiącu po wszczępieniu bardziej zaawansowane procesy osteointegracji i przebudowy kostnej w okolicy implantu, wskazują zarówno na osteokonduktywne, jak i osteoindukcyjne właściwości badanego biomateriału.

The implants were closely integrated with the bone, except for one specimen, in which partial resorption of the implemented material was observed. In two cases, in the close vicinity of the implanted material, the layer joining the surface of the implant with the original osseous tissue was distinctly visible (FIG. 1C). In the other four specimens, the penetration area showed distinct irregular “spot” separation of the composite material, with a highly advanced ossification process. The shadow saturation of the osseous tissue penetrating the implant increased to the point characterising the osseous tissue during its developmental progression. Radiopacity derived from the tested biomaterial, one and three month after implantation, was evident and similar to implants consisting of HAP granules [13] and TCP cements [14].

### Microscopic image analysis

One month after surgical implantation, the microimaging analysis demonstrated that the metaphysis of the tibial bone exhibited slight fusion of the material with the bone tissue without discernible signs of penetration of the bone tissue into the biomaterial. A small amount of plexiform bone tissue was found in some areas of the bone-implant contact (FIG. 2A). The cortical bone tissue without visible signs of remodelling was found in the immediate vicinity of the plexiform bone and biomaterial (FIG. 2A).

Three months after the surgical implantation, the tibial bones were characterized by a considerable osteointegration of the biomaterial with the bone tissue. At the border of the bone and implant, a layer of osteoblast-rich plexiform tissue penetrating into the biomaterial was found. The plexiform bone layer passes with the cortical bone tissue that contained numerous osteones (FIG. 2B).

During histological preparations, the biomaterial after 1 month was often lost or damaged (FIG. 2A), whereas after 3 month only inconsiderable damage to the biomaterial was observed (FIG. 2B). That agrees well with above observations about implant osseointegration.

In order to compare the bone tissue structure with the implant, control tibial bone preparations were performed without surgical interference. In the tibial bone metaphyses of control rabbits, the cortical bone wall containing numerous osteones was adjacent to the bone marrow interspersed among trabeculae (FIG. 2C).

Bone ingrowth into the pores increased with time, however, specimens taken three months after implantation showed newly formed bone only around the implanted material in the margins of a cavity. Uchida et al. demonstrated comparable findings, after implantation calcium hydroxyapatite ceramic (CHA) into human bones [15]. The present study, contrary to Scarano et al., who examined implants consisting of algae-derived hydroxyapatite, do not report formation of a new bone, inside the central portion of the biomaterial particles [16].

### Conclusions

This pilot study confirms bioactivity and biocompatibility of the newly developed biomaterial comprising a mixture of carbonated hydroxyapatite and glucan. Our findings reveal progressive osseointegration of implants, no implant rejections were observed. Radiographs of rabbit tibiae one month after implantation demonstrate that the composite material adheres tightly to the edge of bone cavity and the microscopic analysis indicates the initiation of integration with the bone tissue. Osseointegration is more advanced in the 3-month experimental group. Moreover, extensive bone remodelling in the direct vicinity of implants suggests osteoinductive and osteoconductive properties of the material tested.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż badany kompozyt jest odpowiedni do wypełniania ubytków kostnych u zwierząt.

## Podziękowania

Pracę współfinansowano ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, grant nr. UDA-POIG 01.03.01-00-005/09-01 oraz DS2/12 Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W trakcie badań wykorzystano sprzęt zakupiony w projekcie realizowanym zgodnie z umową nr PORPW.01.03.00-06-010/09-00 w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi Priorytetowej I: Nowoczesna Gospodarka, Działanie 1.3. Wspieranie innowacji.

The biomaterial used in our study stimulates bone regeneration and can be used as a filler for bone defects.

## Acknowledgements

The authors would like to acknowledge that the financial assistance for this research was provided by the European Regional Development Fund within the Innovative Economy Operational Programme, grant No UDA-POIG 01.03.01-00-005/09-01 and by DS2/12 of Medical University in Lublin. The paper was developed using the equipment purchased within the agreement No. PORPW.01.03.00-06-0109-00 Operational Program Development of Eastern Poland 2007-2013, Priority Axis I: Modern Economy, Operations 1.3. Innovations Promotion.

## Piśmiennictwo

- [1] Pielka S., Paluch D., Staniszevska- Kuś J., Solski L.: Badania biogodności materiałów implantacyjnych. Biomateriały pod red. Błażewicz S., Stoch L. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 6 (2003) 425-482.
- [2] Damien C.J., Parsons J.R., Benedict J.J., Weisman D.S.: Investigation of hydroksyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. J Biomed Mat Res (1990) 639-654.
- [3] Turner T.M., Urban R.M., Gitelis S., Haggrrd W.O., Richelsof K.: Resorption evaluation of a large bolus of calcium sulfate in a canine medullary defect. Orthopedics 26 (2003) 577-579.
- [4] Perry J.D., Goldberg R.A., McCann J.D., Shorr N., Engstrom R., Tong J.: Bovine hydroksyapatite orbital implant: a preliminary report. Ophthal Plast Reconstr Surg 4 (2002) 268-274.
- [5] Pratt J.N., Griffon D.J., Dunlop D.G., Smith N., Howie C.R.: Impaction grafting with morsellised allograft and tricalcium phosphate-hydroksyapatite: incorporation within ovine metaphyseal bone defects. Biomaterials 16 (2002) 3309-3317.
- [6] Vaccaro A.R.: The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics 25(5) (2002) 571-578.
- [7] Chang B., Lee C., Hong K., Youn H., Ryu H., Chung S., Park K.: Osteoconduction at porous hydroksyapatite with various pore configurations. Biomaterials 21(12) (2000) 1291-1298.
- [8] Sopyan I.I., Mel M.M., Ramesh S.S., Khalid K.A.: Porous hydroksyapatite for artificial bone applications. Sci Technol Adv Mater 8(1/2) (2007) 116-123.
- [9] Na K., Park K., Kim S., Bae Y.: Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdian derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). J Control Release 69(2) (2000) 225-236.

## References

- [10] Kim B.S., Jung I.D., Kim J.S., Lee J.H., Lee I.Y., Bok K.: Curdian gels as protein drug delivery vehicles. Biotechnol Lett 22 (2000) 1127-1130.
- [11] Paszkiewicz Z., Ślósarczyk A., Zima A.: Sposób wytwarzania syntetycznego bioceramicznego tworzywa implantacyjnego na bazie hydroksyapatytów węglanowych. 2009; Polish Patent 390048.
- [12] Belcarz A., Ginalska G., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z.: Kompozyt bioaktywny oraz sposób wytwarzania kompozytu bioaktywnego. 2009; Polish Patent 387872.
- [13] Imaizumi H., Sakurai M., Kashimoto O., Kikawa T., Suzuki O.: Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroksyapatite in rabbit bone marrow. Calcif Tissue Int 78 (2006) 45-54.
- [14] Sanzana E.S., Navarro M., Macule F., Suso S., Planell J.A., Ginebra M.P.: Of the in vivo behavior of calcium phosphate cements and glasses as bone substitutes. Acta Biomater 4 (2008) 1924-33.
- [15] Uchida A., Araki N., Shinto Y., et al.: The use of calcium hydroksyapatite ceramic in bone tumour surgery. J Bone Joint Surg [Br] 72-B (1990) 298-302.
- [16] Scarano A., Perrotti V., Degidi M., Piattelli A., Iezzi G.: Bone regeneration with algae-derived hydroksyapatite: a pilot histologic and histomorphometric study in rabbit tibia defects. Int J Oral Maxillofac Implants. 27(2) (2012) 336-40.

## MODEL MATEMATYCZNY DO WYZNACZANIA PARAMETRÓW FORMOWANIA NANORUREK $TiO_2$ PODCZAS ANODOWANIA

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK\*, KATARZYNA ARKUSZ,  
AGNIESZKA KACZMAREK

ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI  
UL. LICEALNA 9, 65-417 ZIELONA GÓRA

\* E-MAIL: E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

### Streszczenie

Celem badań było opracowanie modelu matematycznego opisującego formowanie nanorurek z tlenku tytanu (TNT) na folii tytanowej metodą anodowania. Równania uwzględniające wpływ parametrów anodowania na wybrane cechy morfologiczne TNT posłużą do wyznaczenia i optymalizowania parametrów anodowania: potencjału, czasu i stężenia składnika organicznego elektrolitu, w celu uzyskania TNT o pożądanej średnicy i długości. W pracy stosowano dwa organiczne elektrolity - glikol etylenowy i glicerol, resztę stanowiła woda z dodatkiem 0,65% wag.  $NH_4F$ . Wynikiem pracy są równania i wykresy opisujące zależności pomiędzy parametrami anodowania (dane wejściowe), a cechami morfologicznymi TNT (dane wyjściowe). Poprawność modelu została sprawdzona poprzez ocenę morfologii TNT wytworzonych zgodnie ze wskazaniami modelu. Wyniki potwierdzają możliwość przewidywania średnicy i długości TNT, tj. grubości ich warstwy na folii tytanowej na podstawie modelu. W celach aplikacyjnych konieczne jest udoskonalenie przedstawionego modelu poprzez redukcję błędów.

**Słowa kluczowe:** model matematyczny, nanorurki z tlenku tytanu, glikol etylenowy, glicerol

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 34-40]

### Wstęp

Od pierwszej publikacji na temat wytworzenia nanorurek  $TiO_2$  (TNT) na tytanie [1] opracowano wiele nowych metod ich formowania. Do tego celu stosowane są między innymi: elektrochemiczne utlenianie [2-4], formowanie z wykorzystaniem szablonu [5] i obróbka hydrotermiczna [6]. Dzięki możliwości uzyskania warstw TNT o dużej jednorodności i kontrolowanej morfologii, najbardziej popularną metodą jest elektrochemiczne utlenianie w roztworach organicznych zawierających fluorki. Na podstawie szeregu prac nad ustaleniem parametrów decydujących o morfologii otrzymanych warstw [2-4,7-12] ustalono, że średnica i długość TNT zależą głównie od zastosowanego napięcia i zawartości w elektrolicie. Ponadto udowodniono, że długość TNT uzależniona jest od czasu anodowania [7,8], podczas gdy średnica TNT od pH, szybkości roztwarzania tlenku i stężenia fluorków [9,10]. Wiadomo także, że struktura TNT determinuje ich właściwości użytkowe [13,14]. Tak więc, możliwość doboru parametrów anodowania pozwalających otrzymać TNT o pożądanych cechach morfologicznych jest bardzo przydatna w zastosowaniach praktycznych inżynierii biomedycznej [15].

## A MATHEMATICAL MODEL FOR SELECTION OF FORMATION PARAMETERS OF $TiO_2$ NANOTUBE BY ANODIZING

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK\*, KATARZYNA ARKUSZ,  
AGNIESZKA KACZMAREK

BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION, UNIVERSITY OF ZIELONA GORA,  
LICEALNA 9, 65-417 ZIELONA GORA, POLAND

\* E-MAIL: E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

### Abstract

A mathematical model to determine parameters of anodic formation of titania nanotubes (TNT) on titanium foil has been elaborated. Equations include the influence of voltage, time of anodization and concentration of organic component of electrolyte on the selected morphological features of TNT: diameter and length of nanotubes. The developed model can be used to predict and optimize the anodization parameters to obtain nanotubes of desired diameter and length. Two organic electrolytes, ethylene glycol and glycerol, have been used, the rest of electrolyte being water with addition of 0.65 wt%  $NH_4F$ . The equations and graphs showing the correlations between the anodizing and morphological parameters are presented. The correctness of the model has been tested by comparing the parameters of produced nanotubes with parameters indicated by the model. Results confirm the possibility to predict the diameter and the length of TNT formed by anodizing of titanium in two organic solutions with small addition of fluorides and obtain TNT of desired morphology for biomedical applications.

**Keywords:** titania nanotubes, ethylene glycol, glycerol, anodizing, mathematical model

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 34-40]

### Introduction

Since the first report on titania nanotubes (TNT) formation [1] many other methods, as for instance: the electrochemical oxidation [2-4], assisted-template method [5], hydrothermal treatment [6] have been used for TNT fabrication. Due to the possibility to obtain highly homogeneous and controlled morphology TNT, the anodizing in fluorides containing organic electrolytes has been the most popular method. On the basis of several attempts to determine the parameters influencing on morphology of TNT [2-4,7-12] it was revealed that the diameter and the length of TNT depend mainly on the applied voltage and water content. Moreover, it has been proved that the length of TNT depends on the anodizing time [7,8], whereas the diameter on pH, oxide dissolution rate and fluoride concentration [9,10]. It is well known that the structure of TNT effects their application properties [13,14]. Thus, the ability to select the formation parameters to obtain TNT of the desired morphological features would be very useful for practical purposes in biomedical engineering [15].



Obecnie metodą anodowania można otrzymać nanorurki o zróżnicowanych wymiarach. Poza nielicznymi pracami [7,8] nie ma wielu danych literaturowych lub eksperymentalnych prezentujących model matematyczny pozwalający na dobór parametrów anodowania w celu otrzymania TNT o pożądanych cechach morfologicznych. Ta praca ma na celu opracowanie takiego modelu dla dwóch elektrolitów organicznych zawierających stałą ilość dodatku fluorku amonowego. Model taki byłby pomocny przy formowaniu TNT o przewidywanej morfologii.

## Materiały i metody

### Materiały

Folia tytanowa (czystość 99,9%, grubość 0,5 mm), glicerol (czystość 99%), glikol etylenowy (czystość 99,8%), chlorek amonu  $\text{NH}_4\text{F}$  zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (UK). Wszystkie roztwory sporządzono z odczynników o czystości analitycznej i wody destylowanej.

### Wytwarzanie nanorurek tytanowych (TNT)

Próbki folii tytanowej zostały poddane sonifikacji w acetonie, etanolu i wodzie destylowanej, a następnie wysuszone w strumieniu azotu. Nanotubularną warstwę tlenkową wytworzono w procesie anodowania korzystając z potencjostatu AUTOLAB PGSTAT 302N (wyposażonego we wzmacniacz dla wyższych potencjałów) i trójelektrodowego naczynia. Elektrode pomocniczą stanowiła okrągła platynowa blaszka o średnicy 15 mm, elektrodę odniesienia nasyconą elektrodą kalomelową (NEK), natomiast elektrodą pracującą była folia tytanowa, anodowana w elektrolicie zawierającym różne stężenia glicerolu lub glikolu etylenowego z dodatkiem 0,65% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$  - resztę stanowiła woda. Anodowanie przebiegało w 2 etapach: potencjodynamicznym i potencjostatycznym. Podczas pierwszego etapu próbkę folii tytanowej polaryzowano z szybkością 500 mV/s do potencjału określonego w planie eksperymentu, a następnie w etapie drugim utrzymywano przez czas przewidywany planem eksperymentu w tym samych parametrach anodowania. Mikroskop skaningowy z emisją polową (FESEM, JEOL JSM-7600F) wykorzystano do badania morfologii wytworzonych TNT.

### Modelowanie matematyczne

Liczne badania innych autorów oraz wyniki prac własnych [9-11] wskazywały, że potencjał i czas polaryzacji oraz stężenie elektrolitu (dane wejściowe) mają bezpośredni wpływ na średnicę i długość nanorurek (dane wyjściowe). Plan eksperymentu i model matematyczny opracowane zostały przy użyciu oprogramowania STATISTICA i MATLAB. Dane wyjściowe dla opracowywanego modelu przyjęto na podstawie danych literaturowych oraz zakresu parametrów używanego potencjostatu (TABELA 1).

Actually, nanotubes of different dimensions can be obtained by anodizing, but not many literature data or experimental results are available with regard to mathematical model for selection of anodizing parameters to obtain TNT of desired morphology. This work is an attempt to develop such a model for 2 organic electrolytes with constant amount of fluoride aiming at formation of titania nanotubes of a predicted morphology.

## Materials and Methods

### Materials

Titanium foil (99.9%, 0.5 mm thick), glycerol ( $\geq 99\%$ ), ethylene glycol ( $\geq 99.8\%$ ) and ammonium fluoride  $\text{NH}_4\text{F}$  were purchased from Sigma-Aldrich (UK). All electrolytes were prepared from high purity reagents and distilled water.

### Preparation of titanium dioxide nanotubes

The samples of titanium were sonicated in acetone, ethanol and distilled water and dried in nitrogen stream. The formation of nanotube oxide layers was performed by anodizing in a three-electrode cell with the use of AUTOLAB PGSTAT 302N, equipped with amplifier for higher voltages. The Ti foil as working electrode, the circular platinum electrode of 15 mm diameter as a counter and the Saturated Calomel Electrode (SCE) as a reference electrode, were used for all measurements. The titanium foil was anodized using various concentrations of ethylene glycol or glycerol in water with the addition of 0.65 wt%  $\text{NH}_4\text{F}$  in both electrolytes. The formation process consisted of two stages: the first stage was potentiodynamic and the second was potentiostatic. During the first stage the Ti foil was polarized up to the potential specified in experimental plan at the scan rate of 500 mV/s and then it was kept at that potential in the same electrolyte for further period designated in the plan.

Field emission scanning electron microscopy (FESEM, JEOL JSM-7600F) was used to investigate surface morphology and microstructure.

### Mathematical modeling

Several studies by other authors and results of our studies [9-11] indicated that the applied voltage, polarization time and electrolyte composition (adopted as model input data) affect directly on the diameter and length of formed nanotubes (model output data). The experimental plan and mathematical model were elaborated with the use of the STATISTICA and MATLAB software. Due to hardware limitations (the range of potentiostat) and the analysis of the literature the input data of a narrow range (TABLE 1) were adopted forming parameters in the model.

**TABELA 1. Lista parametrów.**  
**TABLE 1. List of parameters.**

	Zmienne odpowiedzi Response variables	Symbol Symbol	Jednostka Unit	Zakres Range
Dane wyjściowe Output data	Potencjał / Potential	U	V	4-30
	Czas polaryzacji / Polarization time	T	min	5-120
	Stężenie / Concentration	Conc	%	85-99
Dane wejściowe Input data	Elektrolit / Electrolyte	R		Glikol etylenowy lub glicerol / Ethylene glycol or glycerol
	Materiał / Material	M		Folia Ti / Ti foil
	Średnica TNT / Diameter of TNT	d	nm	
	Wysokość TNT / Length of TNT	g	nm	

Ze względu na stosowane w procesie formowania dwa rodzaje elektrolitów plan eksperymentu składał się z dwóch części. W TABELI 2 zestawiono parametry tj. potencjał i czas polaryzacji oraz stężenie elektrolitu zgodnie z centralnym planem kompozycyjnym, który pozwala na uzyskanie powierzchni odpowiedzi.

**TABELA 2. Parametry formowania TNT zgodnie z centralnym planem kompozycyjnym.**  
**TABLE 2. Parameters of TNT formation in every measurement by central compositional plan.**

No	U [V]	T [min]	Conc [%]
1	4	5	99
2	30	5	99
3	4	120	99
4	30	120	99
5	4	5	85
6	30	5	85
7	4	120	85
8	30	120	85
9	4	62.5	92
10	30	62.5	92
11	17	5	92
12	17	120	92
13	17	62.5	99
14	17	62.5	85
15	17	62.5	92

## Wyniki i dyskusja

Po anodowaniu próbki poddano analizie mikroskopowej, a uzyskane cechy morfologiczne zestawiono w TABELI 3. Przedstawia ona średnice i długości TNT nanorurek formowanych zgodnie z parametrami zestawionymi w planie eksperymentu. „0” oznacza eksperymenty, w których otrzymana powierzchnia była niejednorodna, gdy nie uzyskano nanorurek lub pomiar ich cech morfologicznych był niemożliwy.

Na podstawie otrzymanych rezultatów możliwe było stworzenie modelu matematycznego opisującego średnicę nanorurek (d) i długość TNT (g), które mogą być opisane poniższymi równaniami:

- TNT formowane w roztworze glikolu etylenowego:

$$d = -12.17 + 1.63 \cdot U + 0.55 \cdot T + 0.53 \cdot \text{Conc} + 0.007 \cdot U \cdot T + 0.042 \cdot U \cdot \text{Conc} + 0.005 \cdot T \cdot \text{Conc} - 0.013 \cdot U^2 - 0.004 \cdot T^2 - 0.034 \cdot \text{Conc}^2$$

$$g = -509.02 + 43.23 \cdot U + 5.57 \cdot T + 73.38 \cdot \text{Conc} + 0.67 \cdot U \cdot T - 1.34 \cdot U \cdot \text{Conc} - 0.32 \cdot T \cdot \text{Conc} - 0.29 \cdot U^2 - 0.034 \cdot T^2 - 2.52 \cdot \text{Conc}^2$$

- TNT formowane w roztworze glicerolu:

$$d = 15.35 + 2.82 \cdot U + 0.6 \cdot T + 3.168 \cdot \text{Conc} + 0.005 \cdot U \cdot T + 0.15 \cdot U \cdot \text{Conc} + 0.022 \cdot T \cdot \text{Conc} - 0.065 \cdot U^2 - 0.005 \cdot T^2 - 0.11 \cdot \text{Conc}^2$$

$$g = -305.21 + 46.41 \cdot U + 5.04 \cdot T - 32.25 \cdot \text{Conc} + 0.16 \cdot U \cdot T + 1.95 \cdot U \cdot \text{Conc} - 0.37 \cdot T \cdot \text{Conc} - 1.01 \cdot U^2 - 0.065 \cdot T^2 + 0.18 \cdot \text{Conc}^2$$

gdzie:

U – napięcie anodowania, V,

T – czas anodowania, min.,

Conc – stęż. organicznego elektrolitu, % wag.

Powierzchnie odpowiedzi prezentujące zależności pomiędzy parametrami formowania, a cechami morfologicznymi TNT dla dwóch stosowanych elektrolitów przedstawiono na RYS. 1.

Due to two types of organic electrolytes used in the formation process the experimental plan was divided into two parts. In TABLE 2 the applied potential U, polarization time T and concentration of organic component of electrolyte Conc (in water as the rest) are listed by the central compositional plan, which allows to create response surfaces.

**TABELA 3. Cechy morfologiczne TNT zgodnie z planem eksperymentu.**  
**TABLE 3. Morphological features of TNT according to the experiment plan.**

U [V]	T [min]	Conc [%]	Ti / glikol etylenowy Ti / ethylene glycol		Ti / glicerol Ti / glycerol	
			Średnica Diameter d [nm]	Wysokość Height g [nm]	Średnica Diameter d [nm]	Wysokość Height g [nm]
4	5	99	0	0	0	0
30	5	99	26.75	575	0	0
4	120	99	0	0	12.87	120
30	120	99	57.58	3250	0	0
4	5	85	0	0	0	0
30	5	85	50.55	750	26.68	120
4	120	85	17.12	150	20.65	120
30	120	85	81.36	2250	89.22	1300
4	62.5	92	16.09	250	11.76	100
30	62.5	92	74.24	2000	46.8	675
17	5	92	22.06	275	0	0
17	120	92	43.64	1850	0	0
17	62.5	99	41.85	1050	0	0
17	62.5	85	49.6	1050	46.92	450
17	62.5	92	48.23	1100	27.61	325

## Results and Discussions

TABLE 3 lists the lengths and diameters of TNT produced according to parameters selected in the experimental plan. '0' marks the experiments in which the surface was heterogeneous, neither TNT were obtained, nor nanotubes features were measurable.

On the basis of the obtained results the mathematical model for the diameter (d) and the length (g) of titania nanotubes was elaborated. The diameter and length of formed TNT could be described by following equations:

- for TNT formed in ethylene glycol solution:

$$d = -12.17 + 1.63 \cdot U + 0.55 \cdot T + 0.53 \cdot \text{Conc} + 0.007 \cdot U \cdot T + 0.042 \cdot U \cdot \text{Conc} + 0.005 \cdot T \cdot \text{Conc} - 0.013 \cdot U^2 - 0.004 \cdot T^2 - 0.034 \cdot \text{Conc}^2$$

$$g = -509.02 + 43.23 \cdot U + 5.57 \cdot T + 73.38 \cdot \text{Conc} + 0.67 \cdot U \cdot T - 1.34 \cdot U \cdot \text{Conc} - 0.32 \cdot T \cdot \text{Conc} - 0.29 \cdot U^2 - 0.034 \cdot T^2 - 2.52 \cdot \text{Conc}^2$$

- for TNT formed in glycerol solution:

$$d = 15.35 + 2.82 \cdot U + 0.6 \cdot T + 3.168 \cdot \text{Conc} + 0.005 \cdot U \cdot T + 0.15 \cdot U \cdot \text{Conc} + 0.022 \cdot T \cdot \text{Conc} - 0.065 \cdot U^2 - 0.005 \cdot T^2 - 0.11 \cdot \text{Conc}^2$$

$$g = -305.21 + 46.41 \cdot U + 5.04 \cdot T - 32.25 \cdot \text{Conc} + 0.16 \cdot U \cdot T + 1.95 \cdot U \cdot \text{Conc} - 0.37 \cdot T \cdot \text{Conc} - 1.01 \cdot U^2 - 0.065 \cdot T^2 + 0.18 \cdot \text{Conc}^2$$

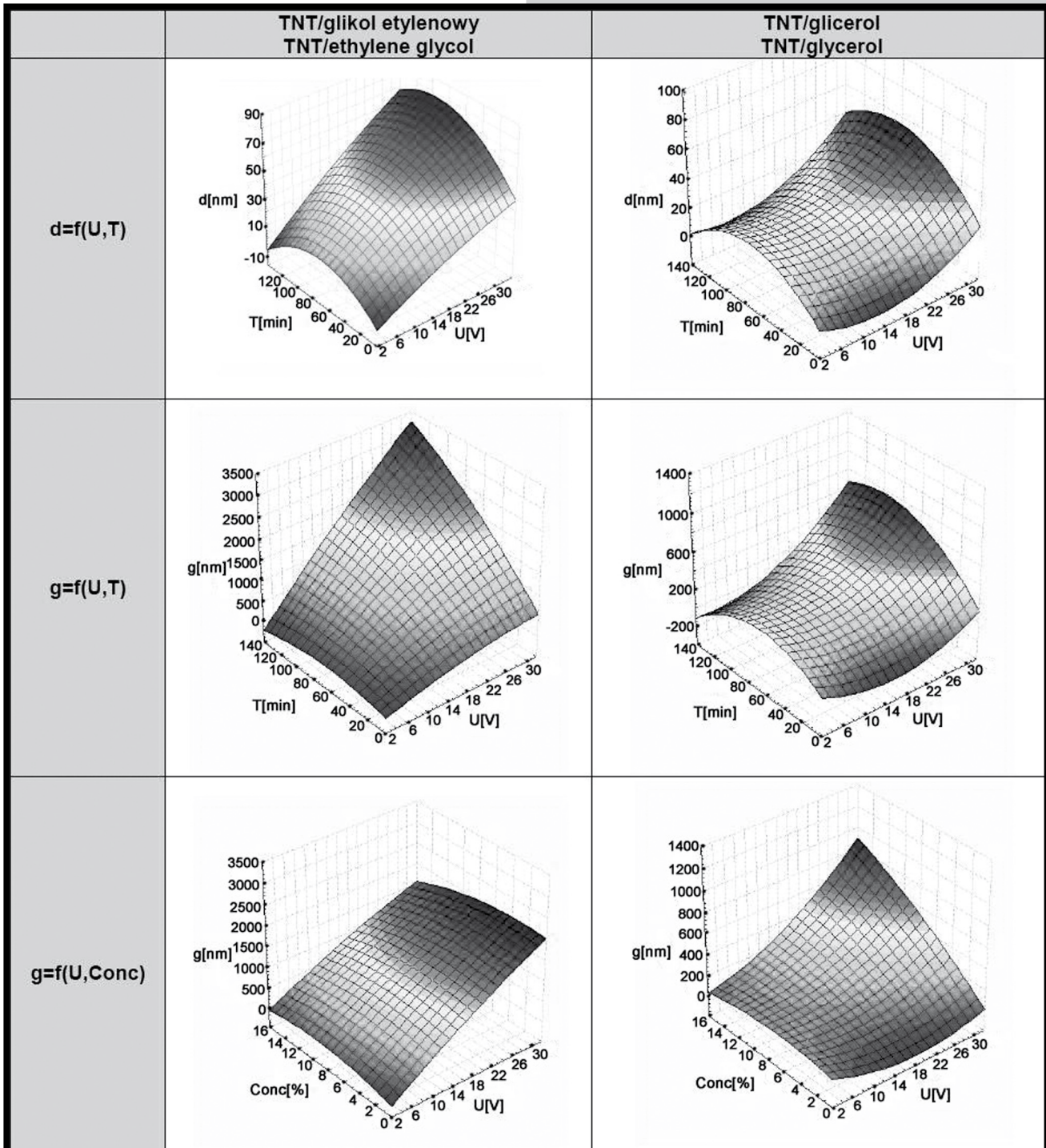
where:

U – applied potential, V,

T – polarization time, min.,

Conc – concentration of organic component of electrolyte, wt%

Response surfaces showing correlations between formation parameters and morphological features (diameter, length) for two applied electrolytes are presented in FIG. 1.



RYS. 1. Powierzchnie odpowiedzi ukazujące korelacje pomiędzy parametrami formowania a cechami morfologicznymi TNT.

FIG. 1. The response surfaces showing correlations between formation parameters and morphological features (diameter, length).

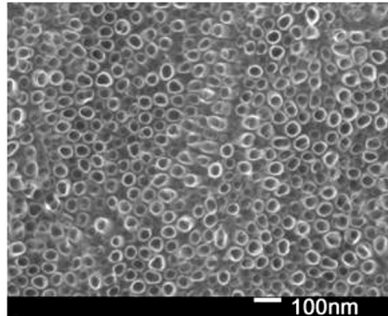
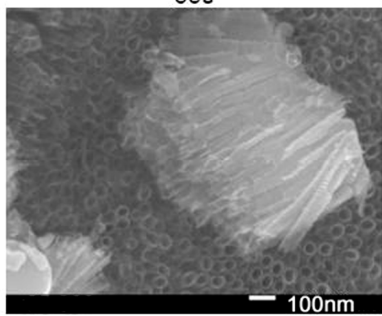
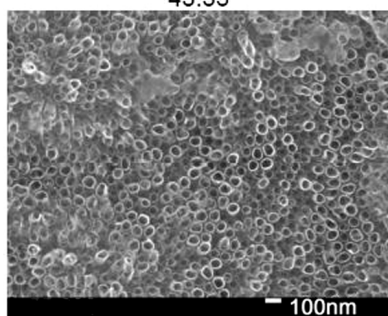
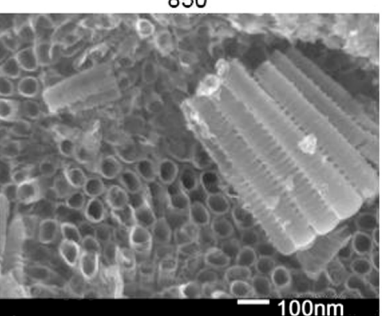
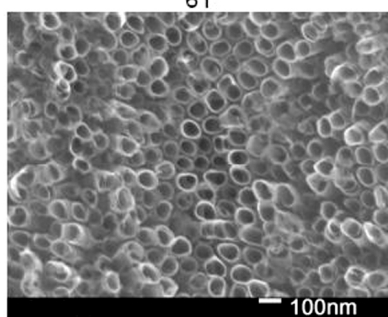
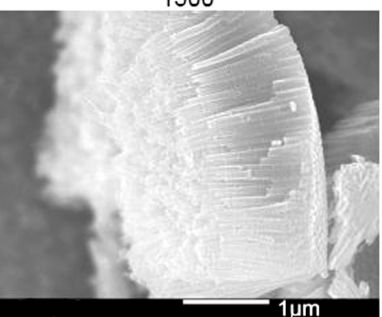
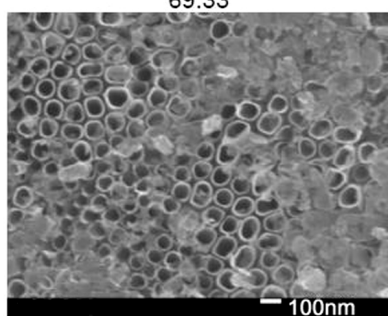
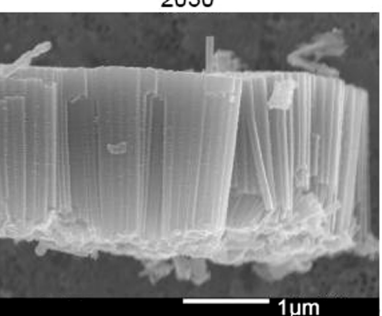
Uzyskane dla każdej przestrzeni macierze korelacji potwierdzają zależności znane z literatury. Zmienne niezależne nie są ze sobą skorelowane (co stanowi założenie planu eksperymentu). Zależności pomiędzy parametrami formowania, a morfologią TNT różnią się w zależności od stosowanego elektrolitu. Na średnice TNT formowanych w roztworze glikolu etylenowego znaczny wpływ wywiera potencjał anodowania, następnie czas polaryzacji, natomiast stężenie glikolu wykazuje naj słabszy wpływ. Średnica nanorurek formowanych w glicerolu zależy od potencjału, następnie od stężenia glicerolu i w niewielkim stopniu od czasu polaryzacji.

For each space the obtained correlation matrices confirm known from the literature relations between formation parameters and morphological features of titania nanotubes. Independent variables are not self-correlated (which is the objective of the experimental plan). The correlation between the formation parameters and the TNT morphology differ in two applied electrolytes. The diameter of TNT formed in ethylene glycol are strongly influenced by voltage, then by anodizing time and the concentration of organic component of electrolyte, which shows the weakest effect. The diameter of nanotubes formed in glycerol strongly depends on voltage, then on the concentration of organic electrolyte, and eventually on the polarization time.

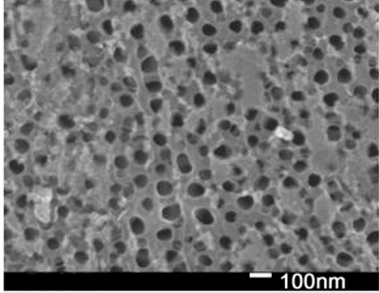
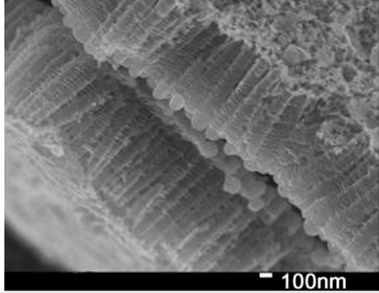
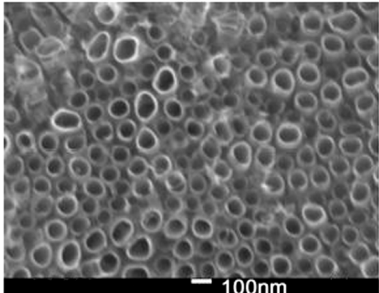
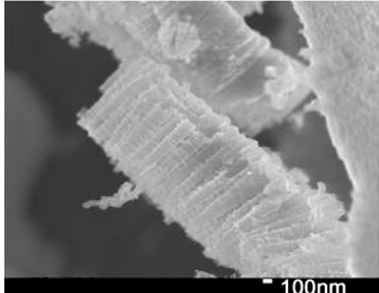
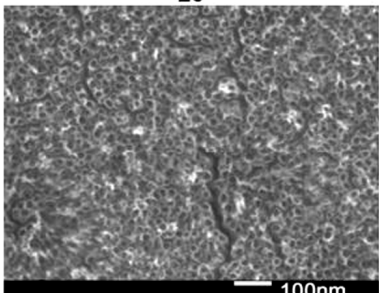
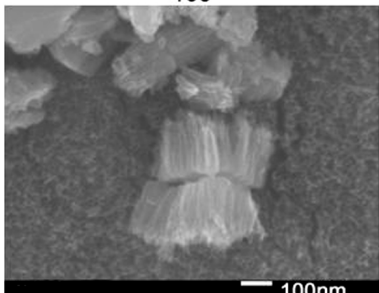
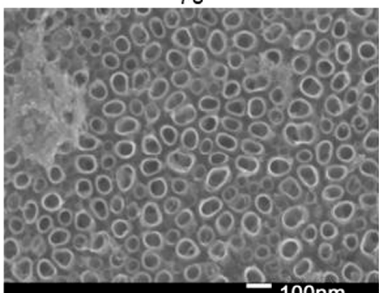
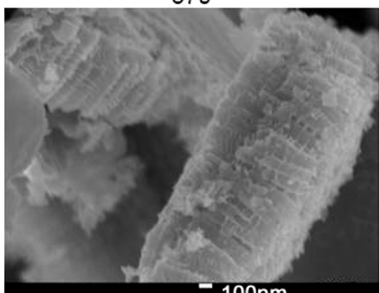


Na długość TNT (wysokość warstwy nanorurkowej na tytanie) największy wpływ wywiera potencjał i czas, natomiast efekt rodzaju i stężenia elektrolitu może być niemal pomijany. W celu sprawdzenia modelu matematycznego przeprowadzono eksperymenty anodowania zgodnie z obliczonymi współczynnikami równań modelu dla zadanych cech morfologicznych TNT. Otrzymane wyniki zestawione na RYS. 2 i 3 potwierdzają poprawność stworzonego modelu.

The length of nanotubes (the thickness of nanotubular layer on titanium) is dependent significantly on voltage and time, whereas the weakest (almost negligible) effect has the concentration of organic component of the electrolyte. To verify the mathematical model, the anodizing experiments according to calculated coefficients of model equations were performed. Obtained results shown in FIG. 2 and 3 confirm the correctness of the elaborated model.

Parametry formowania / Forming parameters				Wyniki eksperymentalne / Experimental results		Wyniki modelu / Model results	
R	U [V]	T [min]	Conc [%]	Średnica / Diameter d1 [nm]	Wysokość / Length g1 [nm]	d	g
glikol etylenowy / ethylene glycol	15	120	90	32.94 	550 	30	580
	17	62.5	85	43.33 	850 	45	890
	30	15	90	61 	1500 	61	1445
	30	120	85	69.33 	2030 	78	2280

RYS. 2. Eksperymentalna weryfikacja modelu matematycznego dla formowania TNT w glikolu etylenowym.  
FIG. 2. Experimental verification of the mathematical model for nanotubes formation in ethylene glycol.

Parametry formowania / Forming parameters				Wyniki eksperymentalne / Experimental results		Wyniki modelu / Model results	
R	U [V]	T [min]	Conc [%]	Średnica / Diameter d1 [nm]	Wysokość / Length g1 [nm]	d	g
glycerol / glycerol	30	90	90	75 	850 	60	800
	30	120	85	100 	1000 	90	1150
	30	120	90	20 	180 	20	100
	30	120	90	70 	870 	60	790

RYS. 3. Eksperymentalna weryfikacja modelu matematycznego dla formowania TNT w glicerolu.  
 FIG. 3. Experimental verification of the mathematical model for nanotubes formation in glycerol.

## Wnioski

Opracowano model matematyczny dla formowania nanorurek z tlenku tytanu na tytanie metodą anodowania roztworach organicznych. Model ten umożliwia dobór parametrów anodowania prowadzącego do otrzymania TNT o zdefiniowanej i pożądanej morfologii. Model matematyczny opisany został za pomocą równań i wykresów powierzchni odpowiedzi. Badania eksperymentalne potwierdzają poprawność modelu. Dalsze badania skupione zostaną na poprawie modelu pod kątem minimalizacji błędów, jednak opracowany model anodowania zgodnie z zastosowanymi parametrami jest uniwersalny.

## Conclusions

The mathematical model for formation titania nanotubes by anodizing in organic electrolytes was elaborated. The developed model enables to select parameters of anodic formation of nanotubes of desired morphology. The mathematical model was described by equations and graphs of response surfaces. Experimental studies confirmed the correctness of the model. Further studies will be focused on improving the model in terms of minimizing the error.

## Podziękowania

Badania zostały sfinansowane z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) w ramach projektu MNT-ERA. NET/01-2011 „Sensory na bazie Ti/nanostrukturalny TiO<sub>2</sub> do zastosowań medycznych”.

## Acknowledgments

This research was supported by the National Centre for Research and Development (NCBiR) under MNT-ERA. NET/01-2011 Project „Nanostructured titanium oxide sensors for biomedical measurements”.

## Piśmiennictwo

- [1] Zwilling V., Aucouturier M., Darque-Ceretti E.: Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach. *Electrochimica Acta* 45 (1999) 21-929.
- [2] Gong D., Grimes C.A., Varghese O.K., Hu W., Singh R.S., Chen Z., Dickey E.C.: Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *J. Mater. Res.* 16 (12) (2001) 3331-3334.
- [3] Ghicov A., Tsuchiya H., Macak J.M., Schmuki P.: Titanium oxide nanotubes prepared in phosphate electrolytes. *Electrochem. Commun.* 7 (5) (2005) 505-509.
- [4] Bauer S., Kleber S., Schmuki P.: TiO<sub>2</sub> nanotubes: tailoring the geometry in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HF electrolytes. *Electrochem. Commun.* 8 (8) (2006) 1321-1325.
- [5] Hoyer P.: Formation of a titanium dioxide nanotube array, *Langmuir* 12 (6) (1996) 1411-1413.
- [6] Ou H.-H., Lo S.-L.: Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: fabrication, modification, and application. *Sep. Purif. Technol.* 58 (1) (2007) 179-191.
- [7] Albu S.P., Roy P., Virtanen S., Schmuki P.: Self-organized TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: Critical effects on morphology and growth. *Isr. J. Chem.* 50 (2010) 453-467.
- [8] Roy P., Berger S., Schmuki P.: TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 2904-2939.
- [9] Krasicka-Cydzik E., Glazowska I., Kaczmarek A., Białas-Heltowski K.: Influence of scan rate on anodic formation of TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Inżynieria Biomateriałów / Engineering of Biomaterials* 77-80 (2008) 48-51.

## References

- [10] Krasicka-Cydzik E., Glazowska I., Kaczmarek A., Białas-Heltowski K.: Influence of fluorides concentration on growth of self-aligned layer of TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Inżynieria Biomateriałów / Engineering of Biomaterials* 77-80 (2008) 46-48.
- [11] Kaczmarek A., Klekiel T., Krasicka-Cydzik E.: Fluoride concentration effect on the anodic growth of self-aligned oxide nanotube array on Ti6AL7Nb alloy. *Surface and Interface Analysis* 42 (2010) 510-514.
- [12] Krasicka-Cydzik E., Kowalski K., Kaczmarek A., Glazowska I., Białas-Heltowski K.: Competition between phosphates and fluorides at anodic formation of titania nanotubes on titanium. *Surface and Interface Analysis* 42(6-7) (2010) 471-474.
- [13] Grimes C. A., Mor G. K.: *TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays*, Springer, 2009.
- [14] H Yin H., H Liu H., Shen W. Z.: The large diameter and fast growth of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotube arrays achieved via electrochemical anodization, *Nanotechnology* 21 (2010) 035601.
- [15] Brammer K.S., Oh S., Cobb C.J., Bjursten L.M., H. van der Heyde, Jin S.: Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomater.* 5 (8) (2009) 3215-3223.



# WSTĘPNA OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI BIOMEDYCZNEGO POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONU) OTRZYMANEGO W OBECNOŚCI OKTANIANU CYNY

KAROLINA ŻÓŁTOWSKA<sup>1</sup>, MARCIN SOBCZAK<sup>1\*</sup>,  
GRZEGORZ NAŁĘCZ-JAWECKI<sup>2</sup>, EWA OŁĘDZKA<sup>1</sup>,  
ANDRZEJ JAKLEWICZ<sup>1</sup>, WACŁAW LECHOSŁAW KOŁODZIEJSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,  
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

<sup>2</sup> WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, ZAKŁAD BADAŃ ŚRODOWISKA,  
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

\* E-MAIL: MARCIN.SOBCZAK@WUM.EDU.PL, MARCIN.SOBCZAK@WP.PL

## Abstrakt

Otrzymano szereg próbek biomedycznego poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL) stosując metodę polimeryzacji z otwarciem pierścienia katalizowanej 2-etyloheksanianem cyny (II). Uzyskane produkty polireakcji poddano operacji oczyszczania z pozostałości po katalizatorze cynoorganicznym. Zawartość metalu w otrzymanych polimerach oznaczano za pomocą elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Toksyczność uzyskanych polimerów oceniano w odniesieniu do bakterii luminescencyjnych oraz dwóch pierwotniaków. Wstępne wyniki zaprezentowane w niniejszym artykule sugerują, że zastosowane operacje oczyszczania redukują zawartość cyny w polimerach bez ich degradacji. Można również stwierdzić, że polimery o zredukowanej zawartości cyny nie wykazują toksyczności w stosunku do bakterii luminescencyjnych *V. fischeri* oraz pierwotniaków *S. ambiguum* i *T. termophila*.

**Słowa kluczowe:** polimery biomedyczne, poliester alifatyczny, poli( $\epsilon$ -kaprolakton), elektrotermiczna absorpcyjna spektrometria atomowa, toksyczność

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 41-45]

## Wprowadzenie

Od wielu lat poliestry alifatyczne są szeroko stosowane w medycynie i farmacji. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) jest używany w wielu obszarach biomedycyny, m.in. w inżynierii tkankowej, w technologii systemów terapeutycznych o przedłużonym uwalnianiu i proleków wielkocząsteczkowych oraz jako materiał opakowaniowy substancji leczniczych. Tak szerokie jego zastosowanie wynika ze zdolności do kontrolowanej degradacji, dobrej mieszalności z innymi polimerami oraz biokompatybilności. PCL w zależności od masy cząsteczkowej, stopnia krystaliczności oraz warunków środowiskowych ulega całkowitej biodegradacji od siedmiu miesięcy do kilku lat [1-5]. PCL otrzymywany jest dwiema metodami, w procesie polikondensacji kwasu 6-hydroksyheksanowego lub na drodze polimeryzacji z otwarciem pierścienia  $\epsilon$ -kaprolaktonu ( $\epsilon$ -CL). Proces polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP) jest częściej stosowany, ponieważ pozwala on na otrzymanie poliestrów charakteryzujących się wyższą masą cząsteczkową oraz niższą polidispersyjnością.

# PRELIMINARY EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF THE BIOMEDICAL POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE)S OBTAINED IN THE PRESENCE OF TIN OCTANOATE

KAROLINA ŻÓŁTOWSKA<sup>1</sup>, MARCIN SOBCZAK<sup>1\*</sup>,  
GRZEGORZ NAŁĘCZ-JAWECKI<sup>2</sup>, EWA OŁĘDZKA<sup>1</sup>,  
ANDRZEJ JAKLEWICZ<sup>1</sup>, WACŁAW LECHOSŁAW KOŁODZIEJSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,  
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,  
1 BANACHA ST., 02-097 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,  
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCE,  
1 BANACHA ST., 02-097 WARSAW

\* E-MAIL: MARCIN.SOBCZAK@WUM.EDU.PL, MARCIN.SOBCZAK@WP.PL

## Abstract

A series of biomedical poly( $\epsilon$ -caprolactone)s were synthesized by the ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in the presence of tin(II) 2-ethylhexanoate. The obtained products were subjected to the purification procedures for removing the residual of tin catalyst. The metal content in the received polymers were determined using the Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. The toxicity of the resulted polymers was evaluated using bacterial luminescence test and two protozoan assays. The preliminary studies presented in this paper suggest that the purification of the polymers reduces tin concentration in the final products without causing product degradation. It was found that the purified polymers are not toxic relative to luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoans *S. ambiguum* and *T. termophila*.

**Keywords:** biomedical polymers, aliphatic polyesters, poly( $\epsilon$ -caprolactone), electrothermal atomic absorption spectroscopy, toxicity

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 41-45]

## Introduction

Aliphatic polyesters are widely used in medicine and pharmacy since many years. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) has been used in different biomedical fields such as scaffolds in tissue engineering, long-term drug delivery systems, macromolecular prodrugs and packaging materials of the medical substances due to its interesting properties like controlled degradability, miscibility with other polymers or biocompatibility. PCL is biodegraded from several months to several years depending on its molecular weight, degree of crystallinity and condition of the degradation [1-5]. There are two methods for the preparation of biomedical PCL: the condensation of 6-hydroxyhexanoic acid and the ring-opening polymerization (ROP) of  $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL). ROP is more often used due to a higher molecular weight and lower polydispersity of the received polyesters. A large number of catalysts and other catalytic systems of ROP (organic-, metal- or enzyme-based) spanning virtually the whole periodic table have been recently investigated [1].

Do chwili obecnej została przebadana ogromna liczba katalizatorów i systemów katalitycznych (organicznych i nieorganicznych zawierających metale lub enzymy) procesu ROP obejmujących praktycznie cały układ okresowy pierwiastków [1]. Mechanizm procesu ROP (anionowy, kationowy, aktywowanego monomeru i insercyjno-koordynacyjny)  $\epsilon$ -CL zależy od zastosowanego katalizatora. Większość biomedycznych poliestrów zawiera śladowe ilości toksycznych zanieczyszczeń metalicznych, co jest niekorzystne z punktu widzenia ich zastosowania w medycynie czy farmacji [1]. 2-etyloheksanian cyny (II) (oktanian cyny,  $\text{SnOct}_2$ ) jest powszechnie stosowany w procesie ROP  $\epsilon$ -CL.  $\text{SnOct}_2$  jest katalizatorem komercyjnym, bardzo efektywnym, łatwo dostępnym na rynku i rozpuszczalnym w większości rozpuszczalników organicznych. Zastosowanie go wraz z czynnikiem nukleofilowym (np. alkoholem lub aminą) pozwala prowadzić proces ROP w sposób kontrolowany. Główną wadą  $\text{SnOct}_2$  jest to, że wymaga on prowadzenia reakcji przy stosunkowo wysokiej temperaturze, co może powodować zwiększenie udziału reakcji ubocznych, tj. transestryfikacji wewnątrz- i międzycząsteczkowej, skutkiem czego jest wzrost rozrzutu masy cząsteczkowej polimeru [1].

Polimerom biomedycznym stawiane są coraz wyższe wymagania pod względem właściwości fizykochemicznych oraz biokompatybilności.  $\text{SnOct}_2$  jest dopuszczony do stosowania w syntezie różnych biomateriałów polimerowych w wielu krajach europejskich oraz USA, brak jest jednak precyzyjnych uregulowań normatywnych. Zgodnie z Farmakopeą Europejską V, maksymalne stężenie cyny w materiałach polimerowych mających kontakt z krwią lub składnikami krwi wynosi 20 ppm [6-8].

Nasze wcześniejsze badania, prowadzone we współpracy z Zakładem Badania Środowiska Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wskazują, że zawartość cyny w polimerach biomedycznych na poziomie kilkudziesięciu ppm może być szkodliwa dla organizmów [2]. W związku z powyższym, głównym celem naszej pracy była ocena cytotoxyczności serii próbek PCL (zawierających różną ilość pozostałości po katalizatorze cynowym) w odniesieniu do bakterii luminescencyjnych *V. fischeri* oraz dwóch pierwotniaków *S. ambiguum* i *T. thermophila*.

## Materiały i metody

### Materiały

$\epsilon$ -Kaproilakton (2-oksepanon, 99%,  $\epsilon$ -CL, Aldrich) przed użyciem był suszony i destylowany z nad  $\text{CaH}_2$  pod zmniejszonym ciśnieniem. 2-etyloheksanian cyny(II) ( $\text{SnOct}_2$ , 97%, Aldrich), chlorek metylenu (cz., POCH), kwas solny (POCH), kwas azotowy(V) (65% m/m,  $d = 1,4 \text{ g/ml}$ , J.T.Baker), wzorzec cyny 1000 mg/l w 2% roztworze  $\text{HNO}_3$  i 1% roztworze HF (J.T.Baker), wzorzec cyny 100  $\mu\text{g/l}$  w 20% roztworze  $\text{HNO}_3$  (V/V), bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri* (SDI, USA), pierwotniaki *Tetrahymena thermophila* (MicroBioTests, Belgium) i *Spirostomum ambiguum* były stosowane bez operacji przygotowawczych.

### Synteza poly( $\epsilon$ -kaproilaktanu)

Polimeryzację z otwarciem pierścienia  $\epsilon$ -CL prowadzono w różnym stosunku molowym monomeru do katalizatora (TABELA 1). Odpowiednią ilość  $\epsilon$ -CL i  $\text{SnOct}_2$  umieszczano w atmosferze argonu w szklanym reaktorze o pojemności 10 ml. Reaktor termostatowano w łaźni olejowej w temperaturze 140°C przez 24 godziny. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną schładzano, rozpuszczano w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a następnie polimer wytrącano w 5% roztworze kwasu solnego. Produkty finalne suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 2-3 dni.

The mechanism of ROP (anionic, cationic, monomer-activated and coordination-insertion) of  $\epsilon$ -CL depends on the catalyst used. The most biomedical polyesters contain the traces of metal pollutants causing their high toxicity thus might be undesirable for pharmaceutical or biomedical applications [1]. The tin(II) 2-ethylhexanoate catalyst (tin octanoate,  $\text{SnOct}_2$ ) is commonly used for ROP of  $\epsilon$ -CL.  $\text{SnOct}_2$  is effective, commercially available, easy to handle and soluble in the most commonly used organic solvents. It must be used together with a nucleophilic compound (alcohol or amine) to initiate the reaction if a controlled synthesis of the polymer has to be obtained. The major drawback of  $\text{SnOct}_2$  is that it requires a high temperature, which encourages inter- and intramolecular transesterification thus broadening the polydispersity [1].

Biomedical polymers are subjected to more and more requirements in consideration to their physicochemical properties and biocompatibility. The  $\text{SnOct}_2$  is approved for using in the synthesis of biomedical PCL in many countries, but without detailed normative regulations in this regard. According to European Pharmacopoeia V the maximum concentration of residual tin in the containers for human blood and blood components has to be 20 ppm [6-8].

Our earlier studies, conducted in collaboration with the Department of Environmental Health Science of Medical University of Warsaw, have shown that doses of several ppm of tin might be harmful to organisms [2]. Thereby, the goal of this work was to determine the content of residual Sn in several PCLs prepared in the presence of  $\text{SnOct}_2$  and their cytotoxicity evaluation using luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoans *S. ambiguum* and *T. thermophila*.

## Materials and methods

### Materials

$\epsilon$ -Caprolactone (2-oxepanone, 99%,  $\epsilon$ -CL, Aldrich) was dried and distilled over  $\text{CaH}_2$  at reduced pressure before use. Tin(II) 2-ethylhexanoate ( $\text{SnOct}_2$ , 97%, Aldrich), methylene chloride (cz., POCH), hydrochloric acid (POCH), nitric acid (v) suprapur (65 % m/m,  $d = 1,4 \text{ g/ml}$ , J.T.Baker), standard of tin 1000 mg/l in 2%  $\text{HNO}_3$  and 1% HF (J.T.Baker), operating standard of tin 100  $\mu\text{g/l}$  in 20%  $\text{HNO}_3$  (V/V), luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (SDI, USA), protozoan *Tetrahymena thermophila* (MicroBioTests, Belgium) and *Spirostomum ambiguum* were used as supplied.

### Synthesis of poly( $\epsilon$ -caprolactone)

The reaction of ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -CL was carried out for different molar ratios of the monomer to catalyst (TABLE 1). The required amount of  $\epsilon$ -CL and  $\text{SnOct}_2$  were placed in a 10 mL glass ampoule under argon atmosphere. The reaction vessel was then kept standing in a thermostated oil bath at 140°C for 24h. When the reaction time was completed, the cold reaction product was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  precipitated from distilled water with diluted hydrochloric acid (5% aqueous solution) and dried under vacuum for 2-3 days.

### Measurements

The polymerization products were characterized by means of  $^1\text{H}$ - or  $^{13}\text{C}$ -NMR (Varian 300 MHz recorded in  $\text{CDCl}_3$ ) and FT-IR spectroscopy (Spectrum 1000, Perkin-Elmer) recorded in KBr pellets.

The molecular weights of the received PCLs were determined by the viscosity techniques. The polymer viscosity was measured in N,N-dimethylformamide (at 30°C) using Stabinger Viscometer SVM 3000. The molecular weights of the resulted polymers were calculated from the Mark-Houwink formula using the following equation constants:  $K = 1.94 \times 10^{-4}$  and  $\alpha = 0.73$ .

## Metody badań

Widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR produktów polimeryzacji zarejestrowano przy zastosowaniu spektrometru Varian 300 MHz w deuterowanym  $\text{CDCl}_3$ , w temperaturze pokojowej. Widma absorpcyjne w podczerwieni rejestrowano przy użyciu spektrometru z transformacją Fouriera firmy Perkin-Elmer (Spectrum 1000) dla próbek w postaci pastylek w KBr.

Masa cząsteczkowa otrzymanych PCL została wyznaczona metodą wiskozymetryczną. Lepkość polimerów mierzono w N,N-dimetyloformamidzie jako rozpuszczalniku (w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ ) stosując aparat Stabinger Viscometer SVM 3000. Masa cząsteczkowa otrzymanych polimerów została obliczona na podstawie równania Marka-Houwinka stosując następujące stałe:  $K = 1.94 \times 10^{-4}$  i  $\alpha = 0.73$ .

Zawartość cyny w PCL została oznaczona metodą elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej przy użyciu spektrometru Avanta Ultra GPC (GBC, Australia) wyposażonego w atomizer elektrotermiczny i autosampler PAL4000. Próbkę polimerów poddawano mineralizacji na mokro przy użyciu stężonego  $\text{HNO}_3$ . Proces prowadzono przez około 30 minut. Po zakończeniu procesu mineralizacji, produkty przenoszono ilościowo do kolbek o pojemności 25 ml i mieszano z wodą destylowaną.

Test Microtox® (bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*) został wykonany przy użyciu bakterii liofilizowanych zakupionych w firmie SDI (USA). Prowadzono go w jednorazowych kuwetach szklanych. Próbkę były inkubowane w temperaturze  $15^\circ\text{C}$  w ciągu 15 minut, a luminescencję rejestrowano przy pomocy analizatora Microtox® M500. Jako rozcieńczalnik i próbę kontrolną zastosowano 2% roztwór NaCl [9].

Test Protoxkit F<sup>TM</sup>: Protoxkit F<sup>TM</sup> to wielopokoleniowy test z zastosowaniem pierwotniaka z grupy orzęsków *Tetrahymena thermophila* (Protoxkit F, 1998). Test oparty jest na przekształceniu substratu (zawiesiny pożywki) w biomasę. Podczas gdy normalnie rozmnażające się hodowle klarują zawiesinę w ciągu 24 godzin, zahamowanie wzrostu kultury odzwierciedla się poprzez pozostające zmętnienie. Test oparty jest na pomiarze gęstości optycznej próbek. Pierwotniak i pożywka zostały zakupione w MicroBio Tests (Belgia). Test przeprowadzono przy użyciu jednorazowych spektrofotometrycznych kuwet zgodnie z protokołem operacyjnym sugerowanym przez producenta. Jako rozcieńczalnik i próbę kontrolną użyto wody dejonizowanej (jakość Mili-Q) [9].

Test Spirotox: test wykorzystujący pierwotniaka *Spirostomum ambiguum* został wykonany zgodnie ze standardowymi regułami postępowania. Przeprowadzono go przy użyciu jednorazowych polistyrenowych mikroplitek (24 studzienki). Dziesięć organizmów zostało dodanych do każdej studzienki z osobna. Próbkę inkubowano w ciemności w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  przez 24 godziny. Następnie odczytano wyniki testu sprawdzając liczbę zdeformowanych pierwotniaków tj. komórek, np. komórek skróconych lub wygiętych. Śmiertelność populacji pierwotniaka obserwowano używając mikroskopu analitycznego (przy 10-krotnym powiększeniu). Jako rozcieńczalnik i próbę kontrolną zastosowano płyn Tyrod'a [9].

## Wyniki i dyskusja

Seria próbek biomedycznego poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL) została otrzymana w procesie ROP  $\epsilon$ -CL katalizowanym przy użyciu 2-etyloheksanianu cyny(II) ( $\text{SnOct}_2$ ) jako katalizatora. Wydajność reakcji oraz wiskozymetryczna masa cząsteczkowa otrzymanych PCL została wyszczególniona w TABELI 1. Proces polimeryzacji był prowadzony w temperaturze  $140^\circ\text{C}$  przez 24 godziny.

The concentration of tin in the received PCLs was determined by atomic absorption spectrometer Avanta Ultra GPC Z spectrometer (GBC, Australia) equipped with electrothermal atomizer and PAL4000 autosampler. The background correction was performed using the longitudinal Zeeman's effect measuring ETAAS signals in the peak height mode. The polymeric samples were subjected to the wet mineralization with the concentrated  $\text{HNO}_3$ . The process was carried out for about 30 min. When the mineralization process was completed, the products were quantitatively moved to 25 mL flask and mixed with distilled water.

Microtox®: Microtox® assay with the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* was performed with the lyophilized bacteria purchased from SDI (USA). The test was performed with the use of disposable glass cuvettes. Samples were incubated at  $15^\circ\text{C}$  for 15 min and the light output of the samples was recorded with a Microtox® M500 analyzer. As a diluent and a control 2% NaCl was used [9].

Protoxkit F<sup>TM</sup>: Protoxkit F<sup>TM</sup> is a multigeneration protozoan growth inhibition bioassay with the ciliate *Tetrahymena thermophila*. The test is based on the turnover of the substrate (food suspension) into ciliate biomass. While normal proliferating cell cultures clear the substrate suspension in 24 hours, inhibited culture growth is reflected by remaining turbidity. The test is based on optical density measurements. The protozoa and the food were obtained from MicroBioTests (Belgium). The test was performed in disposable spectrophotometric cuvettes according to the standard operational protocol of the producer. As a diluents and a control deionised water (Milli-Q quality) was used [9].

Spirotox: Spirotox test with the protozoan *Spirostomum ambiguum* was performed according to the standard protocol. The test was carried out in disposable, polystyrene multiwell plates (24 wells). Ten organisms were added to each well of the multiwell. The samples were incubated in the darkness at  $25^\circ\text{C}$  for 24 hours. Afterwards test responses: different deformations such as shortening, bending of the cell, etc., and lethal response were observed with the use of dissection microscope (magnification of 10). As a diluents and a control Tyrod solution was used [9].

## Results and Discussions

A series of biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)s (PCLs) has been obtained by ROP of  $\epsilon$ -CL catalyzed by tin(II) 2-ethylhexanoate ( $\text{SnOct}_2$ ). The reaction yields and the viscosity molecular weight of the obtained PCLs are summarized in TABLE 1. The polymerization process was carried out at  $140^\circ\text{C}$  for 24 h.

**TABELA 1. Homopolimeryzacja  $\epsilon$ -CL w obecności  $\text{SnOct}_2$ .**

**TABLE 1. Homopolymerization of  $\epsilon$ -CL in the presence of  $\text{SnOct}_2$ .**

Kod Code	Stosunek molarowy $\epsilon$ -CL/ $\text{SnOct}_2$	Wydajność Yield [%]	$M_v^1$ [g/mol]	$M_v^2$ [g/mol]	$M_v^3$ [g/mol]	$M_v^4$ [g/mol]
PCL1	50 : 1	≈ 100	6 400	-	-	-
PCL2	70 : 1	≈ 100	8 000	-	-	-
PCL3	88 : 1	≈ 100	9 100	-	-	-
PCL4	117 : 1	≈ 100	10 100	-	-	-
PCL5	175 : 1	≈ 100	12 800	-	-	-
PCL6	350 : 1	≈ 100	20 300	19 300	19 200	19 000

$M_v$  – wiskozymetryczna masa cząsteczkowa PCL, 1, 2, 3, 4 – po pierwszej, drugiej, trzeciej i czwartej operacji wytrącania polimeru  
 $M_v$  – viscosity molecular weights of PCL, 1, 2, 3, 4 – after the first, second, third or fourth operation of the polymer precipitation



Masa cząsteczkowa otrzymanych PCL oznaczona metodą wiskozymetryczną wahała się w granicach od 6 400 do 20 300 g/mol. Wydajność wszystkich reakcji wynosiła około 100%.

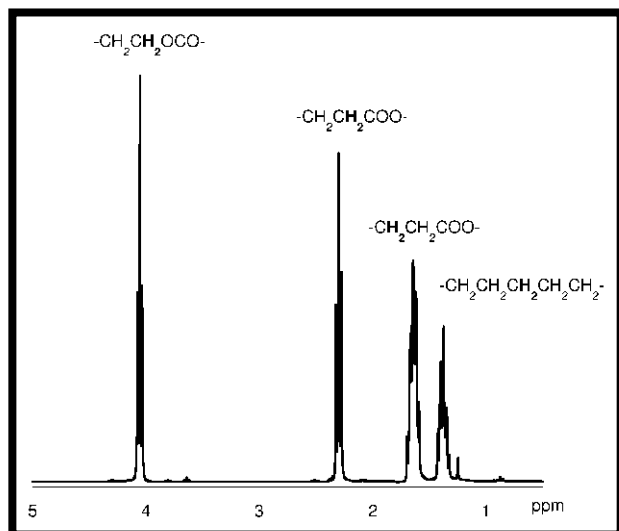
Struktura zsyntezowanych PCL została potwierdzona za pomocą technik spektroskopowych  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  NMR i FT-IR. Na RYS. 1 i 2 przedstawiono typowe widma NMR produktów polireakcji  $\epsilon$ -CL.

Dane spektroskopowe otrzymanych produktów są następujące:

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 4.02 (2H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ); 3.69 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 2.26 (2H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ ); 1.58 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ ); 1.38 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 173.1 ( $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ); 63.7 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ); 33.6 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ ); 27.9 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ); 25.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ ); 24.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ).

FT-IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2943 ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ), 2862 ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ ), 1721 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1291 (C-O and C-C), 1240 ( $\nu_{\text{as}} \text{COC}$ ), 1190 ( $\nu_{\text{OC-O}}$ ), 1170 ( $\nu_{\text{s}} \text{COC}$ ), 1157 (C-O and C-C).



RYS. 1. Widmo  $^1\text{H}$ -NMR PCL (w DMSO).  
FIG. 1.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the PCL (in DMSO).

Katalizator cynowy został zastosowany w stosunku molowym 1:50, 1:70, 1:88, 1:117, 1:175, 1:350 do monomeru, a następnie był usuwany w wyniku wytrącania polimeru za pomocą 5% roztworu kwasu solnego (TABELA 2). Zawartość pozostałości cyny w próbkach wynosiła od 488 do 1631 ppm po pierwszej operacji wytrącania polimeru.

Po każdej operacji wytrącania polimeru monitorowano stopień degradacji PCL wykorzystując metodę wiskozymetryczną (TABELA 1). Jak widać z tabeli zmiana masy cząsteczkowej polimerów po kolejnych operacjach była nieznaczna i wynosiła kilka procent.

Zawartość cyny w otrzymanych PCL w wyniku przeprowadzenia trzeciej i czwartej operacji wytrącania polimeru została wyraźnie zmniejszona do poziomu 12 ppm dla PCLb i 11 ppm dla PCLc (TABELA 2). Wynik ten jest wystarczająco satysfakcjonujący biorąc pod uwagę wymagania Farmakopei Europejskiej zgodnie z którymi zawartość cyny w materiałach mających kontakt z krwią lub komponentami krwi nie mogą przekroczyć 20 ppm [6].

Wstępnej oceny toksykologicznej otrzymanych biomedycznych PCL dokonano na podstawie wyników testów wykorzystujących bakterie luminescencyjne *V. fischeri* oraz pierwotniaki *S. ambiguum* and *T. thermophila* (TABELA 3). Polimer uważany był za toksyczny, jeżeli odsetek efektów toksycznych (PE) wywołanych przez badaną próbkę przekraczał 20%.

The molecular weights of the obtained PCLs determined by viscosity method were ranged from 6 400 to 20 300 g/mol. The reaction yields were quantitative.

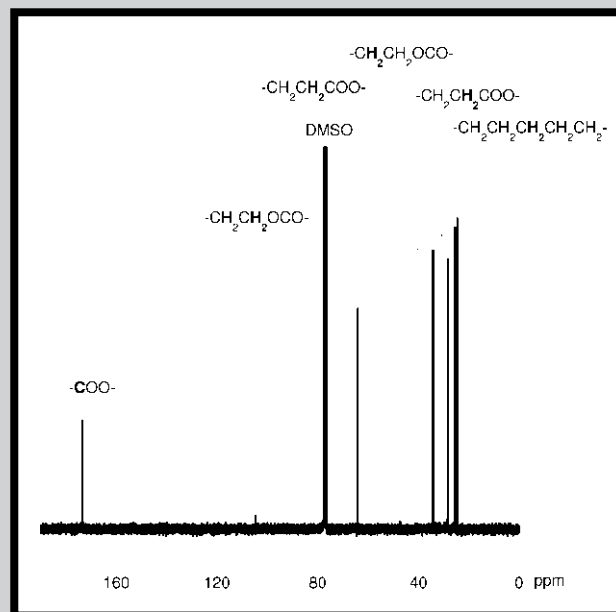
The structure of the received PCLs was confirmed by  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  NMR and FT-IR techniques. FIG. 1 and 2 show typical spectra of the obtained products.

The spectroscopy data are as follow:

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 4.02 (2H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ); 3.69 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ); 2.26 (2H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ ); 1.58 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ ); 1.38 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 173.1 ( $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ); 63.7 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ); 33.6 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ ); 27.9 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ); 25.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ ); 24.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ).

FT-IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2943 ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ), 2862 ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ ), 1721 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1291 (C-O and C-C), 1240 ( $\nu_{\text{as}} \text{COC}$ ), 1190 ( $\nu_{\text{OC-O}}$ ), 1170 ( $\nu_{\text{s}} \text{COC}$ ), 1157 (C-O and C-C).



RYS. 2. Widmo  $^{13}\text{C}$ -NMR PCL (w DMSO).  
FIG. 2.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the PCL (in DMSO).

Tin catalyst was used in the molar ratio of 1:50, 1:70, 1:88, 1:117, 1:175, 1:350 to the monomer and then removed by washing of the polymer solutions with diluted hydrochloric acid (5% aqueous solution) (TABLE 2). The concentration of the residual tin was in the range of 488-1631 ppm after the first polymer precipitation.

The possible biodegradation of PCLs after the polymer precipitation was controlled by the viscosity method (TABLE 1). As is shown in table the variation of the above parameter was relatively slight (about several percent).

The tin content in the received PCLs after the third or fourth operation of the polymer precipitation was significantly reduced to 12 (PCLb) and 11 ppm (PCLc) (TABLE 2). In accordance with the guidelines of the European Pharmacopeia, the tin content in the materials there are in contact with blood or blood components may not exceed 20 ppm [6]. Therefore our results are satisfactory enough especially for biomedical applications of the resulted PCLs.

The cytotoxicity evaluation of the received biomedical PCLs using the luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoans *S. ambiguum* and *T. thermophila* are listed in TABLE 3. As is evidence in TABLE 3, the obtained polymers were non-toxic in all assays in the concentrations up to 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ . One exception was the PCL6 with PE slightly higher than 20. A higher concentration of the polymers (10 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) was tested only on the Spirotox test, as it does not disturb visual observations of the effects under a dissection microscope.

Wartość PE wyznaczana była na podstawie protokołu bazowego - analizy wykonywanej poprzez serię rozcieńczeń danej próbki. Jak widać z TABELI 3, wszystkie otrzymane polimery nie wykazały toksyczności w stężeniu do 1 mg/ml. Jedyny wyjątek stanowił PCL6, który spowodował śmiertelność niewiele powyżej 20% organizmów. Próbki o wyższym stężeniu (10 mg/ml) były analizowane tylko przy zastosowaniu testu Spirotox, ponieważ w tym przypadku możliwa była wizualna obserwacja efektów działania testu pod mikroskopem analitycznym (sekcyjnym). W przypadku testów Microtox (luminescencja) i Protoxkit F (zmętnienie) dla próbek o wyższym stężeniu otrzymywano wyniki bliskie wartościom granicznym. Próbki „nie oczyszczonych” polimerów powodowały 100% śmiertelność mikroorganizmów w teście Spirotox. Warto podkreślić, że próbki polimerów oczyszczonych (PCL6a, PCL6b, PCL6c) nie wykazywały toksyczności we wszystkich przeprowadzonych testach (TABELA 3).

## Wnioski

Otrzymane w obecności 2-etyloheksanianu cyny(II) próbki biomedycznego PCL zawierają śladowe ilości metalu (po trzeciej i czwartej operacji wytrącania). Należy podkreślić, że zawartość metalu w badanych polimerach jest niższa od wartości dopuszczalnej dla biomateriałów zgodnie z Farmakopeą Europejską. Przeprowadzone przez nas wstępne badania wskazują, że oczyszczone PCL nie wykazują cytotoksyczności i mogą znaleźć zastosowanie w farmacji i medycynie.

## Podziękowania

*Niniejsza praca była finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Projekt MNiSzW-0451/B/H03/2010/39, N N209 045139).*

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Labet M., Thielemans W.: Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 3484-3504.
- [2] Sobczak M., Olędzka E., Kołodziejcki W.L., Kuźmicz R.: Polimery do zastosowań farmaceutycznych. *Polimery* 52(6) (2007) 411-420.
- [3] Puppi D., Chiellini F., Piras A.M., Chiellini E.: Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 403-440.
- [4] Mansour H.M., Sohn M., Al-Ghananeem A., DeLuca P.P.: Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects. *International Journal of Molecular Sciences* 11 (2010) 3298-3322.
- [5] Olędzka E., Sobczak M.: Polymers in the Pharmaceutical Applications - Natural and Bioactive Initiators and Catalysts in the Synthesis of Biodegradable and Bioresorbable Polyesters and Polycarbonates. In: Eddy C, editor. *Innovations in Biotechnology*. InTech, 2012. p. 139-160.
- [6] *European Pharmacopoeia V*, 5th Edition, 15 June 2004.
- [7] Sobczak M., Żółtowska K., Jaklewicz A., Kołodziejcki W.: Oznaczenie zawartości cyny w syntetyzowanych biomedycznych poliesterach alifatycznych metodą elektrochemicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej. *Polimery* 55(9) 2010 674-680.
- [8] Sobczak M., Plichta A., Olędzka E., Jaklewicz A., Kuras M., Cwil A., Kołodziejcki W.L., Florjańczyk Z., Szatan K., Udzielak I.: Some atomic spectrometric determinations of metals in aliphatic polyester and polycarbonate biomedical polymers. *Polimery* 54(2) (2009) 114-119.
- [9] Nałęcz-Jawecki G.: Rozprawa habilitacyjna, Medical University of Warsaw, 2008.

## TABELA 2. Oznaczenie zawartości cyny w otrzymanych polimerach metodą elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

TABLE 2. The tin content determination in the received polymers using the electrothermal atomic absorption spectrometry.

Kod / Code	OP	C <sub>Sn</sub> [ppm]
PCL1	1	1580
PCL2	1	1520
PCL3	1	1631
PCL4	1	842
PCL5	1	975
PCL6	1	488
PCL6a	2	146
PCL6b	3	12
PCL6c	4	11

OP - liczba operacji wytrącania polimeru

C<sub>Sn</sub> - zawartość Sn

PCL6, PCL6a, PCL6b, PCL6c – polimer PCL6 po pierwszej, drugiej, trzeciej i czwartej operacji wytrącania

OP - the number of the operation of polymer precipitation

C<sub>Sn</sub> - the content of Sn

PCL6, PCL6a, PCL6b, PCL6c - polymer PCL6 after the first, second, third or fourth operation of polymer precipitation

## TABELA 3. Toksyczność polimerów wyrażona jako wynik procentowy (PE).

TABLE 3. The toxicity of polymers. The toxicity expressed as percent of the effect (PE).

Stężenie Concentration [mg/ml]	Spirotox (24 h)		Microtox (15 min)		Protoxkit F (24 h)	
	10	1	1	0,5	1	0,5
PCL1	100	0	8	8	5	5
PCL2	100	0	9	11	11	10
PCL3	100	0	8	8	13	6
PCL4	100	0	9	15	15	15
PCL5	100	0	4	12	19	19
PCL6	100	0	9	7	27	24
PCL6a	0	0	0	0	2	3
PCL6b	0	0	0	0	11	5
PCL6c	0	0	0	0	0	4

However, higher amounts of a polymer affect the measurement of the endpoints both in the Microtox (luminescence) and Protoxkit F (turbidity), assays. A high level of the tested 'non-purified' polymers (after the first operation of polymer precipitation) caused 100% mortality in Spirotox test. The purified samples (after the second, third or fourth operations of polymer precipitation) were not toxic in all assays (TABLE 3).

## Conclusions

The synthesized in the presence of tin(II) 2-ethylhexanoate biomedical PCLs contain only residual metal content (after the third and fourth operation of the polymer precipitation). Importantly this value is below the limit of the pharmacopoeia standards for the biomedical materials. Our preliminary studies suggest that the purified PCLs are not cytotoxic and therefore suitable for pharmaceutical and medical applications.

## Acknowledgements

*The work was supported by the research program (Project MNiSW-0451/B/H03/2010/39, N N209 045139) of the Ministry of Science and Higher Education in Poland.*

## CHARAKTERYSTYKA USIECIOWANYCH MATERIAŁÓW KOLAGENOWYCH

JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA<sup>1\*</sup>, NINA ŁUCZYŃSKA<sup>1</sup>,  
ANNA BAJEK<sup>2</sup>, ALDONA RYMKIEWICZ<sup>2</sup>, ALINA SIONKOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> WYDZIAŁ CHEMII, UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA,  
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ

<sup>2</sup> COLLEGIUM MEDICUM UNIWERSYTETU MIKOŁAJA KOPERNIKA,  
UL. KARLOWICZA 24, 85-092 BYDGOSZCZ

\* E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

### Streszczenie

Trójwymiarowe, porowate materiały kolagenowe są intensywnie badane jako rusztowania dla inżynierii tkankowej. Ich zadaniem jest zastąpienie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), zapewnienie odpowiedniego wsparcia mechanicznego oraz środowiska biologicznego dla komórek oraz nowo formującej się tkanki. Właściwości tych materiałów, takie jak wytrzymałość mechaniczna, porowatość i podatność na degradację mogą być modyfikowane przez sieciowanie. Z tego względu celem pracy było otrzymanie oraz scharakteryzowanie trójwymiarowego materiału z neutralizowanego kolagenu usieciowanego za pomocą N-hydroksyimidu kwasu bursztynowego (NHS).

Stwierdzono, że średni rozmiar porów, stopień spęcznienia, odporność na degradację oraz wytrzymałość mechaniczna uzyskanych materiałów maleje wraz z wydłużeniem czasu sieciowania NHS. Wszystkie próbki wykazują zadowalające właściwości biologiczne, choć uwagę zwraca fakt, że komórki zasiedlają tylko powierzchnię materiału i nie migrują w głąb skafoldu.

**Słowa kluczowe:** kolagen, inżynieria tkankowa, struktura 3-D, sieciowanie, NHS

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 46-51]

### Wprowadzenie

Każdego roku tysiące ludzi cierpi z powodu chorób bądź urazów powodujących nieodwracalne uszkodzenia tkanek. Często konieczne bywa wówczas zastąpienie takiego organu innym materiałem. Zwykle wykorzystuje się narządy pochodzące od dawców lub implanty wytworzone przez człowieka. Pomimo wielu niezaprzeczalnych zalet oba rozwiązania posiadają pewne ograniczenia. Nową obiecującą alternatywą dla tych metod jest inżynieria tkankowa. Od wielu lat trójwymiarowe, porowate matryce są intensywnie badane jako rusztowania dla inżynierii tkankowej. Ich zadaniem jest zastąpienie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), zapewnienie odpowiedniego wsparcia mechanicznego oraz środowiska biologicznego dla komórek oraz nowo formującej się tkanki [1-3]. Wszystkie rodzaje tkanek łącznych zawierają znaczną ilość kolagenu. Białko to posiada dobre właściwości wytrzymałościowe, niską antygenowość, brak cytotoxycywności i nie wywołuje odczynów zapalnych. Wykazuje działanie hemostatyczne i zdolność do kontrolowanej biodegradacji. Materiały kolagenowe wspierają adhezję oraz wzrost komórek i tkanek. Właściwości te sprawiły, że białko to jest stosowane w wielu, różnorodnych zastosowaniach medycznych [3-6].

## CHARACTERIZATION OF CROSS-LINKED COLLAGEN MATRICES

JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA<sup>1\*</sup>, NINA ŁUCZYŃSKA<sup>1</sup>,  
ANNA BAJEK<sup>2</sup>, ALDONA RYMKIEWICZ<sup>2</sup>, ALINA SIONKOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FACULTY OF CHEMISTRY, NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,  
GAGARINA 7, 87-100 TORUN, POLAND

<sup>2</sup> COLLEGIUM MEDICUM, NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,  
KARLOWICZA 24, 85-092 BYDGOSZCZ, POLAND

\* E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

### Abstract

The three-dimensional, porous, collagen scaffolds have been extensively investigated as matrices for tissue engineering. Their task is to replace the extracellular matrix (ECM), provide mechanical support and a biological environment for cells and newly formed tissue. The properties of the materials such as mechanical strength, porosity and susceptibility to degradation can be modified by cross-linking process. For this reason the aim of our work was to obtain and characterize neutralized, 3-D collagen scaffold cross-linked using N-hydroxysuccinimide (NHS) during different time periods.

It was found, that average pore size, swelling degree, the susceptibility to degradation and mechanical properties declined with longer cross-linking time. All samples were well tolerated by the cells. However the cells were distributed only on the surface of the material and did not migrate into the structure of the scaffolds.

**Keywords:** collagen, tissue engineering, 3-D scaffold, cross-linking, NHS

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 46-51]

### Introduction

Every year thousands people suffer from illness or injury which causes irreversible tissue destruction or loss of functionality. Often it is necessary to replace the destroyed organ. Usually this is achieved by organ transplantation from donors or by an artificial organ implantation. Both solutions exhibit some limitations. The new, promising alternative method is tissue engineering. For several years three-dimensional porous scaffolds have been extensively investigated as matrices for tissue engineering. Their task is to replace the extracellular matrix (ECM), provide mechanical support and a biological environment for cells and newly formed tissue [1-3]. All kinds of connective tissues contain a significant amount of collagen. This protein exhibits good mechanical properties, low antigenicity, low inflammatory and cytotoxic responses, good hemostatic properties and controllable biodegradability. It also promotes cell and tissue adhesion and growth. Some of these properties can be changed by a cross-linking process, chemical and physical modifications. For this reason collagen has been used in a variety of medical applications [3-6].



Celem pracy było otrzymanie i scharakteryzowanie trójwymiarowych, porowatych, neutralizowanych materiałów kolagenowych usieciowanych N-hydroksylimidem kwasu bursztynowego (NHS).

## Materiały i metody

Roztwór kolagenu (1%) ze ścięgien ogonowych młodych szczurów albinosów w 0,1M kwasie octowym został przygotowany w naszym laboratorium [7]. Następnie roztwór ten umieszczono w tubach dializacyjnych i poddano neutralizacji w procesie dializy względem wody dejonizowanej przez tydzień, aż do uzyskania żelu kolagenowego. Otrzymany materiał sieciowano poprzez zanurzenie w 0,01M roztworze N-hydroksy imidu kwasu bursztynowego (NHS) na 2, 8 i 24 godziny. Żel kolagenowy pocięto na plastry o grubości około 3 mm i liofilizowano przez 48 godzin. Uzyskany w ten sposób porowaty materiał poddano analizom.

Właściwości mechaniczne badano za pomocą maszyny wytrzymałościowej Zwick&Roell Z 0.5. Próbkę umieszczano w uchwytach pomiarowych i kondycjonowano przez 15 min w komorze wypełnionej roztworem buforu fosforanowego (PBS) o pH=7,4, a następnie rozciągano z szybkością 10 mm/min.

Zdjęcia morfologii materiałów kolagenowych zarejestrowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego wyprodukowanego przez LEO Electron Microscopy Ltd, England, model 1430 VP. Przed badaniem próbki napyłano platyną. Za pomocą programu Sigma Scan Pro 5 zmierzono średnie pola powierzchni porów.

Stożek spęcznienia ( $E_s$ ) mierzono metodą wagową. Suche próbki zważono ( $W_d$ ) i umieszczono w 0,05M buforze fosforanowym (PBS) o pH=7,4 w temperaturze pokojowej. Po odpowiednim czasie próbki wyciągano, osuszano na bibule filtracyjnej i ważono ( $W_s$ ). Stożek spęcznienia materiału określano jako stosunek wzrostu masy ( $W_s - W_d$ ) względem masy początkowej próbki  $W_d$ . Wartości stanowią średnią z trzech pomiarów.  $E_s$  obliczano stosując poniższą zależność:

$$E_s = (W_s - W_d)/W_d \times 100\% \quad (1)$$

gdzie  $W_s$  i  $W_d$  oznaczają odpowiednio masę spęcznionej i suchej próbki.

Materiał poddano także badaniu degradacji in vitro. Suchą próbkę o znanej masie umieszczono w 0,05M buforze fosforanowym (PBS) o pH=7,4 w temperaturze 37°C. Co 24 godziny próbkę wyciągano z roztworu, kilkakrotnie przemywano wodą destylowaną, zamrażano, liofilizowano, a następnie ważono. Pomiaru wykonywano każdorazowo dla trzech próbek danego rodzaju. Procentowy ubytek masy obliczono przy użyciu poniższego równania:

$$\text{Ubytek masy} = ((W_i - W_f)/W_i) \times 100\% \quad (2)$$

gdzie  $W_i$  i  $W_f$  oznaczają odpowiednio masę początkową i zdegradowanej próbki [8].

By zbadać przeżywalność i proliferację fibroblastów mysich 3T3 materiały kolagenowe umieszczono w 12-dółkowych płytkach hodowlanych i posiano  $2,5 \times 10^4$  komórek na dółek. Komórki hodowano w kompletnym medium hodowlanym przez 7 dni. Następnie medium hodowlane było usuwane, a ilość żywych komórek szacowano stosując test MTT. Zdjęcia materiałów po teście MTT wykonano przy użyciu aparatu cyfrowego Kodak Easy Share Z1012.

## Wyniki i dyskusja

Porowatość materiału jest bardzo istotnym parametrem z punktu widzenia inżynierii tkankowej. Porowatość materiałów zastępczych musi mieć charakter otwarty pozwalający na transport masy (składniki odżywcze, produkty przemiany materii) w kierunku prostopadłym do powierzchni materiału.

The aim of this work was to obtain and characterize the porous, three-dimensional, neutralized collagen scaffolds cross-linked using N-hydroxysuccinimide (NHS) during different time periods.

## Materials and Methods

The solution of collagen (1%) from tail tendons of young albino rats in 0.1M acetic acid was obtained in our laboratory [7]. This solution was poured into dialysis bag and neutralized during dialysis process against deionised water for one week until a collagen gel was formed. Then the collagen was cross-linked by immersing in 0.01M N-hydroxysuccinimide (NHS) solution for 2, 8 and 24 hours. Finally, the material was cut into slices 3 mm thick and lyophilized for 48 h. The obtained dry porous matrices were analyzed.

The mechanical properties have been investigated by Zwick&Roell Z 0.5. The samples were placed between grips, conditioned 15 min in chamber filled with PBS buffer and stretched (stretching rate 10 mm/min).

The images of morphology of collagen biomaterials were performed by scanning electron microscope made by LEO Electron Microscopy Ltd, England, model 1430 VP. All samples were coated by platinum. The average area of pores was estimated using the Sigma Scan Pro 5 program.

The swelling ratio ( $E_s$ ) was measured by the conventional gravimetric method. The dry sample was weighted and placed in 0.05M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 at room temperature. After appropriate time of incubation (0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h) excess of phosphate buffer was removed using absorbent paper and wet material was weighted ( $W_s$ ). The swelling ratio of the scaffolds was defined as the ratio of weight increase ( $W_s - W_d$ ) with respect to the initial weight ( $W_d$ ) of dry samples. Each value was averaged from three parallel measurements.  $E_s$  was calculated using the following equation:

$$E_s = (W_s - W_d)/W_d \times 100\% \quad (1)$$

where  $W_s$  and  $W_d$  denote the weights of swollen and dry samples, respectively.

In vitro degradation was also analyzed. The scaffolds of known dry weights were placed in 0.05M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) at 37°C. Every 24 hours, samples were removed from the medium, rinsed with distilled water, frozen, lyophilized, and weighed. The experiment was done in triplicates for each scaffold. The percentage of weight loss was calculated using the following equation:

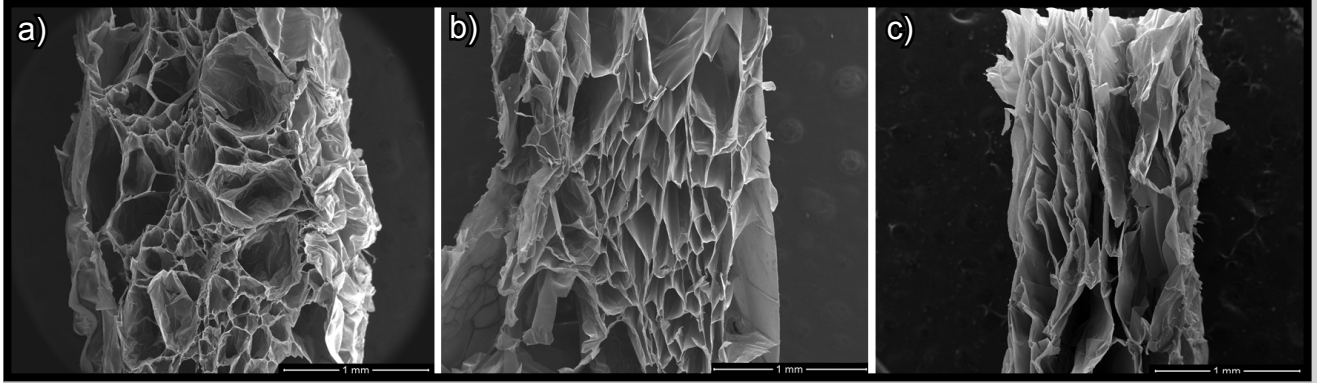
$$\text{Weight loss} = ((W_i - W_f)/W_i) \times 100\% \quad (2)$$

where  $W_i$  and  $W_f$  represents the initial and digested weight of scaffolds, respectively [8].

To investigate the viability and proliferation cells on collagen matrices fibroblasts 3T3 were seeded on materials placed in 12-well plates at a density of  $2.5 \times 10^4$  per well. Cells have been growing in complete medium for 7 days. Then culture medium was removed and MTT assay was performed. The images of the samples after MTT test were performed by digital camera Kodak Easy Share Z1012.

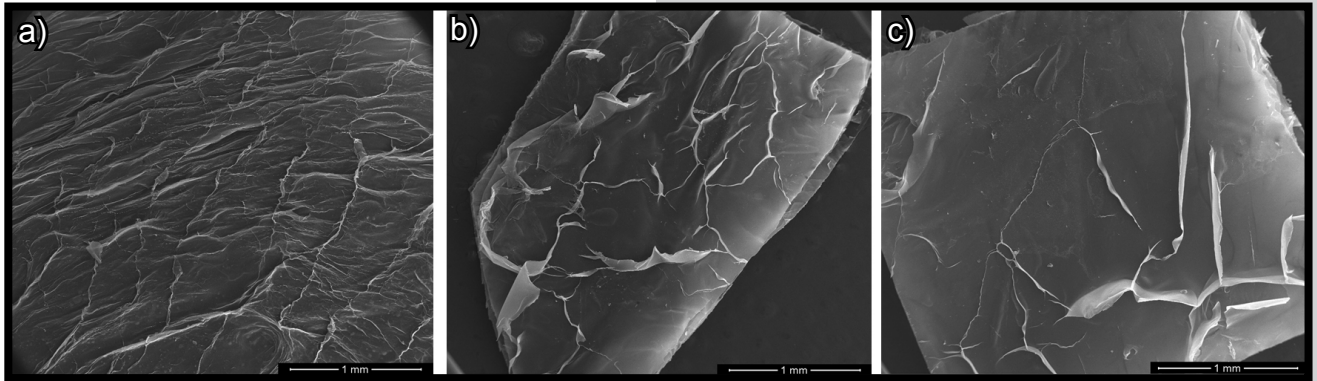
## Results and Discussion

The porosity of scaffolds is a very important parameter for tissue engineering. The pores must be open to allow cells to penetrate the matrix and permit the transport of matter (nutrients, waste products) in a direction perpendicular to the surface of the material. The SEM images (FIG. 1) show the inner porous structure of collagen cross-linked materials.



**RYS. 1.** Obraz SEM wewnętrznej struktury liofilizowanych materiałów kolagenowych sieciowanych przy użyciu NHS przez a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.

**FIG. 1.** SEM images of the inner structures of lyophilized collagen scaffolds cross-linked by NHS during: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.



**RYS. 2.** Obraz SEM powierzchni liofilizowanych materiałów kolagenowych sieciowanych przy użyciu NHS przez: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.

**FIG. 2.** SEM images of the lyophilized collagen scaffolds surfaces cross-linked by NHS during: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.

Ponadto ma umożliwiać odpowiednie wnikanie komórek do całej objętości matrycy, produkcję nowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz waskularyzację. Obrazy SEM (RYS. 1) przedstawiają porowatą strukturę materiałów kolagenowych.

Otrzymane matryce kolagenowe posiadają niejednorodne pory. Analiza obrazów dowodzi, iż ich wielkość różni się dla próbek kolagenowych sieciowanych NHS przez 2, 8 oraz 24 h. Średnie pole powierzchni porów dla materiałów sieciowanych przez 2, 8 i 24 godziny wynosił odpowiednio 0,0572 mm<sup>2</sup>, 0,0510 mm<sup>2</sup> i 0,0474 mm<sup>2</sup> (TABELA 1). Zgodnie z oczekiwaniami, wydłużenie czasu sieciowania spowodowało zmniejszenie średnich rozmiarów porów.

Warto jednak zauważyć, że liofilizowane materiały kolagenowe wykazują dwa różne rodzaje struktur. Wewnętrzna część jest porowata, podczas gdy zewnętrzna warstwa próbek stanowi rodzaj zamkniętej struktury, pozbawionej porów (RYS. 2). Na powierzchni materiałów obecne są liczne podłużne, wypukłe defekty, których liczba maleje wraz z wydłużeniem czasu sieciowania próbki.

Proces sieciowania wpływa także na podatność matrycy kolagenowych na degradację *in vitro*. Wartości ubytków masy podczas degradacji materiałów białkowych sieciowanych przy użyciu NHS przedstawione są na RYS. 3.

**TABELA 1.** Średnie rozmiary porów w liofilizowanym materiale kolagenowym sieciowanym przy użyciu NHS.

**TABLE 1.** Average size of pores of lyophilized collagen materials cross-linked by NHS.

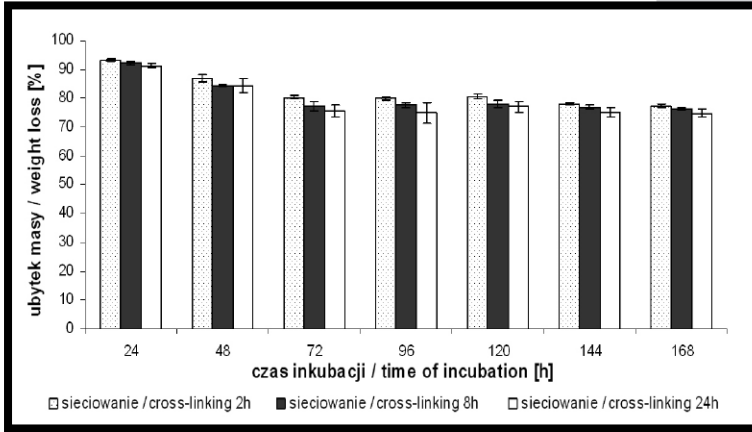
	Siecowanie NHS przez 2 h NHS cross-linking 2 h	Siecowanie NHS przez 8 h NHS cross-linking 8 h	Siecowanie NHS przez 24 h NHS cross-linking 24 h
Pole powierzchni porów Pore sizes [mm <sup>2</sup> ]	0.0572 ±0.0323	0.0510 ±0.0248	0.0474 ±0.0179

The collagen scaffolds possess heterogeneous pores. However, the porosity is different for materials cross-linked during various time periods. Average pore sizes for materials cross-linked NHS during 2, 8 and 24 hours were respectively 0.0572 mm<sup>2</sup>, 0.0510 mm<sup>2</sup> and 0.0474 mm<sup>2</sup> (TABLE 1). As it was expected, a longer cross-linking time causes a decrease of the average value of the porous area.

It is worth noticing that the lyophilized collagen materials show two different kinds of the structure. The inner parts are porous, while the outer layers feature a kind of closed shell without pores (FIG. 2). The surfaces of the materials are covered by numerous longitudinal defects, however the number of defects decrease after longer time of cross-linking.

The cross-linking process also affects the susceptibility to degradation of the collagen materials. The values of weight loss during *in vitro* degradation analysis of collagen materials cross-linked by NHS are presented in FIG. 3.





**RYS. 3. Wartości ubytków masy podczas analizy degradacji in vitro dla materiałów kolagenowych.**

**FIG. 3. The values of weight loss during in vitro degradation analysis of collagen materials.**

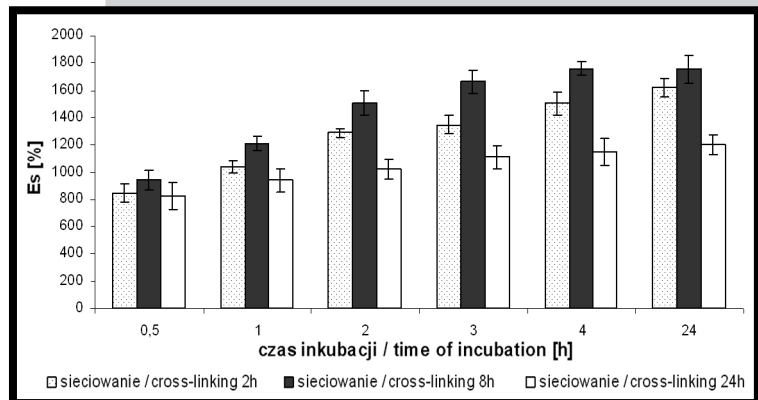
Jak można zauważyć, początkowo proces degradacji przebiega dość szybko. Po 72 godzinach inkubacji w roztworze PBS wszystkie próbki utraciły powyżej 20% początkowej masy. Jednak po tym czasie tempo degradacji znacząco spadło, a masa próbek uległa stopniowej stabilizacji. Uwagę zwraca fakt, iż wraz z wydłużeniem czasu sieciowania materiału ubytek masy nieznacznie rośnie. Obecnie rozważanych jest kilka hipotez dotyczących mechanizmu sieciowania przy użyciu NHS. Zwykle przyjmuje się, że N-hydroksymid kwasu bursztynowego najchętniej reaguje z pierwszorzędowymi aminami. Pojawiają się jednak doniesienia mówiące także o reakcji NHS z aminokwasami zawierającymi ugrupowania hydroksylowe. W efekcie pierwszej reakcji tworzone są wiązania amidowe, natomiast druga, jak sugerują niektórzy autorzy, może prowadzić także do powstawania wiązań estrowych, które nawet w łagodnych warunkach ulegają hydrolizie [9].

Na RYS. 4 przedstawiono wartości stopnia spęcznienia zanotowane dla matryc kolagenowych w buforze PBS. Zaobserwowano, że wartości stopnia spęcznienia są zbliżone dla próbek sieciowanych przez 2 i 8 godzin, natomiast spęcznienie skafoldu sieciowanego przez dłuższy czas jest ograniczone.

Wbrew oczekiwaniom, wartość naprężenia zrywającego badanych materiałów maleje wraz z wydłużeniem czasu sieciowania (RYS. 5). Podczas procesu neutralizacji łańcuchy kolagenu ulegają pewnemu uporządkowaniu. Tworzenie nowych wiązań sieciujących może zakłócać tę strukturę, a także ogranicza mobilność makrocząstek. To powoduje sztywnienie materiału oraz wzrost kruchości. Próbki mogą się stawać heterogeniczne na poziomie cząsteczkowym, co prowadzi do lokalnych koncentracji naprężeń podczas rozciągania. W rezultacie wytrzymałość materiału maleje. Może być to także efekt zmniejszenia średnich rozmiarów porów wraz z wydłużeniem czasu sieciowania, a przez to ograniczenia transportu wody do wnętrza materiału. Wiadomo, że materiały białkowe bardzo często są kruche w stanie suchym i znacznie bardziej elastyczne gdy są mokre. Wszystkie próbki przed pomiarem umieszczane były na 15 min w roztworze PBS i ulegały lekkemu spęcznieniu. Ponieważ cząsteczki wody odgrywają rolę plastyfikującą dla materiałów białkowych, w związku z tym obniżenie zawartości wody w matrycy mogło skutkować pogorszeniem parametrów wytrzymałościowych. Także wartość względnego wydłużenia przy zerwaniu uległa zmniejszeniu po dłuższych czasach sieciowania kolagenu (RYS. 6).

As one can see the degradation process at the beginning was very fast. Within 72 hours of incubation all samples have lost more than 20% of their initial weight. After this time the degradation rate significantly decreased. The weight loss slightly increases with the longer time of immersing by NHS solution. Nowadays several hypothesis concerning the mechanism of protein cross-linking by NHS are considered. NHS is the most often described as reactive towards primary amines, but also reactions with hydroxyl-containing amino acids have been reported. During these reactions the amide bonds are mainly created, but some authors suggest the formation of ester bonds, which can be hydrolysed in mild conditions [9].

FIG. 4 shows the swelling ratio of collagen materials in PBS buffer. It was observed that the swelling ratio was similar for materials cross-linked using NHS over 2 and 8 hours, whereas the swelling of collagen cross-linked over a longer time was reduced.



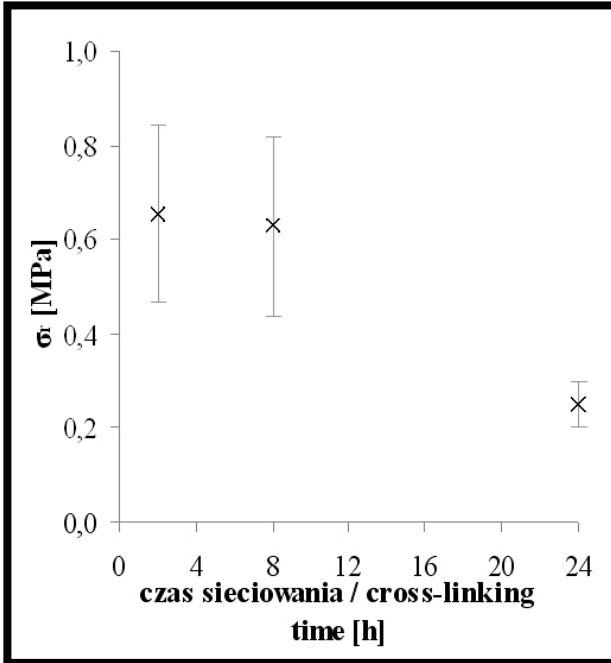
**RYS. 4. Stopień spęcznienia materiałów kolagenowych w buforze PBS.**

**FIG. 4. The swelling ratio ( $E_s$ ) of collagen materials in PBS buffer.**

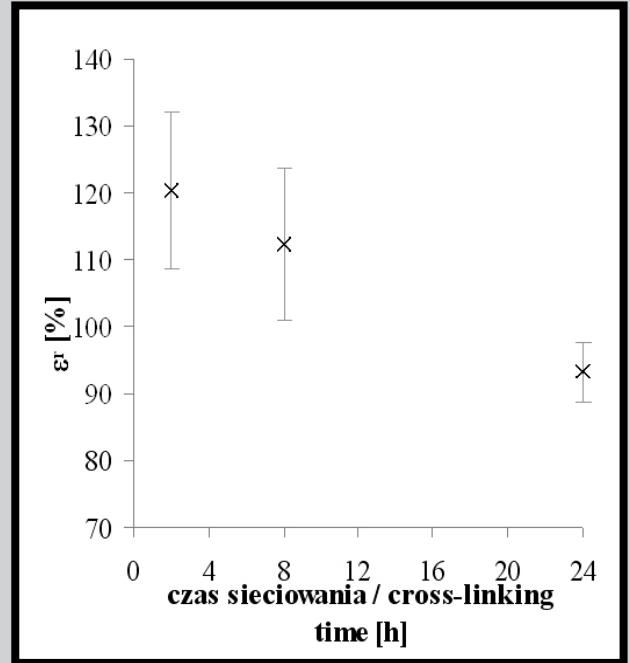
Surprisingly, the tensile strength of the materials decreases with a longer cross-linking time (FIG. 5). During neutralization process the collagen chains undergo arranging. The creation of the new cross-linking bonds may disrupt the structure and also the macromolecules mobility is limited. This causes greater stiffness, heterogeneity of the material and local stress concentration during stretching. As an effect the mechanical parameters are reduced. This effect may be also due to a decrease of the pore size after longer cross-linking time and a limitation of water molecule transport. It is well known, that protein materials very often are fragile in a dry state and much more elastic when they are wet. All samples, before testing, were placed for 15 min in a PBS buffer whilst they were slightly swollen. Water molecules play the role of plasticizer in protein materials and their lower content in the structure results in weaker mechanical resistance. Also the ultimate percentage elongation at breaking point declines after a longer cross-linking time (FIG. 6.)

In FIG. 7, images of collagen materials after in vitro testing are presented. MTT analysis showed that all samples were well tolerated by the cells. The qualitative analysis of color intensity resulting from MTT assay, led to the conclusion that the collagen material cross-linked by NHS for 24 hours demonstrates the best properties as a surface for cell growth. It is worth noticing, that the cells were distributed on the surface of the material, but did not migrate into the inner layer of the scaffolds. This is probably caused by the lack of open pores on the surface, as it was seen on SEM images of collagen samples.

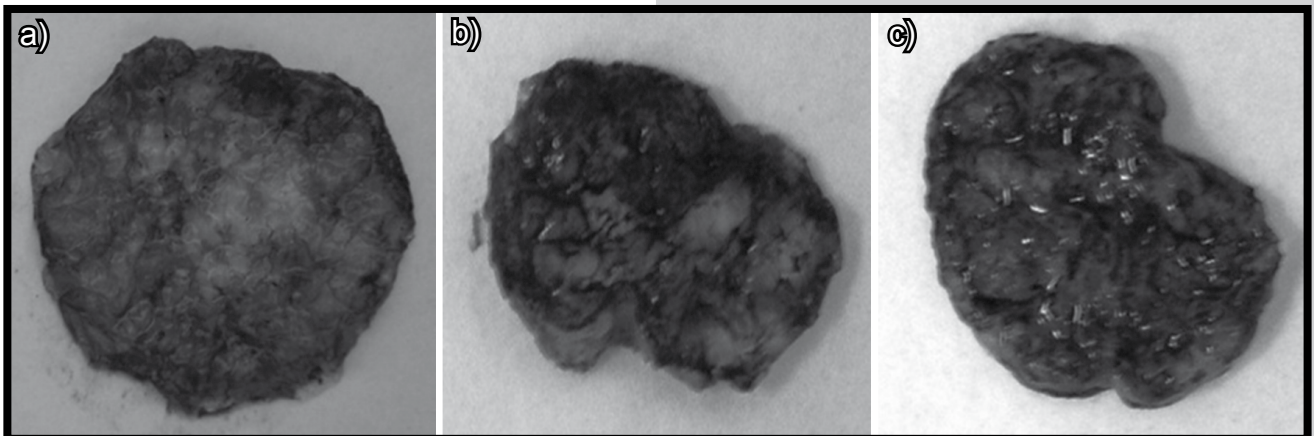




**RYS. 5.** Wartości naprężenia zrywającego ( $\sigma$ ) dla materiałów kolagenowych sieciowanych NHS.  
**FIG. 5.** The values of ultimate tensile strength at breaking point ( $\sigma$ ) of collagen materials cross-linked by NHS.



**RYS. 6.** Wydłużenie względne przy zerwaniu ( $\epsilon$ ) próbek kolagenowych.  
**FIG. 6.** The ultimate percentage elongation at breaking point ( $\epsilon$ ) of collagen materials.



**RYS. 7.** Fotografie materiałów kolagenowych sieciowanych przy użyciu NHS przez a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h po teście in vitro i analizie MTT.  
**FIG. 7.** Photographs of the collagen scaffolds cross-linked by NHS during: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h after in vitro test and MTT assay.

Na RYS. 7 przedstawiono zdjęcia materiałów kolagenowych po przeprowadzonym teście hodowli komórkowej in vitro. Test MTT wykazał, że wszystkie materiały są dobrze tolerowane przez komórki. Jakościowa analiza intensywności koloru wynikającego z przeprowadzonego testu MTT pozwala stwierdzić, że najlepszą powierzchnią dla wzrostu komórek charakteryzuje się materiał kolagenowy sieciowany NHS przez 24 godziny. Należy jednak zauważyć, że komórki rozmieszczone były równomiernie na powierzchni materiału, lecz nie zaobserwowano ich w głębi. Brak migracji komórek oraz medium do wnętrza skafoldu wynika najprawdopodobniej z braku występowania otwartych porów w warstwie wierzchniej materiału. Potwierdzają to zdjęcia SEM powierzchni próbek kolagenowych.

## Conclusions

Our method allows to obtain porous, three-dimensional collagen scaffolds. The cross-linking of the materials by N-hydroxysuccinimide influences their properties. The average pore size, swelling degree and surprisingly, mechanical properties decrease with a longer cross-linking time. Also the resistance to in vitro degradation slightly decreases with the longer time of immersing by NHS solution. All samples are well tolerated by the cells. It is worth noticing that the surface material was closed, without pores and cells could not migrate into the structure of the scaffolds. However, we suppose that this technique may be used to close cells during preparation into the scaffold and protect them from the environment in the initial period after implantation.

## Wnioski

Zastosowana metoda pozwoliła otrzymać porowate, trójwymiarowe matryce kolagenowe. Sieciowanie przy użyciu N-hydroksyimidu kwasu bursztynowego wpływa na właściwości tych materiałów. Średni rozmiar porów, stopień spęczenia oraz, co zaskakujące, także wytrzymałość na zerwanie maleją wraz z wydłużeniem czasu sieciowania. Także odporność na degradację *in vitro* maleje po dłuższym sieciowaniu. Wszystkie próbki były dobrze tolerowane przez fibroblasty mysie 3T3. Na uwagę zasługuje fakt, że powierzchnia materiału była zamknięta, pozbawiona porów, co uniemożliwiło komórkom wnikanie do wnętrza skafoldu. Z drugiej jednak strony, wydaje się, że zastosowana metoda otrzymywania materiałów kolagenowych może pozwolić na zamknięcie komórek w ich wnętrzu i zabezpieczyć przed wpływem środowiska w pierwszym okresie po implantacji.

## Podziękowania

*Badania były współfinansowane z grantu Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika z dotacji statutowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktorskich SDCh: Ch1105.*

## Acknowledgments

*This work was supported in part by the grant of Faculty of Chemistry Nicolaus Copernicus University Ch1105.*

## Piśmiennictwo

- [1] Shoichet M.S.: Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules* 43 (2010) 581-591.
- [2] Tangsadthakun Ch., Kanokpanont S., Sanchavanakit N., Banaprasert T., Damrongsakkul S.: Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 16 (2006) 37-44.
- [3] Yunoki S., Mori K., Suzuki T., Nagai N., Munekata M.: Novel elastic material from collagen for tissue engineering. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 18 (2007) 1369-1375.
- [4] Ramshaw J.A.M., Peng Y.Y., Glattauer V., Werkmeister J.A.: Collagens as biomaterials. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 20 (2009) S3-S8.
- [5] Potorac S., Popa M., Maier V., Lisa G., Verestiuc L.: New hydrogels based on maleilated collagen with potential applications in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 236-243.

## References

- [6] Srinivasan A., Punnoose A. M., Nagarajan N., Kuruvilla S., Sehgal P.K., Balakrishnan K.: Collagen 3 D fleece as scaffold for cardiac tissue engineering. *Indian Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 28 (2012) 1-5.
- [7] Skopińska-Wiśniewska J., Sionkowska A., Kamińska A., Kaźnica A., Joachimiak R., Drewa T.: Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration. *Applied Surface Science* 255 (2009) 8286-8292.
- [8] Harouna A.A., Migonneyb V.: Synthesis and *in vitro* evaluation of gelatin/hydroxyapatite graft copolymers to form bionanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules* 46 (2010) 310-316.
- [9] Madler S., Bich C., Touboul D., Zenobi R.: Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *Journal of Mass Spectrometry* 44 (2009) 694-706.

## OCENA STRUKTURY, MODUŁU YOUNGA ORAZ CYTOTOKSYCZNOŚCI KOMPOZYTÓW NA BAZIE CHITOZANU

AGATA PRZEKORA<sup>1</sup>, KRZYSZTOF PAŁKA<sup>2\*</sup>,  
BEATA MACHERZYŃSKA<sup>3</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM ANALITYKI MEDYCZNEJ,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII,  
UL. CHODZKI 1, 20-093 LUBLIN

<sup>2</sup> POLITECHNIKA LUBELSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
NADBYSTRZYCKA 36, 20-618, LUBLIN

<sup>3</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA CERAMIKI SPECJALNEJ,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

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

### Streszczenie

Ceramika wapniowo-fosforanowa w formie porowatego rusztowania na bazie biodegradowalnego biopolimeru jest materiałem powszechnie stosowanym jako wypełniacz ubytków tkanki kostnej w ortopedii i stomatologii. Chitozan, ze względu na swoje charakterystyczne właściwości takie jak: podobieństwo strukturalne do glikozaminoglikanów (GAG) macierzy pozakomórkowej tkanki kostnej, brak toksyczności, szybka biodegradacja, podatność na chemiczną i enzymatyczną modyfikację, stymulacja adhezji i proliferacji komórek oraz osteoinduktywność, jest często stosowany w inżynierii tkankowej kości jako składnik kompozytów. W niniejszej pracy, określono parametry strukturalne i mechaniczne oraz cytotoksyczność 2 typów kompozytów na bazie chitozanu (chitozan-HA BIOCER oraz chitozan-HT BIOCER). Testy *in vitro* przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej hFOB 1.19 (ludzkie płodowe osteoblasty). Cytotoksyczność ekstraktów z kompozytów oznaczono za pomocą testu LDH. Wyniki badań wyraźnie wskazują, że wyprodukowane kompozyty na bazie krylowego chitozanu wykazują dobre parametry strukturalne i mechaniczne o dużej zgodności z tkankami, są nietoksyczne i przez to są obiecującym materiałem do stosowania w inżynierii tkankowej kości.

**Słowa kluczowe:** chitozan, rusztowanie, struktura, moduł Younga, cytotoksyczność

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 52-58]

### Wstęp

Ceramika wapniowo-fosforanowa (głównie HAp, TCP) w formie porowatego rusztowania, często kompozytu na bazie biodegradowalnego biopolimeru, ze względu na biogodność jest materiałem szeroko stosowanym jako wypełniacz ubytków tkanki kostnej w ortopedii i stomatologii [1-3]. Chitozan ze względu na swoje właściwości biologiczne zdaje się być idealnym biopolimerowym składnikiem kompozytów do stosowania w inżynierii tkankowej kości.

## STRUCTURAL PROPERTIES, YOUNG'S MODULUS AND CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF CHITOSAN-BASED COMPOSITES

AGATA PRZEKORA<sup>1</sup>, KRZYSZTOF PAŁKA<sup>2\*</sup>,  
BEATA MACHERZYŃSKA<sup>3</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,  
1 CHODZKI ST., 20-093 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING,  
LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
36 NADBYSTRZYCKA ST., 20-618 LUBLIN, POLAND

<sup>3</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF ADVANCED CERAMICS  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

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

### Abstract

Calcium phosphate ceramics in the form of biodegradable biopolymer-based, porous scaffolds are widely used as bone defect filler in dentistry and orthopedics. Chitosan is often applied in bone tissue engineering as a component of composites because of its characteristic properties such as structural similarity to glycosaminoglycans (GAG) of bone extracellular matrix, nontoxicity, rapid biodegradation, prone to chemical and enzymatic modification, stimulation of cell adhesion and proliferation and osteoinduction. In this work, the structure, mechanical properties and cytotoxicity of 2 types of chitosan-based composites (chitosan-HA BIOCER and chitosan-HT BIOCER) were evaluated. *In vitro* cell culture tests were carried out using hFOB 1.19 cell line (human fetal osteoblast cells). The cytotoxicity of scaffolds extracts was estimated by LDH test. Our studies clearly indicate that created krill chitosan-based composites show good structural and mechanical properties with good compatibility with human tissues. Furthermore, produced composites are nontoxic and thus are promising materials for bone tissue engineering application.

**Keywords:** chitosan, scaffold, structure, Young's modulus, cytotoxicity

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 52-58]

### Introduction

Calcium phosphate ceramics (mainly HAp, TCP) in the form of porous scaffolds, often biodegradable biopolymer-based composites, are widely used as bone defect filler in dentistry and orthopedics according to its biocompatibility [1-3]. Chitosan, because of its biological properties, appears to be an ideal biopolymer component of composite for bone tissue engineering applications. Chitosan is a natural polysaccharide – partially N-deacetylated derivative of chitin that derives mainly from exoskeleton of crustaceans [4,5]. This polysaccharide is often applied in regenerative medicine because of its characteristic properties such as nontoxicity, rapid biodegradation, prone to chemical and enzymatic modification, stimulation of cell adhesion and proliferation and osteoinduction [6].



Chitozan jest to naturalny polisacharyd, będący częściowo N-zdeacetylowaną pochodną chityny, pochodząca głównie z egzoszkieletu skorupiaków [4,5]. Polisacharyd ten jest często stosowany w medycynie regeneracyjnej ze względu na swoje charakterystyczne właściwości takie jak: brak toksyczności, szybka biodegradacja, podatność na chemiczną i enzymatyczną modyfikację, stymulacja adhezji i proliferacji komórek oraz osteoinduktywność [6].

Celem inżynierii tkankowej jest stworzenie biodegradowalnego, porowatego, trójwymiarowego rusztowania, które miałyby zdolność wspierania, wzmacniania i organizowania regenerującej się tkanki [7]. W organizmie komórki otoczone są przez macierz pozakomórkową (ECM), która nie tylko pełni funkcję fizycznej podpory, ale również reguluje procesy proliferacji i różnicowania komórek. Dlatego ważne jest, aby stworzyć rusztowanie 3D mające zdolność zarówno podtrzymywania rekonstrukcji tkanki *in vitro*, jak i pośredniczenia w regeneracji tkanki *in vivo* [8,9]. Ze względu na swoje podobieństwo strukturalne do glikozaminoglikanów (GAG) macierzy pozakomórkowej tkanki kostnej, chitozan jest często stosowany w inżynierii tkankowej kości jako składnik kompozytu na bazie ceramiki wapniowo-fosforanowej [10,11].

Implanty (rusztowania) powinny charakteryzować się optymalną porowatością, modulem sprężystości oraz odpowiednimi właściwościami mechanicznymi, co jest bardzo istotnym zagadnieniem w inżynierii biomateriałów, zwłaszcza materiałów stosowanych w chirurgii kostnej czy w inżynierii tkankowej [12,13]. Z punktu widzenia integracji implantu z kością korzystne jest gdy materiał posiada pory otwarte o wielkości odpowiadającej strukturze kostnym (50-450  $\mu\text{m}$ ), a porowatość i moduł Younga dostosowane są do miejsca implantacji [14] (np. kość korowa lub gąbczasta). Taka mikrostruktura umożliwia wrastanie tkanek w zaimplantowany biomateriał, a przez to uzyskuje się dobre połączenie implant-tkanka, co również zapewnia odpowiednią wytrzymałość zmęczeniową implantu i połączenia [15].

Celem niniejszej pracy było stworzenie porowatego kompozytu na bazie chitozanu oraz określenie jego cech strukturalnych oraz modułu Younga. Ponadto, oznaczono cytotoksyczność nowych materiałów kompozytowych z wykorzystaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich osteoblastów.

## Materialy i metody

Wyprodukowano dwa rodzaje rusztowania z wykorzystaniem wielkocząsteczkowego chitozanu (1174 kDa i 73% stopień deacetylacji) oraz dwóch typów ceramiki wapniowo-fosforanowej:

- granul HAp (granule HA BIOCER,  $\Phi$  0,5-1,6 mm) – kompozyt chitozan-HA BIOCER
- mieszanek granul HAp/TCP (granule HT BIOCER,  $\Phi$  0,5-1,6 mm) – kompozyt chitozan-HT BIOCER.

Wielkocząsteczkowy krylowy chitozan został uzyskany dzięki uprzejmości dr Anny Wojtasz-Pająk z Morskiego Instytutu Rybackiego w Gdyni. Granule HA BIOCER oraz HT BIOCER uzyskano dzięki uprzejmości Prezesa firmy Chema Elektromet Spółdzielnia Pracy Rzeszów Jarosława Proniewskiego. Chitozan rozpuszczano przez 3 godziny w kwasie octowym w celu uzyskania klarownego roztworu chitozanu. Następnie do roztworu chitozanu dodano granule HA BIOCER lub HT BIOCER (80% wag.), a otrzymana homogeniczna pasta została uformowana w cylindrycznym pojemniku o średnicy 15 mm. Otrzymane próbki o długości 15 mm zżelowano w roztworze NaOH, a następnie przepłukano w wodzie destylowanej i pozostawiono do wysuszenia na 48 godzin.

The goal of tissue engineering is to create biodegradable, porous, three-dimensional scaffold that is capable to support, reinforce and organize the regenerating tissue [7]. In the body, cells are surrounded by extracellular matrix (ECM) that not only takes the role of physical support but also regulates cell proliferation and differentiation processes. Thus, it is important to create the 3D scaffold that is able to sustain *in vitro* tissue reconstruction as well as to mediate in tissue regeneration *in vivo* [8,9]. Chitosan, because of its structural similarity to glycosaminoglycans (GAG) of bone extracellular matrix, is often applied in bone tissue engineering as a component of calcium phosphate ceramics-based composite [10,11].

Implants (scaffolds) should be of optimum porosity, elasticity and suitable mechanical properties, which is a very important issue in biomaterials engineering, especially materials used in surgery and bone tissue engineering [12,13]. Integration of implant with the bone is beneficial when the porosity of the material is open type and about the size of the corresponding bone structure (50-450  $\mu\text{m}$ ) and the porosity and elasticity are adjusted to the place of implantation [14] (e.g. cortical or trabecular bone). This facilitates to ingrow tissues into implanted biomaterial which allows for good connection of implant-tissue, which also provides the appropriate fatigue strength of implant and the connection [15].

The aim of this work was to produce porous chitosan-based composites and evaluate their structural and mechanical properties such as Young's modulus. Moreover, the cytotoxicity of the novel composites was assessed using normal human osteoblast cell line.

## Materials and Methods

Two types of scaffolds were produced using high molecular weight chitosan (1174 kDa and 73% deacetylated) and two types of calcium phosphate ceramics:

- HAp granules (HA BIOCER granules,  $\Phi$  0.5-1.6 mm)
- chitosan-HA BIOCER composite
- mix of HAp/TCP granules (HT BIOCER granules,  $\Phi$  0.5-1.6 mm) - chitosan-HT BIOCER composite.

High molecular weight krill chitosan was kindly obtained from dr Anna Wojtasz-Pająk from National Marine Fisheries Research Institute in Gdynia. HA Biocer and HT Biocer granules were obtained by courtesy of President of Chema Elektromet Spółdzielnia Pracy Rzeszów Jarosław Proniewski. Chitosan was dissolved for 3 hours in acetic acid solution to obtain clear chitosan solution. Then HA BIOCER or HT BIOCER granules were added into chitosan solution (80 wt%) and obtained homogenous paste was pressed into cylinder mould of 15 mm diameter. Prepared samples of length 15 mm were then gelled in NaOH solution to form cylinder-shaped scaffolds, washed in distilled water and left to air dry for 48 hours.

Characterization of HA BIOCER and HT BIOCER granules size distribution was based on an image analysis using the Image-Pro Plus software (Media Cybernetics Inc., USA). Measurements of the mean diameter of grains (average length of diameters measured at 2 degree intervals passing through the object's centroid) and their shape were carried out. Also the classification of the grain size was made. The shape of the granules was assessed in two parameters:

- *Aspect* – ratio between major and minor axis of ellipse, equivalent to the object,
- *Roundness* =  $\text{perimeter}^2/4\pi \cdot \text{area}$ , value of 1 means circle.

Charakterystykę rozkładu wielkości granul HA BIOCER i granul HT BIOCER wykonano w oparciu o analizę obrazu wykorzystując oprogramowanie Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., USA). Wykonano pomiary średniej średnicy (średnia długość cięciw przechodzących przez środek ciężkości poprowadzonych co 2°) i kształtu ziaren oraz klasyfikacji ich wielkości. Kształt granul oceniono dwoma parametrami:

- *Aspect* – stosunek długości wielkiej i małej osi elipsy opisanej na obiekcie,
- *Roundness* =  $\text{obwód}^2/4\pi \cdot \text{powierzchnia}$ , wartość 1 oznacza kształt okrągły.

Struktura otrzymanych rusztowań kompozytowych została scharakteryzowana z wykorzystaniem tomografii komputerowej Skyscan 1174 wraz z dedykowanym oprogramowaniem (Skyscan, N.V., Belgia). Podczas skanowania próbka była obracana w zakresie kątowym 0°±180° z krokiem 0,7°. Po każdym kroku obrotu urządzenie wykonywało 4 zdjęcia w celu uśrednienia poziomu ekspozycji, łącznie uzyskano 264 fotografii. Zastosowano również przypadkowe przemieszczanie próbki dla każdej projekcji w celu eliminacji artefaktów. Obrazy zostały następnie zrekonstruowane do przekrojów poprzecznych z zastosowaniem oprogramowania NRecon (Skyscan N.V., Belgia). Po rekonstrukcji uzyskano zestaw 650 obrazów o izotropowej wielkości voxela na poziomie 18,3 μm w każdej osi. Zestaw ten był następnie poddany obróbce, polegającej na poprawie kontrastu i jasności, a następnie zastosowano filtr „Edge-” w celu ujednorodnienia jasności obrazu a następnie poprawiono krawędzie ziaren filtrem Open (Image-Pro Plus). Tak przygotowany zestaw analizowany był przy użyciu oprogramowania CTAn (porowatość i cechy strukturalne) oraz dodatkowo dokonano wizualizacji 3D programem CTVol (Skyscan N.V., Belgia), przy czym obszar ROI („obszar zainteresowań”) o średnicy 12,5 mm i długości 9 mm ustalono w środkowej części próbki. Rezultatem analizy wykonanej na podstawie mikrotomografii były dane dotyczące porowatości (otwarta, zamknięta i całkowita) oraz wielkości i kształtu porów.

Do zobrazowania mikrostruktury wytworzonych rusztowań kompozytowych zastosowano również mikroskopię skaningową SEM (Zeiss ULTRA plus).

Ocenę wartości modułu Younga wykonano na podstawie pomiarów czasów przejścia fali ultradźwiękowej z dokładnością ± 0,1 μs, wykorzystując próbnik materiałów MT-541 (UNIPAN) i głowice o częstotliwości 1 MHz. Wymiary próbki (średnica 15 mm i długość 15 mm) spełniają założenia nieograniczonego ciała izotropowego ( $h/\lambda=12,5 \gg 1$ ). Ze względu na dużą porowatość materiału badawczego (ok. 30%) i związane z tym silne tłumienie fali ultradźwiękowej, moduł Younga E wyznaczono z równania (1), przy założeniu izotropowości materiału oraz wartości liczby Poissona  $\nu=0,26$  [16]:

$$E = \rho \cdot C_L^2 \cdot \frac{(1+\nu)(1-2\nu)}{(1-\nu)} \quad (1)$$

gdzie:  $\rho$  – gęstość badanego materiału,  $C_L$  – prędkość fali w badanym ośrodku.

Cytotoksyczność kompozytów oszacowano metodą pośrednią za pomocą płynnych ekstraktów z zastosowaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB 1.19) pozyskanej z banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, England, UK). W celu uzyskania ekstraktów, cylindryczne kompozyty zostały pocięte na krążki oraz umieszczone w pełnym podłożu hodowlanym w stosunku 0,1 g próbki/ml podłoża na 24 godziny w temperaturze 37°C (ISO 10993-5) [17]. Kontrolę negatywną cytotoksyczności stanowiło podłoże hodowlane inkubowane w takich samych warunkach, ale bez biomateriałów. Kontrolę pozytywną cytotoksyczności stanowił 0,1% roztwór fenolu.

The structure was characterized with the use of computer tomography (Skyscan 1174, Belgium), along with dedicated software control. The sample was rotated in the range 0°±180° with 0.7° step during the scan. After each step of the rotation, the device made 4 images in order to average level of exposure, 264 images were obtained. The random movement of samples for each projection was also used in order to eliminate the artifacts. The images were then reconstructed into cross-sections using NRecon software (Skyscan N.V., Belgium). After reconstruction, a set of 650 images with the isotropic voxel size of 18.3 μm in each axis was obtained. The set was then treated to improve the contrast and brightness, then the filter "Edge-" was used for the homogenization of the brightness of image and the grains edges were corrected with the "Open" filter (Image-Pro Plus). The set of prepared images was analyzed using CTAn software (porosity and structural characteristics), additionally visualization with CTVol 3D software (Skyscan N.V., Belgium) was performed. The area of the ROI (region of interest) with a diameter of 12.5 mm and a length of 9 mm was set in the center part of the sample. The data on the porosity (open, closed and total), the size and shape of the pores were the results of the microtomography analysis.

Scanning electron microscopy was also applied to depict composite scaffolds (Zeiss ULTRA plus).

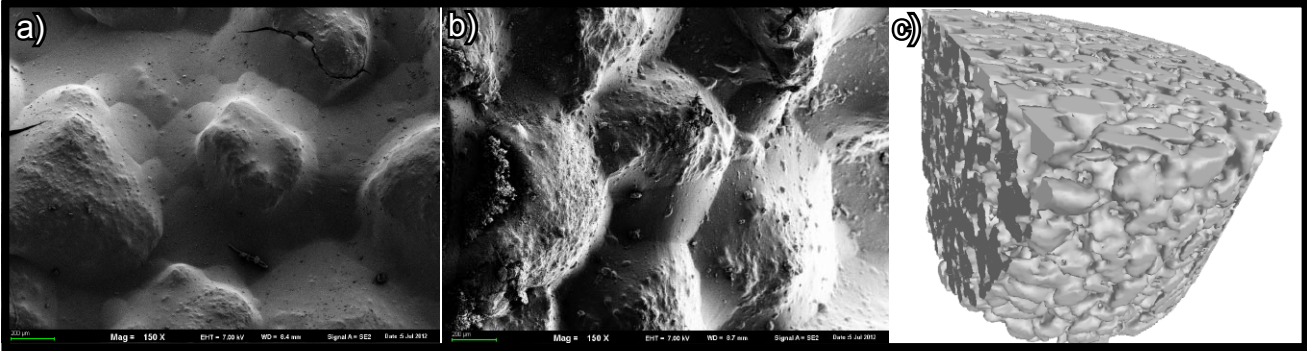
The Young's modulus value was assessed on the basis of measurements the time of ultrasonic wave transition with an accuracy of 0.1 μs, using device MT-541 (UNIPAN) and the heads of the frequency of 1 MHz. Dimensions of the sample (diameter of 15 mm and a length of 15 mm) meet the assumptions of infinite isotropic body ( $h/\lambda=12.5 \gg 1$ ). Due to the high porosity of the tested material (about 30%) and strong insulation of the ultrasonic wavelength, modulus (E) was calculated from the equation (1), assuming the isotropic properties of material and the Poisson's ratio  $\nu=0.26$  [16]:

$$E = \rho \cdot C_L^2 \cdot \frac{(1+\nu)(1-2\nu)}{(1-\nu)} \quad (1)$$

where  $\rho$  is the density and  $C_L$  is the speed of the wave in the tested material.

The cytotoxicity of composites was estimated indirectly by means of fluid extracts using normal human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19) obtained from ATCC (American Type Culture Collection, England, UK). To obtain extracts, cylinder-shaped composites were cut into discs and immersed in a fresh growth medium for 24 hours at 37°C (ISO 10993-5) [17]. The ratio between the sample weight and the volume of the extraction vehicle was 0.1 g/ml. Culture medium incubated in the same conditions but with no test material served as negative control of cytotoxicity. 0.1% phenol solution served as positive control of cytotoxicity. The lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity test was performed to estimate cytotoxicity effect of biomaterials extracts on hFOB 1.19 cell after 24, 48 and 72-hour exposure. LDH test is a very sensitive method that allows for membrane integrity assessment via measurement of the amount of cytoplasmic LDH released into the medium by cells with damaged plasmatic membrane [18]. To assess cytotoxicity, cells were seeded in flat bottom 96-multiwell plates in 100 μl complete culture medium at a concentration of  $1.5 \times 10^5$  cell/ml. After 24-hour incubation at 34°C, the growth medium was replaced with 100 μl of the appropriate extracts and 100 μl of 0.1% phenol solution. After 24, 48 and 72 hours of incubation, LDH test was performed to evaluate extract cytotoxicity. Briefly, 50 μl of the culture medium was transferred into corresponding wells of new 96-multiwell plate. Then, 100 μl of the LDH mixture (Sigma-Aldrich) was added to each sample transferred for testing.





**RYS. 1. Obrazowanie SEM rusztowań: a) chitozan-HA BIOCER, b) chitozan-HT BIOCER, c) przekrój modelu wirtualnego.**

**FIG. 1. SEM imaging of produced scaffolds: a) chitosan-HA BIOCER, b) chitosan-HT BIOCER, c) cross section of CT virtual model.**

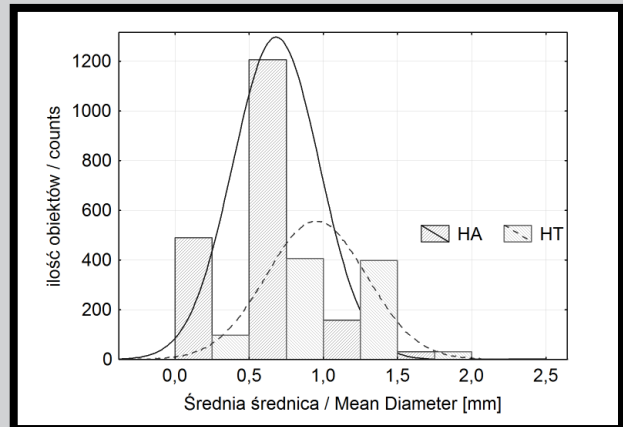
Test oparty o aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wykonano po 24, 48 i 72-godzinnej inkubacji z ekstraktami w celu oznaczenia cytotoksycznego wpływu ekstraktów z biomateriałów na komórki hFOB 1.19. Test LDH jest bardzo czułą metodą, która pozwala na ocenę integralności błony komórkowej poprzez pomiar ilości cytoplazmatycznej LDH uwolnionej do podłoża hodowlanego przez komórki z uszkodzoną błoną plazmatyczną [18]. W celu oznaczenia cytotoksyczności, zawiesinę komórek doprowadzano do gęstości  $1,5 \times 10^5$  kom./ml i rozlewano po 100  $\mu$ l do dołków w płytce 96-dołkowej z płaskim dnem. Po 24 godz. inkubacji w temp. 34°C delikatnie ściągano płyn hodowlany i dodawano po 100  $\mu$ l/dołek odpowiednich ekstraktów z materiałów oraz 100  $\mu$ l 0,1% roztworu fenolu – kontrola pozytywna cytotoxyczności. Po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji wykonano test LDH w celu oznaczenia cytotoxyczności. W skrócie, 50  $\mu$ l płynu hodowlanego przeniesiono do odpowiadających dołków w nowej płytce 96-dołkowej. Następnie do każdej próbki przeniesionej do testów, dodano po 100  $\mu$ l mieszanki LDH (Sigma-Aldrich). Płytkę chroniono przed światłem i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym odczytano absorbancję przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika do mikropłytek (Biotek ELx50). Absorbancję tła zmierzono przy długości fali 650 nm.

Wyniki testu LDH wyrażono jako procent kontroli oraz przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (odch. st.). W celu oceny statystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami wykonano unpaired t-test. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i zaznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek (GraphPad Prism 5, Version 5.03 Software).

## Wyniki i dyskusja

Na RYS. 1 przedstawiono obrazy SEM otrzymanych rusztowań kompozytowych oraz wirtualny model uzyskany z tomografii komputerowej. Widoczne jest występowanie pojedynczych ziaren i klastrów oraz sieci porów otwartych o nieregularnej geometrii i zróżnicowanych rozmiarach.

Charakterystyka granул wykonana w oparciu o analizę obrazu przedstawiona została na RYS. 2 oraz w TABELI 1. Największy udział mają granule z przedziału  $0,5 \pm 0,75$  mm dla kompozytu chitozan-HA BIOCER i ok. 1 mm dla kompozytu chitozan-HT BIOCER. Granule HA BIOCER charakteryzują się dużą jednorodnością, odwrotnie niż HT BIOCER, gdzie obserwuje się różne rozmiary ziaren. Ziarna mają w większości przypadków kształt wielościanów o wydłużonej jednej z osi, co potwierdzają wartości parametrów *Aspect* i *Roundness*, przy czym wartości deformacji kształtu w obydwu przypadkach badanych materiałów są zbliżone.



**RYS. 2. Histogram rozkładu wielkości granул HA BIOCER i HT BIOCER.**

**FIG. 2. Granules size distribution histogram for HA BIOCER and HT BIOCER.**

Plate was protected from light and incubated at room temperature for 30 minutes and the absorbance was measured at 490 nm, with reference wavelength of 650 nm using microplate reader (Biotek ELx50).

The LDH test results were expressed as the percentage of the control and reported as mean values  $\pm$  standard deviation (SD). The unpaired t-test was performed to evaluate statistical differences among groups by two population comparison. Statistical significance was considered at a probability  $P < 0.05$  and marked by asterisks in the figure (GraphPad Prism 5, Version 5.03 Software).

## Results and Discussion

FIG. 1. shows images of the composite scaffolds obtained by SEM and also a virtual model derived from tomography. There is a visible presence of individual grains, clusters and networks of open pores of irregularly geometry and sizes.

Granules characteristics made on the basis of an image analysis is shown in FIG. 2 and TABLE 1. The largest part in the range of 0.5 to 0.75 mm was observed for chitosan-HA BIOCER composite and about 1 mm for chitosan-HT BIOCER composite. The HA BIOCER granules are characterized by a large homogeneity, compared to HT BIOCER granules, where different sizes of grains were observed. In the most cases grains had the shape of polyhedron with elongated one of the axis, which affirm the values of *Aspect* and *Roundness* parameters; shape deformation values for both tested materials are approximated.

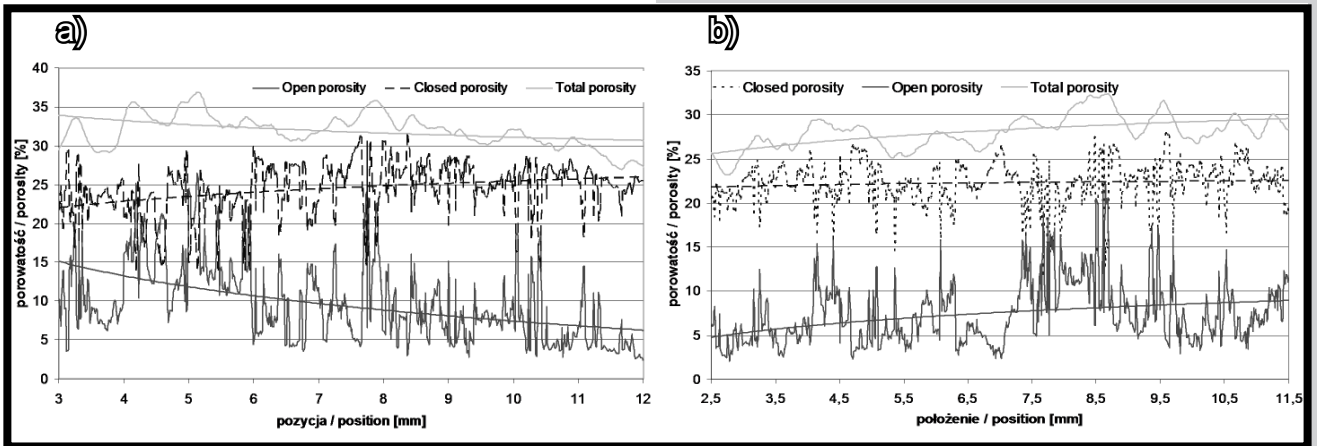


TABELA 1. Charakterystyka wielkościowa granul ( $\pm$  odch. st.).  
TABLE 1. Size characteristics of granules ( $\pm$ SD).

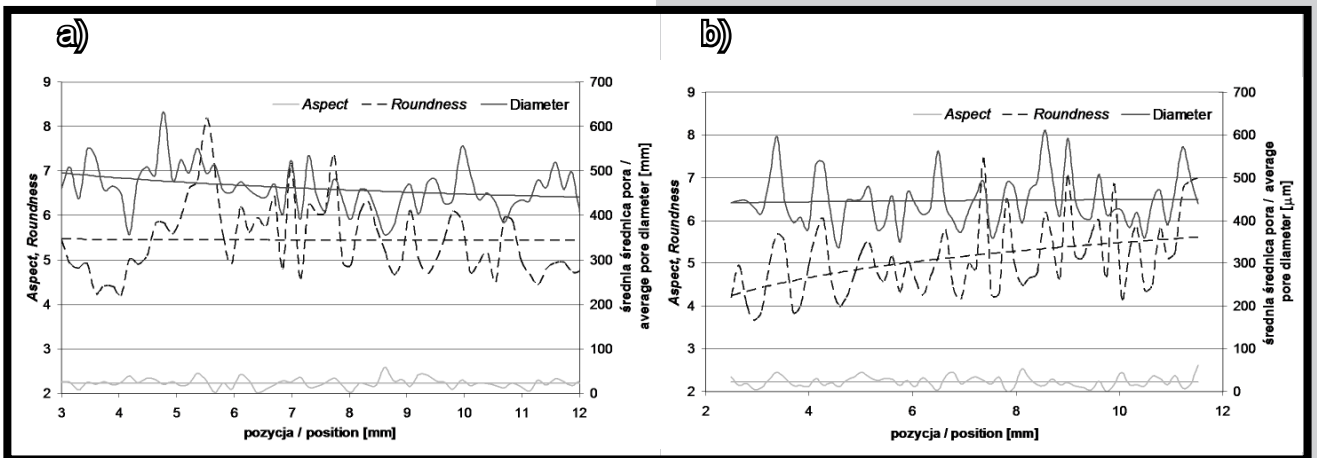
Material Material	śr. średnica avg. diameter [mm]	Aspect	Roundness
HA BIOCER	0.68 $\pm$ 0.29	1.41 $\pm$ 0.33	1.20 $\pm$ 0.18
HT BIOCER	0.95 $\pm$ 0.34	1.40 $\pm$ 0.33	1.22 $\pm$ 0.18

TABELA 2. Porowatość i charakterystyka porów w badanych materiałach (wartości średnie).  
TABLE 2. Porosity and characteristic of pores in tested materials (average values).

kompozyt composite	Porowatość $\pm$ odch. st. Porosity $\pm$ SD [%]			Charakterystyka porów $\pm$ odch. st. Characteristics of pores $\pm$ SD		
	otwarta open	zamknięta closed	całkowita total	śr. średnica avg. diameter [ $\mu$ m]	Aspect	Roundness
chitosan- HA BIOCER	9.7 $\pm$ 5.2	24.5 $\pm$ 3.5	31.9 $\pm$ 2.1	426 $\pm$ 51	2.23 $\pm$ 0.11	5.45 $\pm$ 0.83
chitosan- HT BIOCER	7.4 $\pm$ 3.6	22.3 $\pm$ 2.6	28.1 $\pm$ 1.9	446 $\pm$ 60	2.23 $\pm$ 0.13	5.09 $\pm$ 0.89



RYS. 3. Rozkład porowatości w próbce: a) chitosan-HA BIOCER, b) chitosan-HT BIOCER.  
FIG. 3. Porosity distribution in material: a) chitosan-HA BIOCER, b) chitosan-HT BIOCER.



RYS. 4. Rozkład średniej średnicy porów oraz wartości parametrów Aspect i Roundness dla kompozytów: a) chitosan-HA BIOCER, b) chitosan-HT BIOCER.  
FIG. 4. Distribution of mean diameter, Aspect and Roundness of pores for composite: a) chitosan-HA BIOCER, b) chitosan-HT BIOCER.

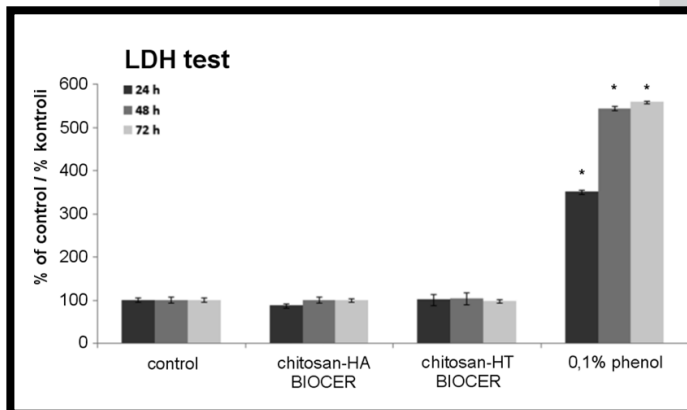
Porowatość obydwu badanych materiałów miała wartość ok. 30% z przewagą porów zamkniętych (RYS. 3 i 4, TABELA 2). Udział porów otwartych oscylował w granicach 5÷10%. Próbkę miały niemal stałą porowatość na całej długości, wykazując niewielki wzrost porowatości w górnej części spowodowany technologią produkcji. Średnią średnicę porów oceniono na poziomie 426  $\mu\text{m}$  dla biomateriału chitozan-HA BIOCER i 446  $\mu\text{m}$  dla biomateriału chitozan-HT BIOCER z rozrzutem odpowiednio 51 i 60  $\mu\text{m}$  (TABELA 2). Kształt porów był bardzo nieregularny, o czym świadczą wartości parametrów Aspect i Roundness, odpowiednio 2,23 i 5,45 dla kompozytu chitozan-HA BIOCER oraz 2,23 i 5,09 dla kompozytu chitozan-HT BIOCER, przy czym wartość odchylenia standardowego wynosiła od 4,9% do 17,6% wartości średniej.

Uzyskana porowatość rusztowań jest zbliżona do porowatości kości, a modyfikując proces wytwarzania można uzyskać porowatość dostosowaną do konkretnych wymagań. Wartości te są dobrze skorelowane z wartością modułu Younga, która wynosiła:

- chitozan-HA BIOCER:  $E=1,38$  GPa, odch.st. 0,06 GPa
- chitozan-HT BIOCER:  $E=1,22$  GPa, odch.st. 0,15 GPa.

Wysoka porowatość (30%) powoduje osłabienie kontaktu pomiędzy granulami, co przekłada się na zmniejszenie sprężystości rusztowania. Stąd otrzymane niskie wartości modułu Younga, jednakże zbliżone do modułu dla kości gąbczastej (0,18-0,33 GPa) [19]. Zmniejszenie porowatości może w znacznym stopniu podwyższyć moduł Younga aż do wartości uzyskiwanej dla kości zbitnej (17-19 GPa) [20]. Wskazane jest zatem kontynuowanie badań właściwości mechanicznych w powiązaniu ze strukturą i porowatością kompozytów na bazie chitozanu w celu uzyskania wysokiej zgodności strukturalno – mechanicznej z tkankami.

Wyniki testu LDH na oznaczenie cytotoksyczności jednoznacznie wykazały, że kompozyty chitozan-HA BIOCER oraz chitozan-HT BIOCER nie wywierają toksycznego wpływu w stosunku do komórek linii hFOB 1.19. Ilość LDH uwolnionej do podłoża hodowlanego jest bliska 100% w porównaniu do kontroli przez cały czas trwania doświadczenia (RYS. 5).



Jedynie po 24 godzinach inkubacji z ekstraktem z materiału chitozan-HA BIOCER, ilość LDH uwolnionej do podłoża obniżyła się do około 90% w porównaniu do kontroli, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie. Uzyskane przez nas wyniki są zgodne z obserwacjami prezentowanymi przez innych badaczy. Mecwan i wsp. udowodnili, że chitozan wykazuje dużą biokompatybilność w stosunku do komórek linii ludzkiego kostniakomięsaka (Saos-2) [4]. Chun i wsp. wykazali, że porowate rusztowanie na bazie chitozanu jest biokompatybilne i wspomaga wzrost pierwotnej linii ludzkich fibroblastów skóry (HDFs) [9]. Natomiast Malafaya i wsp. wykazali, że ekstrakt z chitozanowego rusztowania nie wywiera toksycznego wpływu w stosunku do komórek linii fibroblastów (L929) [8].

Porosity of both materials had the value of about 30% with a predominance of closed pore (FIG. 3 and 4, TABLE 2). The amount of open pores was in range 5÷10%. The samples had almost constant porosity on the entire length, showing a small increase of porosity in the upper part, caused by the technology of production. Average pore diameter was estimated at 426  $\mu\text{m}$  for chitosan-HA BIOCER biomaterial and 446  $\mu\text{m}$  for chitosan-HT BIOCER biomaterial with the standard deviation of 51  $\mu\text{m}$  and 60  $\mu\text{m}$  respectively (TABLE 2). The shape of the pores was very irregular, which provide the values of Roundness and Aspect parameters respectively 2.23 and 5.45 for chitosan-HA BIOCER and 2.23 and 5.09 for chitosan-HT BIOCER, and the value of the standard deviation was in the range from 4.9% to 17.6% of the mean value.

Obtained value of scaffold's porosity is similar to bone porosity. It is possible to modify the porosity to the specific requirements by manufacturing process. These values are well correlated with the value of the Young's modulus, which was:

- chitosan-HA BIOCER:  $E = 1.38$  GPa, SD 0.06 GPa
- chitosan-HT BIOCER:  $E = 1.22$  GPa, SD 0.15 GPa.

High porosity (30%) provokes a weakening of the contact between the granules, thus reducing the elasticity of scaffolds. Hence the low values of the Young's modulus, however, received close to the modulus for the trabecular bone (0.18-0.33 GPa) [19]. Reduction of porosity can substantially increase the modulus up to a value obtained for cortical bone (17-19 GPa) [20]. It is therefore necessary to continue the research of mechanical properties in conjunction with the structure and porosity composites based on chitosan in order to obtain high structural – mechanical compatibility with tissues.

The cytotoxicity LDH test results clearly indicate that chitosan-HA BIOCER and chitosan-HT BIOCER composites do not exert toxic effect on hFOB 1.19 cells. The amount of LDH released to the culture medium is near 100% compared to the control throughout the full length of the experiment (FIG. 5).

**RYS. 5. Określenie cytotoksyczności ekstraktów z testowanych kompozytów za pomocą testu LDH. Wyniki wyrażono jako wartości średnie  $\pm$  odch. st. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i oznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek.**

**FIG. 5. Cytotoxicity evaluation of tested composites extracts by means of LDH test. The results were expressed as the mean values  $\pm$  SD. Statistical significance was considered at a probability  $P < 0.05$  and marked by asterisks in the figure.**

After 24 hour of incubation with the chitosan-HA BIOCER extract, the amount of LDH released to the medium was decreased to approximately 90% compared to the control, but the result was not statistically significant. Our results are in agreement with observations presented by other researchers. Mecwan et al. proved that chitosan shows great biocompatibility when tested on human osteosarcoma cell line (Saos-2) [4]. Chun et al. revealed that porous, chitosan-based scaffold is biocompatible and supports the growth of primary human dermal fibroblasts (HDFs) [9]. Whereas Malafaya et al. showed that chitosan-based scaffold extract does not exert toxic effect on fibroblast cell line (L929) [8].

Jednakże w innej swojej pracy, Malafaya i Reis udowodnili, że rusztowanie na bazie chitozanu wyprodukowane z niespieczonego HAp wywołuje toksyczny efekt w stosunku do komórek linii L929, co jest spowodowane sorpcją kationów dwuwartościowych z podłoża hodowlanego, które są niezbędne do adhezji i prawidłowego funkcjonowania komórek. Co interesujące, to samo rusztowanie wyprodukowane ze spieczzonego HAp nie powoduje sorpcji jonów i nie wykazuje toksycznego efektu [11].

## Wnioski

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć wniosek, że wyprodukowane kompozyty na bazie krylowego chitozanu wykazują duże podobieństwo strukturalne i mechaniczne do tkanek organizmu ludzkiego, są nietoksyczne i przez to są obiecującym materiałem do stosowania w inżynierii tkankowej kości.

## Podziękowania

*Praca finansowana w ramach DS MNd 2. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w projekcie realizowanym zgodnie z umową nr POPW.01.03.00-06-010/09-00 w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi Priorytetowej I, Nowoczesna Gospodarka, Działanie 1.3. Wspieranie Innowacji.*

However, another Malafaya and Reis's report proved that chitosan-based scaffold produced with unsintered HAp shows toxic effect on L929 cells, what is provoked by sorption of divalent cations from the growth medium, which are necessary for proper cell adhesion and functions. What is interesting, the same chitosan-based scaffold but produced with sintered HAp does not cause sorption of the ions and does not show toxic effect [11].

## Conclusions

In summary, basing on the obtained results, it can be concluded that created krill chitosan-based composites exhibit large structural and mechanical similarity to the tissues of the human body, are non-toxic and are promising material for bone tissue engineering application.

## Acknowledgements

*This work was supported by financial support from DS MNd 2. The paper was developed using the equipment purchased within the agreement No. POPW.01.03.00-06-010/09-00 Operational Program Development of Eastern Poland 2007-2013, Priority Axis I, Modern Economy, Operations 1.3. Innovations Promotion.*

## Piśmiennictwo

- [1] Sopyan Y.I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A.: Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 8 (2007) 116-123.
- [2] Aronov D., Karlov A., Rosenman G.: Hydroxyapatite nanoceramics: Basic physical properties and biointerface modification. *Journal of the European Ceramic Society* 27 (2007) 4181-4186.
- [3] Belcarz A., Ginalska G., Polkowska I., Przekora A., Słószarczyk A., Zima A., Paszkiewicz Z.: Pilot clinical study of efficacy of flexible HAp-based composite for bone defects replacement. *Engineering of Biomaterials* 99-101 (2010) 16-18.
- [4] Mecwan M.M., Rapalo E.G., Mishra R.S., Haggard O.W., Bumgardner D.J.: Effect of molecular weight of chitosan degraded by microwave irradiation on lyophilized scaffold for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 97A(1) (2011) 66-73.
- [5] Mellegard H., Strand P.S., Christensen E.B., Granum E.P., Hardy P.S.: Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. *International Journal of Food Microbiology* 148 (2011) 48-54.
- [6] Muzzarelli A.A.R.: Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 76 (2009) 167-182.
- [7] Madhally V.S., Matthew T.W.H.: Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20 (1999) 1133-1142.
- [8] Malafaya B.P., Pedro J.A., Peterbauer A., Gabriel C., Redl H., Reis L.R.: Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16 (2005) 1077-1085.
- [9] Chun J.H., Kim W-G, Kim H-C.: Fabrication of porous chitosan scaffold in order to improve biocompatibility. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 69 (2008) 1573-1576.
- [10] Kim E.S., Cho W.Y., Kang J.E., Kwon C.I., Lee B.E., Kim H.J., Chung H., Jeong Y.S.: Three-dimensional porous collagen/chitosan complex sponge for tissue engineering. *Fibers and Polymers* 2(2) (2001) 64-70.

## References

- [11] Malafaya B.P., Reis L.R.: Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 644-660.
- [12] Szaraniec B., Kotula K., Chłopek J.: Kompozyty gradientowe dla medycyny regeneracyjnej. *Kompozyty* 9(3) (2009) 205-209.
- [13] Hannink G., Arts C.J.J.: Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury, International Journal of the Care of the Injured* 42 (2011) S22-S25.
- [14] Schliephake H., Neukam F.W., Klosa D.: Influence of pore dimensions on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone graft substitutes. *Ahistometric study. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 20 (1991) 53-58.
- [15] Otsuki B., Takemoto M., Fujibayashi S., Neo M., Kokubo T., Nakamura T.: Novel Micro-CT Based 3-Dimensional Structural Analyses of Porous Biomaterials. *Key Engineering Materials* 330-332 (2007) 967-970.
- [16] Deymier-Black C.A., Almer D.J., Stock R.S., Dunand C.D.: Variability in the elastic properties of bovine dentin at multiple length scales. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 5(1) (2012) 71-81.
- [17] ISO 10993-5:2009 (E). *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.* International Organization for Standardization 2009.
- [18] Putnam K.P., Bombick D.W., Doolittle D.J.: Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro* 16 (2002) 599-607.
- [19] Aoki H.: *Medical Applications of Hydroxyapatite.* Ishiyaku EuroAmerica, Inc., Tokyo, St. Louis 1994.
- [20] Suchanek W., Yoshimura M.: Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement. *Journal of Materials Research* 13(1) (1998) 94-117.



# WPŁYW REAKTYWNOŚCI JONOWEJ BIOMATERIAŁÓW NA ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK IN VITRO

AGATA PRZEKORA<sup>1\*</sup>, DOROTA KOŁODYŃSKA<sup>2</sup>,  
GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII,  
UL. W. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN

<sup>2</sup> UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE,  
ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ,  
PL. MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ 2, 20-031 LUBLIN

<sup>3</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

\* E-MAIL: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

## Streszczenie

Powszechnie wiadomo, że reaktywne jonowo biomateriały indukują różne interakcje z otaczającym środowiskiem, powodując zmiany stężenia jonów, zwłaszcza kluczowych jonów takich jak wapń, magnez i fosfor, co może wpływać na metabolizm i żywotność komórek.

Głównym składnikiem części mineralnej kości i zębów jest hydroksyapatyt (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). W celu polepszenia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej hydroksyapatytu można połączyć go z dodatkowym komponentem organicznym np. polisacharydowym.

W niniejszej pracy oznaczano reaktywność jonową oraz cytotoksyczność 2 typów kompozytów na bazie glukanu (kompozytu glukan-HAp i kompozytu glukan-C-HAp) oraz poszczególnych ich składników: wysokoporowatych granul hydroksyapatytu (HAp), wysokoporowatych granul HAp węglanowo-magnezowych (C-HAp) oraz glukanu. Reaktywność jonową testowanych materiałów oznaczono za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA). Badania *in vitro* przeprowadzono z zastosowaniem linii komórkowej hFOB 1.19 (ludzkie płodowe osteoblasty) oraz pierwotnej hodowli fibroblastów skóry (HSF). Cytotoksyczność ekstraktów z biomateriałów określono z użyciem 2 testów – MTT i NRU.

Wyniki badań wyraźnie wskazały, że dodatek wysokoporowatych granul HAp i C-HAp do glukanu powoduje, że kompozyt jest reaktywny jonowo, co wpływa na metabolizm i żywotność hodowanych komórek.

**Słowa kluczowe:** reaktywność jonowa, kompozyt, cytotoksyczność, hodowla komórek

**Spis skrótów:** hydroksyapatyt (HAp), hydroksyapatyt węglanowo-magnezowy (C-HAp), absorpcyjna spektrometria atomowa (ASA), ludzkie fibroblasty skóry (HSF), ludzkie płodowe osteoblasty (hFOB), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), roztwór symulujący płyny ustrojowe (SBF), test wychwytu czerwieni obojętnej (NRU), roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami (PBS), dodecylosiarczan sodu (SDS), białko surowicy płodowej (FBS)

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 59-65]

# THE EFFECT OF BIOMATERIALS ION REACTIVITY ON CELL VIABILITY IN VITRO

AGATA PRZEKORA<sup>1\*</sup>, DOROTA KOŁODYŃSKA<sup>2</sup>,  
GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,  
UL. W. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> MARIA CURIE-SKŁODOWSKA UNIVERSITY IN LUBLIN,  
DEPARTMENT OF INORGANIC CHEMISTRY,  
PL. MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ 2, 20-031 LUBLIN, POLAND

<sup>3</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

\* E-MAIL: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

## Abstract

It is widely known that surface-reactive biomaterials induce various interaction with surrounded environment, causing changes in the ion concentration, especially with respect to the crucial ions such as calcium, magnesium and phosphorous, what may significantly affect the cell metabolism and viability. Hydroxyapatite (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is the main inorganic component of bones and teeth. In order to improve mechanical properties and surgical handiness of hydroxyapatite, an organic component e.g. polysaccharide can be added.

In this work, the ion reactivity and cytotoxicity of 2 types of glucan-based composites (composite glucan-HAp and composite glucan-C-HAp) were evaluated. Additionally, the ion reactivity and cytotoxicity of each component of the composites: highly porous hydroxyapatite (HAp), highly porous carbonated-Mg-HAp (C-HAp) and glucan were evaluated. The ion reactivity of tested materials was assessed by atomic absorption spectrometry (AAS). *In vitro* tests were carried out using hFOB 1.19 cell line (human fetal osteoblast cells) and human skin fibroblast primary cell culture (HSF). The cytotoxicity of biomaterials extracts was estimated by 2 methods – MTT and NRU.

Our studies clearly indicated that addition of highly porous HAp and C-HAp granules to the glucan, make the composite ion reactive, what affects the metabolism and viability of cultured cells.

**Keywords:** ion reactivity, composite, cytotoxicity, cell culture

**Abbreviations:** hydroxyapatite (HAp), carbonated-magnesium doped hydroxyapatite (C-HAp), atomic absorption spectrometry (AAS), human skin fibroblasts (HSF), human fetal osteoblasts (hFOB), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), simulating body fluid (SBF), neutral red uptake test (NRU), phosphate buffer saline (PBS), sodium dodecyl sulfate (SDS), fetal bovine serum (FBS)

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 59-65]

Powszechnie wiadomo, że zmiany stężenia jonów w środowisku komórkowym, zwłaszcza kluczowych jonów takich jak wapń, magnez i fosfor, mogą wpływać na metabolizm i żywotność komórek. Reaktywne jonowo biomateriały indukują różne interakcje z otaczającym środowiskiem (podłożem hodowlanym, SBF, płynami fizjologicznymi), co powoduje zmiany stężenia jonów i hamuje metabolizm hodowanych komórek [1,2]. Dlatego w szczególności powinno się zwrócić uwagę na ocenę potencjału klinicznego tych biomateriałów, których powierzchnia wykazuje znaczną reaktywność jonową. Wstępny „screening” biomateriałów, które nie indukują dużych zmian jonowych w środowisku możliwy jest dzięki zastosowaniu uproszczonych modeli *in vitro* z wykorzystaniem SBF czy podłoża hodowlanego [3].

Głównym składnikiem części mineralnej kości i zębów jest hydroksyapatyt (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Ceramika wapniowo-fosforanowa w formie granul, jak i porowatego rusztowania (często kompozytu na bazie HAp), jest materiałem powszechnie stosowanym jako substytut tkanki kostnej w ortopedii i stomatologii. Szerokie zastosowanie tego surowca jako typowego ortopedycznego biomateriału wszczepialnego, wynika z jego charakterystycznych właściwości, takich jak kościopodobna struktura, brak toksyczności i immunogenności, bioaktywność oraz biokompatybilność [4-6]. W celu poprawienia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej hydroksyapatytu można połączyć go z dodatkowym komponentem organicznym np. polisacharydowym [7,8]. Zastosowany polisacharyd powinien cechować się takimi właściwościami jak brak toksyczności, szybka biodegradacja, podatność na chemiczną lub enzymatyczną modyfikację oraz stymulacja adhezji i proliferacji komórek [9]. Ponadto powinien być dobrym czynnikiem uplastyczniającym [7].

Celem niniejszej pracy było określenie reaktywności jonowej oraz cytotoksyczności nowych kompozytów: na bazie HAp o wysokiej porowatości i glukanu (glukan-HAp) oraz na bazie hydroksyapatytu węglanowo-magnezowego (C-HAp) o wysokiej porowatości i glukanu (glukan-C-HAp). Kompozyt zbudowany z glukanu i wysokoporowatych granul HAp jest poręczny chirurgicznie oraz charakteryzuje się dobrymi parametrami mechanicznymi, zbliżonymi do parametrów kości gąbczastej [7]. Dodatkowo określono reaktywność jonową i cytotoksyczność poszczególnych składników biomateriałów: HAp, C-HAp oraz glukanu, co umożliwiło ocenę, który komponent kompozytu wykazuje największą zdolność interakcji jonowych z podłożem hodowlanym.

## Materiały i metody

Kompozyty glukan-HAp i glukan C-HAp zostały przygotowane zgodnie z protokołem opisanym w patencie P-387872 [10].

Zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w podłożu hodowlanym po inkubacji z testowanymi materiałami określono za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA). W tym celu materiały umieszczono w pełnym podłożu hodowlanym w stosunku 0,1 g próbki/ml podłoża i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Podłoże hodowlane inkubowane w takich samych warunkach, ale bez testowanych biomateriałów stanowiło kontrolę. Ekstrakty przygotowano zgodnie ze standardami ISO 10993-5. Metoda ASA pozwala na szybkie i wiarygodne oznaczenie jonów wapnia i magnezu. W celu oznaczenia zawartości jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w próbkach metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej zastosowano spektrometr ASA firmy Varian, model SpectrAA 240FZ wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy. Oznaczenia wykonano przy długości fal 422,7 nm dla  $\text{Ca}^{2+}$  i 285,2 nm dla  $\text{Mg}^{2+}$ .

## Introduction

It is well known that changes in the ion concentration of culture environment, especially with respect to the crucial ions such as calcium, magnesium and phosphorous, may significantly affect the cell metabolism and viability. Surface-reactive biomaterials provoke different ion interactions with surrounded environment (medium, SBF, physiological fluids) and cause changes in the ion concentration what inhibits the metabolism of cultured cells [1,2]. Thus it is important to realize that specific attention should be paid to evaluate the clinical potential of the surface-reactive biomaterials before their application *in vivo*. An initial screening of the biomaterial that does not induce large ionic changes in the environment is possible when simplified model system such as SBF or culture medium is applied [3].

Hydroxyapatite (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is the main inorganic component of bones and teeth. Calcium phosphate ceramics in the form of granules and porous scaffolds (often HAp-based composites) are widely used as bone substitutes in dentistry and orthopedics. It is extensively applied as a typical orthopedic biomaterial, because of its characteristic properties such as bone-like structure, nontoxicity and nonimmunogenicity, biocompatibility and bioactivity [4-6]. In order to improve mechanical properties and surgical handiness of hydroxyapatite, an organic component e.g. polysaccharide can be added [7,8]. Applied polysaccharide should be characterized by specific properties such as nontoxicity, rapid biodegradation, prone to chemical or enzymatic modification and simulation of cell adhesion and proliferation [9]. Moreover, it should be considered as a good plasticizing agent [7].

The aim of this work was to evaluate the ion reactivity and cytotoxicity of the novel composites: containing highly porous hydroxyapatite and glucan (glucan-HAp) and containing highly porous carbonated-Mg-hydroxyapatite (C-HAp) and glucan (glucan-C-HAp). The composite containing glucan and highly porous HAp granules, performs surgical handiness and good mechanical parameters resembling human spongy bone [7]. In addition, the ion reactivity and cytotoxicity of HAp, C-HAp and glucan alone were evaluated to assess which component of the composite reveals the greatest ion interactions with culture medium.

## Materials and Methods

Composites glucan-HAp and glucan-C-HAp were prepared according to procedure described in Polish Patent P-387872 [10].

Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ion concentration of the medium after incubation with test materials were evaluated by atomic absorption spectrometry (AAS). To assess ion reactivity, materials were immersed in a complete culture medium, the ratio between the sample weight and the volume of the extraction vehicle was 0.1 g/ml. Then samples were incubated for 24 hours at  $37^\circ\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . Culture medium incubated in the same conditions but with no test material served as a control. Extracts were prepared according to ISO 10993-5. The AAS method allows for quickly and reliably determination of calcium and magnesium ions. For determination of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  contents in the samples by the atomic absorption spectrometry method, a Varian AAS spectrometer, SpectrAA 240FZ model with an air-acetylene flame was applied. The wavelengths were set to 422.7 nm for  $\text{Ca}^{2+}$  and 285.2 nm for  $\text{Mg}^{2+}$ . Calcium carbonate and magnesium nitrate(V) were used as standards to prepare calibration curves with at least 4 concentrations of calcium or magnesium within the analytical range, respectively.



Odpowiednio, węglan wapnia i azotan(V) magnezu wykorzystano do przygotowania roztworów wzorcowych o przynajmniej 4 stężeniach. W celu eliminacji interferencji pochodzących od jonów fosforanowych(V) dodano chlorek lantanu, w takiej ilości by osiągnąć końcowe stężenie równe 1%. Stężenie jonów metali w badanych próbkach obliczono w oparciu krzywe wzorcowe. Pomiar wykonano trzykrotnie dla każdej próbki i wyniki podano jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Przygotowane w wyżej opisany sposób 100% ekstrakty z testowanych materiałów były następnie poddane testom na oznaczanie cytotoksyczności *in vitro*.

W celu określenia cytotoksyczności biomateriałów wykonano testy pośrednie (z zastosowaniem ekstraktów) MTT oraz NRU. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB 1.19) pozyskanej z banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, England, UK) oraz pierwotnej hodowli fibroblastów wyprowadzonej z ludzkiej skóry (HSF). W celu izolacji fibroblastów, małe fragmenty ludzkiej skóry umieszczono w dołkach płytki 24-dołkowej, przyklejono do dna dołka za pomocą sterylnej agarozy, zalano podłożem hodowlanym wzbogaconym o czynniki wzrostu fibroblastów i inkubowano przez okres około 2 tygodni w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie w dołkach płytki 24-dołkowej uzyskano monolayer komórek, które zostały przekazane do testów na określenie cytotoksyczności. Hodowlę komórek hFOB 1.19 prowadzono w podłożu DMEM/F12 wzbogaconym o 10% bydlęcą surowicę płodową (FBS) w temperaturze 34°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, natomiast hodowlę ludzkich fibroblastów skóry (HSF) prowadzono w podłożu RPMI wzbogaconym o 10% FBS w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

W celu określenia cytotoksyczności zawiesinę komórek linii hFOB 1.19 doprowadzano do gęstości 1,5 x 10<sup>5</sup> kom./ml, a zawiesinę komórek HSF do gęstości 1 x 10<sup>5</sup> kom./ml i rozlewano po 100  $\mu$ l do dołków w płytce 96-dołkowej z płaskim dnem. Po 24 godz. inkubacji w temp. 34°C – hFOB i 37°C – HSF, delikatnie ściągano płyn hodowlany i dodawano po 100  $\mu$ l dołek odpowiednich ekstraktów z materiałów oraz 100  $\mu$ l 0,1% roztworu fenolu – kontrola pozytywna cytotoksyczności. Komórki hodowane w podłożu kontrolnym (inkubowanym w takich samych warunkach co ekstrakty) stanowiły kontrolę. Po 24 i 48 godz. inkubacji oznaczono aktywność metaboliczną komórek metodą MTT. Po 48 godz. ekspozycji na działanie ekstraktów oznaczono żywotność komórek metodą NRU.

Test MTT przeprowadzono w celu określenia aktywności metabolicznej komórek po ekspozycji na działanie ekstraktów z materiałów. Po 24 i 48 godz. inkubacji z ekstraktami, do dołków w płytce 96-dołkowej dodano po 25  $\mu$ l roztworu MTT (5 mg/ml w buforze PBS) i płytki umieszczono na 3 godziny w inkubatorze. Kryształ formazanu powstałe w żywych, aktywnych metabolicznie komórkach rozpuszczono dodając 100  $\mu$ l dołek roztworu SDS/HCl (10% SDS przygotowany w 0,01 M HCl). Po 12 godzinach inkubacji, odczytano absorbancję przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika do mikroplatek (Biotek ELx50).

Test NRU przeprowadzono w celu określenia cytotoksycznego wpływu ekstraktów z biomateriałów w stosunku do komórek hFOB oraz HSF. Po 48 godzinnej inkubacji z ekstraktami, warstwę komórek przepłukano buforem PBS, a do dołków dodano po 100  $\mu$ l roztworu czerwieni obojętnej (50  $\mu$ g/ml w podłożu hodowlanym). Następnie płytki inkubowano przez 3 godziny, roztwór NR usunięto, warstwę komórek przepłukano dwa razy buforem PBS i dodano po 100  $\mu$ l dołek roztworu rozpuszczalnika (1% lodowaty kwas octowy/50% etanol/49% woda destylowana). Następnie płytki wytrząsano przez 20 minut i odczytano absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika do mikroplatek (Biotek ELx50).

To eliminate phosphate(V) ions interference during the assay, lanthanum chloride was added to reach final concentration of 1%. Concentration of metal ions in tested solutions was calculated from the prepared standard curves. The measurements were repeated three times for each sample and the results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (SD). Prepared 100% extracts were subjected to the cytotoxicity *in vitro* tests.

MTT and NRU indirect tests (by means of fluid extracts) were performed to estimate the cytotoxicity of biomaterials. The experiments were carried out using normal human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19) obtained from ATCC (American Type Culture Collection, England, UK) and human fibroblast primary cell culture isolated from human skin (HSF). In order to isolate fibroblasts, small pieces of human skin were immersed in wells of 24-multiwell plate, the skin was attached to the bottom by sterile agarose and immersed in culture medium supplemented with fibroblast growth factors. After 2-week incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, the cell monolayer was obtained and cells were subjected into *in vitro* cytotoxicity tests. HFOB 1.19 cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained at 34°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air and human skin fibroblasts (HSF) were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

To assess cytotoxicity, hFOB 1.19 cells were seeded in flat bottom 96-multiwell plates in 100  $\mu$ l complete culture medium at a concentration of 1.5 x 10<sup>5</sup> cell/ml and HSF cells at a concentration of 1 x 10<sup>5</sup> cell/ml. After 24-hour incubation at 34°C – hFOB and at 37°C – HSF, the growth medium was replaced with 100  $\mu$ l of the appropriate extracts and 100  $\mu$ l of 0.1% phenol solution – positive control of cytotoxicity. Cells cultured in the control medium (incubated in the same standard conditions as extracts), served as control. After 24 and 48 hours of incubation, MTT test was performed to evaluate cell metabolic activity. After 48-hour exposure to the extracts, the NRU assay was performed to assess cell viability.

MTT test was performed to assess metabolic activity of cells after exposure to materials extracts. After 24 and 48-hour incubation with extracts, 25  $\mu$ l per well of MTT solution (5 mg/ml in PBS buffer) was added and plates were returned to the incubator for 3 hours. Formazan crystals formed in live, metabolic active cells were dissolved by adding 100  $\mu$ l well of SDS/HCl solution (10% SDS prepared in 0.01 M HCl). After 12 hours of incubation, the absorbance was measured at 570 nm using microplate reader (Biotek ELx50).

NRU test was performed to evaluate cytotoxicity effect of biomaterials extracts on hFOB and HSF cells. After 48-hour incubation with extracts, cell layers were rinsed with PBS buffer and 100  $\mu$ l per well of neutral red working solution was added (50  $\mu$ g/ml in culture medium). Then, the plates were returned to the incubator for 3 hours, the neutral red solution was removed, cell layers were rinsed twice with PBS and 100  $\mu$ l/well of solvent (1% glacial acetic acid/50% ethanol/49% distilled water) was added. Then plates were agitated for 20 minutes and the absorbance was measured at 540 nm using microplate reader (Biotek ELx50).

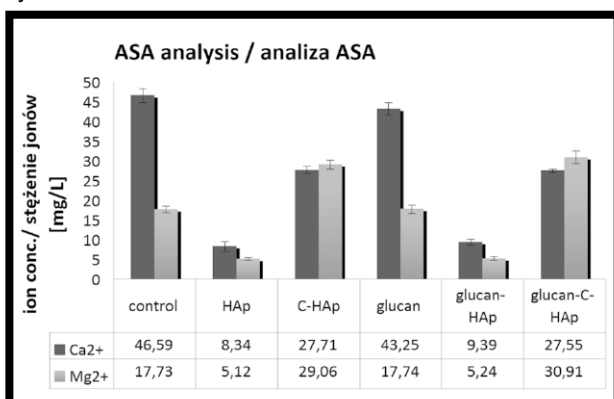
*In vitro* cytotoxicity tests were repeated in 3 separate experiments. The results obtained in MTT and NRU tests were expressed as the percentage of the control and reported as mean values  $\pm$  standard deviation (SD). The unpaired t-test was performed to evaluate statistical differences among groups by two population comparison. Statistical significance was considered at a probability P < 0.05 and marked by asterisks in the figure (GraphPad Prism 5, Version 5.03 Software).



Testy oceny cytotoksyczności *in vitro* zostały powtórzone w 3 niezależnych eksperymentach. Wyniki testu MTT i NRU wyrażono jako procent kontroli oraz przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). W celu oceny statystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami wykonano unpaired t-test. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i zaznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek (GraphPad Prism 5, Version 5.03 Software).

## Wyniki i dyskusja

W celu oceny reaktywności jonowej materiałów wykonano analizę ASA ekstraktów. W eksperymencie wykazano, że materiały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp indukują istotne interakcje jonowe z podłożem hodowlanym (RYS. 1). Materiały HAp i glukan-HAp powodują sorpcję jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  z podłoża hodowlanego do krytycznie niskich wartości. Po 24-godzinnej inkubacji, zaobserwowano obniżenie stężenia jonów  $Ca^{2+}$  do około 9 mg/L (stężenie jonów  $Ca^{2+}$  w podłożu kontrolnym było równe 46,6 mg/L). Zanotowano również duże obniżenie stężenia jonów  $Mg^{2+}$  do około 5 mg/L w porównaniu do podłoża kontrolnego – 17,7 mg/L. Biomateriały C-HAp i glukan-C-HAp powodują sorpcję jonów  $Ca^{2+}$  z podłoża. Zaobserwowano obniżenie stężenia jonów  $Ca^{2+}$  do około 27 mg/L w porównaniu do podłoża kontrolnego. Biomateriały zawierające w swoim składzie granule węglanowo-magnezowe HAp uwalniają jony  $Mg^{2+}$  do podłoża, powodując wzrost stężenia tych jonów w pożywce do około 30 mg/L w porównaniu do podłoża kontrolnego. Glukan nie zmienia stężenia jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  w podłożu hodowlanym (RYS. 1). Zatem, można wyciągnąć wniosek, że dodatek granul HAp i C-HAp o wysokiej porowatości do glukanu powoduje, że kompozyt jest reaktywny jonowo. Przypuszczamy, że spadek stężenia kationów dwuwartościowych w podłożu hodowlanym wynika ze spontanicznego tworzenia się warstwy apatytu na powierzchni HAp. Podczas gdy wzrost stężenia jonów  $Mg^{2+}$  w podłożu przypisujemy procesowi uwalniania tych jonów z węglanowego HAp z domieszką magnezu (C-HAp). Ekstrakty z materiałów pozyskane w eksperymencie określającym reaktywność jonową zostały poddane testom na oznaczanie cytotoksyczności – MTT i NRU, w celu oceny wpływu zmian stężenia jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  na metabolizm i żywotność komórek *in vitro*.



**RYS. 1. Zmiany stężenia jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  w testowanych ekstraktach oszacowane metodą ASA. Wyniki wyrażono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD).**

**FIG. 1.  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ion concentration changes of tested extracts evaluated by AAS. The results were expressed as the mean values  $\pm$  standard deviation (SD).**

## Results and Discussion

To assess materials ion reactivity, AAS analysis of extracts was performed. The experiment revealed that materials marked as HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp induce great ion interactions with culture medium (FIG. 1). HAp and glukan-HAp materials provoke sorption of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions from culture medium to critically low values. After 24-hour incubation, decrease of  $Ca^{2+}$  ion concentration to approximately 9 mg/L was observed ( $Ca^{2+}$  ion concentration of control medium was 46.6 mg/L). Also large decrease of  $Mg^{2+}$  ion concentration to approximately 5 mg/L compared to the control medium – 17.7 mg/L was found. C-HAp and glukan-C-HAp biomaterials cause sorption of  $Ca^{2+}$  ions from the medium. We observed decrease of  $Ca^{2+}$  ion concentration to approximately 27 mg/L compared to the control medium. Biomaterials consisting of carbonated-Mg-HAp (C-HAp) release  $Mg^{2+}$  ions to the medium causing increase of  $Mg^{2+}$  ion concentration to approximately 30 mg/L after 24-hour incubation compared to the control medium. Glukan does not change  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ion concentration of culture medium (FIG. 1). Thus, it can be concluded that highly porous HAp and C-HAp used as additives to the glukan, make the composite ion reactive. We suggest that decrease of divalent cations in the culture medium is caused by spontaneous apatite layer formation on the surface of HAp. Whereas, we assign increase of  $Mg^{2+}$  ions in the medium to process of releasing of these ions from magnesium doped carbonated hydroxyapatite (C-HAp). Material extracts obtained from ion reactivity experiment were subjected to MTT and NRU cytotoxicity assays to evaluate the effect of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ion concentration changes on cell metabolism and viability *in vitro*.

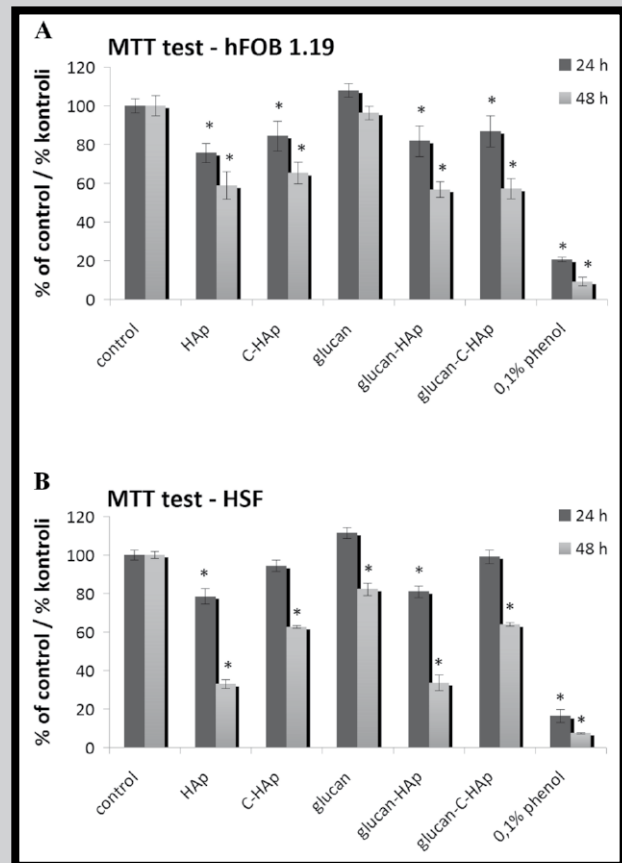
Cells such as osteoblasts or fibroblasts need to adhere to the surface of culture flask or biomaterial to maintain their biological activity and viability. It is widely known that cell-material surface interaction are mediated by integrins, which require divalent cations, mainly  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ , to be activated. Thus, it is important to realize that critically low concentration of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions may affect cell adhesion and viability [1].

In the present work, the MTT test was performed to evaluate the cytotoxic effect of biomaterial extracts on hFOB 1.19 cells and HSF cells after 24 and 48-hour exposure. The MTT assay was described to estimate cell viability and proliferation. Only viable, metabolic active cells with active mitochondrial dehydrogenases have ability to intracellular reduction of yellow tetrazolium salt to purple formazan. Chemicals that act as toxic agents, inhibit dehydrogenases activity and formazan production [11]. The MTT test revealed that materials marked as HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp reduced significantly metabolic activity of hFOB cells just after 24-hour incubation with extracts and formazan production was gradually decreased with time (FIG. 2a). After 48-hour exposure to the extracts, cell metabolic activity was significantly reduced to approximately 60-65% compared to the control cells. Glukan extract did not induce cytotoxic effect and hFOB cell metabolic activity was approximately 100% throughout the full length of the experiment. The MTT test results obtained for HSF cells also showed cytotoxic effect of HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp extracts (FIG. 2b). After 24-hour incubation, only HAp and glukan-HAp extracts decreased significantly HSF cells metabolic activity to 78.5% ( $P=0.0086$ ) and 81% ( $P=0.0342$ ) respectively compared to the control cells. However, after 48-hour exposure, formazan production was significantly reduced by all tested extracts: HAp and glukan-HAp extracts decreased HSF metabolic activity to approximately 33%, C-HAp and glukan-C-HAp to approximately 64% compared to the control cells.

Komórki takie jak osteoblasty czy fibroblasty muszą ulec adhezji do powierzchni naczynia hodowlanego lub biomateriału, aby zachować żywotność i swoją biologiczną aktywność. Powszechnie wiadomo, że w interakcjach komórka–powierzchnia materiału pośredniczą integryny, które do swojej aktywności wymagają obecności kationów dwuwartościowych, głównie  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Zatem, bardzo ważne jest, aby zdać sobie sprawę, że krytycznie niskie stężenie jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  może znacząco wpływać na adhezję i żywotność komórek [1].

W niniejszej pracy, test MTT wykonano w celu określenia cytotoksycznego wpływu ekstraktów z biomateriałów w stosunku do komórek linii hFOB i HSF po 24 i 48-godzinnej inkubacji z eluatami. Metodę MTT opracowano w celu określania żywotności komórek oraz badania ich proliferacji. Zasada testu opiera się na reakcji, która zachodzi w żywych, metabolicznie czynnych komórkach przy udziale mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej i polega na redukcji żółtej soli tetrazoliowej (MTT) do purpurowego formazanu. Związki działające toksycznie hamują aktywność dehydrogenaz, a tym samym powstawanie barwnego produktu ich reakcji [11]. Test MTT wykazał, że materiały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp redukowały istotnie statystycznie aktywność metaboliczną komórek hFOB już po 24-godzinnej inkubacji z ekstraktami, a produkcja formazanu zmniejszała się stopniowo w czasie (RYS. 2a). Po 48-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów, aktywność metaboliczna komórek była istotnie zredukowana do około 60-65% w porównaniu do kontroli. Ekstrakt z glukanu nie wywierał cytotoksycznego wpływu w stosunku do komórek hFOB, a aktywność metaboliczna utrzymywała się na poziomie około 100% przez cały czas trwania doświadczenia. Wyniki testu MTT uzyskane dla komórek HSF również wykazały cytotoksyczne działanie ekstraktów z HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp (RYS. 2b). Po 24-godzinnej inkubacji, jedynie ekstrakty z HAp i glukan-HAp obniżyły istotnie statystycznie metabolizm komórek HSF do odpowiednio 78,5% ( $P = 0,0086$ ) i 81% ( $P = 0,0342$ ) w porównaniu do kontroli. Jednak, po 48-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów, produkcja formazanu była istotnie statystycznie obniżona przez wszystkie testowane materiały: ekstrakty z HAp i glukan-HAp obniżyły aktywność metaboliczną komórek HSF do około 33%, a ekstrakty z C-HAp i glukan-C-HAp do około 64% w porównaniu do kontroli. Test MTT wykazał, że ilość formazanu produkowanego przez komórki HSF po 24-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktu z glukanu wynosiła 111,5%, a po 48 godzinach inkubacji aktywność metaboliczna komórek jedynie w niewielkim stopniu ale istotnie statystycznie obniżyła się do 82,3% ( $P = 0,0276$ ) w porównaniu do kontroli (RYS. 2b).

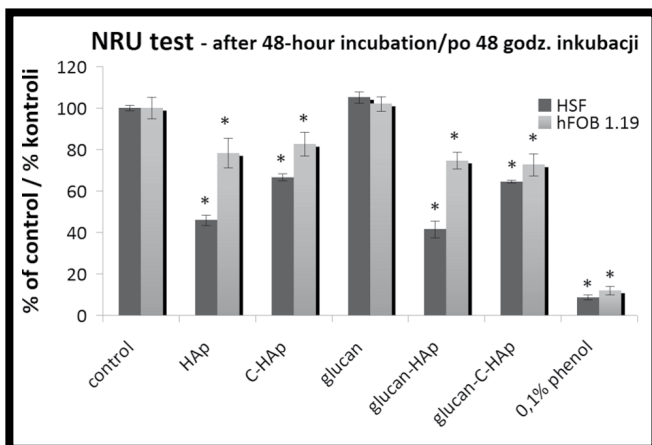
W niniejszej pracy, test NRU przeprowadzono w celu oceny żywotności komórek hFOB i HSF po 48-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów z materiałów. Badanie cytotoksyczności z wykorzystaniem barwnika – czerwieni obojętnej (NR) – opiera się na zdolności żywych komórek do jego wychwytu oraz gromadzenia go w lizosomach komórek. Wychwyt NR wzrasta w czasie inkubacji, a ilość zaabsorbowanego barwnika jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Uszkodzenie błony komórkowej lub błony lizosomu przez różne związki chemiczne powoduje obniżenie wychwytu czerwieni obojętnej przez komórki [12]. Test NRU wykazał, że biomateriały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp redukowały istotnie statystycznie żywotność komórek hFOB i HSF (RYS. 3).



**RYS. 2. Określenie cytotoksyczności testowanych ekstraktów z biomateriałów za pomocą testu MTT (A – cytotoksyczność ekstraktów w stosunku do komórek hFOB, B – cytotoksyczność ekstraktów w stosunku do komórek HSF). Wyniki wyrażono jako wartości średnie  $\pm$  SD. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i oznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek. FIG. 2. Cytotoxicity evaluation of tested biomaterials extracts by means of MTT test (A – cytotoxicity effect of extracts on hFOB cells, B – cytotoxicity effect of extracts on HSF cells). The results were expressed as the mean values  $\pm$  SD. Statistical significance was considered at a probability  $P < 0.05$  and marked by asterisks in the figure.**

The MTT test showed that the amount of formazan produced by HSF cells exposed to the glukan extract for 24 hours was 111.5% and cell metabolic activity was only slightly but statistically significant decreased with time to 82.3% ( $P = 0.0276$ ) after 48-hour exposure compared to the control (FIG. 2b).

In this study, the NRU test was performed to evaluate hFOB and HSF cell viability after 48-hour exposure to the material extracts. The NRU cytotoxicity assay allows to assess cell viability using neutral red dye (NR). Viable cells have ability to take up and incorporate NR in their lysosomes. Incorporation of NR increases with time of incubation and the amount of absorbed dye is proportional to the number of viable cells. Chemicals that damage cell membranes or lysosomes membranes will decrease the cell ability to take up neutral red dye [12]. NRU test revealed that biomaterials marked as HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp reduced significantly hFOB and HSF cell viability (FIG. 3).



Jednakże, żywotność komórek hFOB była jedynie w niewielkim stopniu, ale istotnie statystycznie zredukowana do około 75-80% w porównaniu do kontroli. Żywotność komórek HSF po ekspozycji na działanie ekstraktów z HAp i glukan-HAp była obniżona do odpowiednio 46% ( $P=0,0024$ ) i 41,6% ( $P=0,0035$ ) w porównaniu do kontroli. Ekstrakty z C-HAp i glukan-C-HAp redukowały żywotność komórek HSF do około 65% w porównaniu do kontroli. Test NRU wykazał, że ekstrakt z glukanu nie wpływał na żywotność komórek hFOB i HSF (żywotność wynosiła ponad 100% dla obu typów komórek). Bazując na uzyskanych wynikach testu NRU, można zasugerować, że biomateriały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp wykazują mniej toksyczny wpływ w stosunku do komórek hFOB niż w stosunku do komórek HSF (RYS. 3).

Wykonane przez nas testy na oznaczenie cytotoxyczności *in vitro* jednoznacznie wskazują, że ekstrakty z biomateriałów HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp zachowują się jak związki toksyczne i powodują znaczącą redukcję aktywności metabolicznej i żywotności komórek. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi w eksperymencie na określenie reaktywności jonowej, które wykazują, że wspomniane biomateriały powodują duże zmiany w stężeniu jonów w podłożu hodowlanym.

Nasze obserwacje są zgodne z wynikami prezentowanymi przez innych autorów. Malafaya i Reis wykazali, że biomateriał na bazie chitosanu wyprodukowany z niespieczonego hydroksyapatytu powoduje sorpcję kationów dwuwartościowych do krytycznie niskich wartości, co istotnie wpływa na żywotność komórek *in vitro* [1]. Nasz poprzedni raport również udowodnił, że różnorodne biomateriały wykazują różne interakcje jonowe z podłożem hodowlanym i powodują duże zmiany w stężeniu jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , co hamuje metabolizm hodowanych komórek. Jednak, ważne jest, aby zdać sobie sprawę, że stały przepływ płynów fizjologicznych *in vivo* może powodować, że sorpcja jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  stanie się zjawiskiem korzystnym, przyspieszającym proces mineralizacji tkanki kostnej po implantacji [2].

## Wnioski

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników z analizy ASA można wysnuć wniosek, że dodatek granul HAp o wysokiej porowatości do glukanu, powoduje, że kompozyt jest reaktywny jonowo. Wyniki testów na oznaczenie cytotoxyczności sugerują, że duże zmiany stężenia kluczowych jonów w podłożu hodowlanym mogą hamować metabolizm i wpływać na żywotność hodowanych komórek.

**RYS. 3. Określenie żywotności komórek hFOB i HSF po zadziałaniu ekstraktami z biomateriałów za pomocą testu NRU. Wyniki wyrażono jako wartości średnie  $\pm$  SD. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i oznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek.**

**FIG. 3. Viability evaluation of hFOB and HSF cells after exposure to biomaterials extracts by means of NRU test. The results were expressed as the mean values  $\pm$  SD. Statistical significance was considered at a probability  $P < 0.05$  and marked by asterisks in the figure.**

However, hFOB cell viability was only slightly but statistically significant reduced to approximately 75-80% compared to the control cells. Viability of HSF cells after exposure to HAp and glukan-HAp extracts was decreased to 46% ( $P=0.0024$ ) and 41.6% ( $P=0.0035$ ) respectively compared to the control. C-HAp and glukan-C-HAp extracts reduced HSF viability to approximately 65% compared to the control cells. NRU assay showed that glukan extract did not affect hFOB and HSF cell viability (viability was over 100% for both type of cells). Basing on the obtained NRU assay results, it can be suggested that biomaterials marked as HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp exert less cytotoxic effect on hFOB cells than on HSF cells (FIG. 3).

Our *in vitro* cytotoxicity tests clearly indicate that HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp extracts act as cytotoxic agents and cause significant reduction of cell metabolic activity and cell viability. It is in agreement with the ion interaction experiment results, which showed that these biomaterials cause large ion concentration changes of culture medium.

Our observations are in agreement with the results presented by other authors. Malafaya and Reis revealed that chitosan-based scaffold produced with unsintered hydroxyapatite provokes sorption of divalent cations to critically low values, what significantly affects cell viability *in vitro* [1]. Our previous report also proved that various biomaterials reveals different ion interaction with culture medium and cause great changes in  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ion concentration, what inhibits the metabolism of cultured cells. However, it is important to realize that constant flow of physiological fluids *in vivo* can make sorption of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions beneficial phenomena that enhance mineralization process of bone tissue after implantation [2].

## Conclusion

In summary, basing on the AAS analysis results, it can be concluded that addition of highly porous HAp to the glukan, make the composite ionic reactive. Cytotoxicity test results reveal that large changes in the crucial ion concentration of the medium may inhibit metabolism of cultured cells and affect their viability.



## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu UDA-POIG. 01.03.01-00-005/09-02. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w projekcie realizowanym zgodnie z umową nr POPW.01.03.00-06-010/09-00 w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi Priorytetowej I, Nowoczesna Gospodarka, Działanie 1.3. Wsparcie Innowacji.

## Acknowledgements

This work was supported by financial support from UDA-POIG.01.03.01-00-005/09-02 project. The paper was developed using the equipment purchased within the agreement No. POPW.01.03.00-06-010/09-00 Operational Program Development of Eastern Poland 2007-2013, Priority Axis I, Modern Economy, Operations 1.3. Innovations Promotion.

## Piśmiennictwo

- [1] Malafaya B.P., Reis L.R.: Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 644-660.
- [2] Przekora A., Kołodyńska D., Jedel R., Ginalska G., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z.: The influence of hydroxyapatite granules on osteoblast culture in vitro. *Ceramic Materials* 63(4) (2011) 765-768.
- [3] Gustavsson J., Ginebra P.M., Engel E., Planell J.: Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 4242-4252.
- [4] Sopyan Y.I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A.: Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 8 (2007) 116-123.
- [5] Aronov D., Karlov A., Rosenman G.: Hydroxyapatite nanoceramics: Basic physical properties and biointerface modification. *Journal of the European Ceramic Society* 27 (2007) 4181-4186.
- [6] Belcarz A., Ginalska G., Zalewska J., Rzeski W., Ślósarczyk A., Kowalczyk D., Godlewski P., Niedźwiadek J.: Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes gentamicin release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 89 (2009) 102-113.

## References

- [7] Belcarz A., Ginalska G., Polkowska I., Przekora A., Ślósarczyk A., Zima A., Paszkiewicz Z.: Pilot clinical study of efficacy of flexible HAp-based composite for bone defects replacement. *Engineering of Biomaterials* 99-101 (2010) 16-18.
- [8] Tsiptsias C., Panayiotou C.: Preparation of cellulose-nano-hydroxyapatite composite scaffolds from ionic liquid solutions. *Carbohydrate Polymers* 74 (2008) 99-105.
- [9] Belcarz A., Ginalska G., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z.: Bioactive composite and process for the production of the same. 2009; Polish Patent PL-387872.
- [10] Barbarić M., Kraljević S., Grce M., Zorc B.: Novel 1,2,5-oxadiazine derivatives – Synthesis and in vitro biological studies. *Acta Pharmaceutica* 53 (2003) 175-186.
- [11] Putnam P.K., Bombick W.D., Doolittle J.D.: Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro* 16 (2002) 599-607.



STUDIA PODYPLOMOWE

**Biomateriały – Materiały dla Medycyny**

**2012/2013**

<b>Organizator:</b> Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	<b>Adres:</b> 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 108 tel. 12 617 44 48; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
<b>Kierownik:</b> Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH	<a href="http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny.html">http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny.html</a>
<b>Charakterystyka:</b> 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: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ). 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.	
<b>Sylwetka absolwenta:</b> 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.	
<b>Zasady naboru:</b> Termin zgłoszeń: od 20.09.2012 do 20.10.2012 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 108 Osoby przyjmujące zgłoszenia: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Mgr inż. Małgorzata Krok (tel. 12 617 47 44, e-mail: krok@agh.edu.pl)	
<b>Czas trwania:</b> 2 semestry (od XI 2012 r. do VI 2013 r.)	<b>Opłaty:</b> 2 600 zł
<b>Informacje dodatkowe:</b> Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.	