

# BIODEGRADOWALNE POLIMERY Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU – BADANIA NA LUDZKICH CHONDROCYTACH W UKŁADZIE IN VITRO

RAFAL KŁOSEK<sup>1\*</sup>, JAKUB KOMACKI<sup>1</sup>, KATARZYNA JELONEK<sup>2</sup>,  
ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>,  
JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY I  
ODDZIAŁ MEDYCYN LABORATORYJNEJ,  
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATOWICE

<sup>2</sup> CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN,  
ZABRZE

\* E-MAIL: RAFALKLOSEK@GMAIL.COM

## Streszczenie

W niniejszej pracy analizowano wpływ substancji wymywalnych, otrzymanych w drodze ekstrakcji z bioresorbowalnych terpolimerów zsyntetyzowanych przy użyciu  $Zr(Acac)_4$  i przetwarzanych metodą prasowania, na wzrost chondrocytów ludzkich w warunkach *in vitro*. Matryce wykonane z poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-węglanu trimetylenu) 75:14:11 oraz poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-ε-kaprolaktonu) 55:29:16 charakteryzowano za pomocą spektroskopii NMR, GPC oraz DSC. Ekstrakcję przeprowadzono w medium hodowlanym z matryc polimerowych przed degradacją oraz po 30, 60 i 90 dniach degradacji. Nie stwierdzono zahamowania wzrostu chondrocytów inkubowanych w obecności ekstraktów uzyskanych z matryc P(L-LA-GA-TMC) 75:14:11 w porównaniu z kontrolą (medium hodowlane) oraz UHMWP, niezależnie od zastosowanego rozcieńczenia i stopnia zdegradowania matryc. Zaobserwowano natomiast zahamowanie wzrostu chondrocytów inkubowanych w obecności rozcieńczonych pożywką ekstraktów (1:4), otrzymanych z matryc P(L-LA-GA-CL) 55:29:16, poddanych 60- i 90-dniowej degradacji.

**Słowa kluczowe:** polimery z pamięcią kształtu, bioresorbowalne terpolimery, biokompatybilność, chondrocyty, degradacja hydrolytyczna  
[Inżynieria Biomateriałów, 96-98, (2010), 121-125]

## Wprowadzenie

Biodegradowalne materiały terpolimerowe z pamięcią kształtu, otrzymane z L-laktydu, glikolidu, węglanu trimetylenu (TMC) czy ε-kaprolaktonu są w ostatnich latach intensywnie badane pod kątem ich zastosowań biomedycznych.

Efekt pamięci kształtu polega na zdolności materiału do przejścia (powrotu) z kształtu tymczasowego, uzyskanego w wyniku deformacji, do kształtu podstawowego (pierwotnego) w wyniku działania odpowiedniego bodźca – np. temperatury, światła, promieniowania, pola magnetycznego czy też bodźców chemicznych takich jak zmiana pH, siły jonowej etc. [1]. Wykorzystanie biodegradowalnych materiałów polimerowych charakteryzujących się pamięcią kształtu do celów medycznych ma ogromny potencjał, ze względu na możliwość zastosowania ich w formie implantów w chirurgii małoinwazyjnej (np. jako stenty, nici, klamry), nośników leków czy też w technikach usuwania skrzepów z naczyń krwionośnych [2]. Niewątpliwą zaletą jest możliwość wprowadzenia stentu w formie zmniejszonej (kształcie tymczasowym),

# BIODEGRADABLE SHAPE MEMORY POLYMERS – IN VITRO STUDIES ON HUMAN CHONDROCYTES

RAFAL KŁOSEK<sup>1\*</sup>, JAKUB KOMACKI<sup>1</sup>, KATARZYNA JELONEK<sup>2</sup>,  
ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>,  
JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
SCHOOL OF PHARMACY AND DIVISION OF LABORATORY MEDICINE,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>2</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS PAS, ZABRZE

\* E-MAIL: RAFALKLOSEK@GMAIL.COM

## Abstract

The influence of substances extracted from bioresorbable terpolymers, synthesized with  $Zr(Acac)_4$  as initiator and processed by compression, on human chondrocytes growth *in vitro*, was analyzed in this study. The matrices obtained from poly (L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene-carbonate) 75:14:11 and poly (L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) 55:29:16 were characterized by means of NMR spectroscopy, GPC and DSC. Extracts were prepared of polymeric matrices before and after 30, 60 and 90 days of degradation in chondrocytes growth medium. The obtained results did not show growth inhibition of chondrocytes incubated with extracts of P(LA-GA-TMC) 75:14:11, compared to growth medium (control) and UHMWP (negative control), regardless the used dilution and degree of matrices' degradation. Growth inhibition was observed in the case of chondrocytes incubated with extracts of P(LA-GA-CL) 55:29:16 matrices after 60 and 90 days of degradation diluted with medium to 1:4.

**Keywords:** shape memory polymers, bioresorbable terpolymers, biocompatibility, chondrocytes, hydrolytic degradation

[Engineering of Biomaterials, 96-98, (2010), 121-125]

## Introduction

Biomedical application of biodegradable shape memory terpolymers obtained from L-lactide, glycolide, trimethylene carbonate (TMC) and ε-caprolactone have been intensively investigated in recent years.

The shape memory effect is an ability of material to recover permanent (primary) shape from obtained by deformation temporary form, as a result of stimulation by different factors - such as temperature, light, radiation, magnetic field or chemical stimuli e.g. changes of pH or ionic strength, etc. [1]. Biodegradable polymeric materials with shape memory-effect have great potential for biomedical applications, because of the possibility of using them as implants in minimally invasive surgery (stents, sutures, or clamps), drug delivery systems or techniques used in removing of the clots from blood vessels [2]. The main advantage is the possibility of incorporation of stent in reduced size (temporary shape), which recovers the original, permanent shape and after implantation, under the influence of external stimuli such as temperature. The most desirable is the ability to recover the permanent shape in human body temperature, because it eliminates the necessity of using high temperatures, which may adversely affect tissues surrounding the stent [1,3,4].

który po implantacji, pod wpływem bodźców zewnętrznych, np. temperatury, odzyskuje pierwotną, docelową formę (kształt podstawowy). Najbardziej pożądana jest zdolność odzyskiwania kształtu w temperaturze ludzkiego organizmu, gdyż konieczność zastosowania wyższych temperatur może negatywnie wpływać na otaczające stent tkanki [1,3,4].

Podstawową cechą, jaką muszą spełniać wszystkie materiały mające zastosowanie biomedyczne jest biokompatybilność, czyli całkowita zgodność materiału z ludzkim organizmem, oznaczająca brak wywoływania reakcji toksycznych, cytotoksycznych, alergicznych czy kancerogennych. Pierwszym badaniem oceniającym biogodność danego materiału jest określenie jego cytotoxyczności [5].

Na cytotoxyczność materiałów polimerowych ma wpływ wiele czynników, tj. masa cząsteczkowa polimeru, szybkość jego degradacji, masa, struktura implantu i jego kształt (np. obecność ostrych krawędzi) [5,6]. Istotne są także substancje uwalniane podczas degradacji (inicjator, śladowe ilości zanieczyszczeń niskocząsteczkowych czy rozpuszczalnika) [7,8]. Końcowymi produktami degradacji hydrolytycznej poli(L-laktydo-ko-glikolido-ε-kaprolaktonu) jest kwas L-mlekowy, glikolowy oraz 6-hydroksyheksanowy [9,10]. Szybki przebieg procesu degradacji i uwolnienie dużych ilości produktów kwasowych prowadzić może do znacznego obniżenia pH w miejscu implantacji i indukcji stanu zapalnego [7]. Niewątpliwą zaletą jest zatem zastosowanie polimerów otrzymanych z udziałem węglanu trimetyleny (TMC), których głównym produktem degradacji jest 1,3-propandiol [11].

Opracowywane nowe metody syntezy biodegradowalnych alifatycznych poliestrów i poliestrowęglianów uwzględniają zastosowanie nietoksycznych inicjatorów reakcji polimerizacji. Aktualnie powszechnie wykorzystywany do syntezy polimerowych materiałów medycznych jest oktanian cyny (II) ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) [7]. Ze względu jednak na jego toksyczność bada się możliwość zastosowania związków wapnia, żelaza lub cyrkonu [12]. Badania wykazują, iż polimery zsyntetyzowane przy udziale acetyloacetonianem cyrkonu  $\text{Zr}(\text{Acac})_4$ , wpływają korzystnie na żywotność i aktywność komórek, w porównaniu do polimerów zawierających resztkowe ilości cyny [7].

Celem pracy była ocena in vitro cytotoxyczności produktów degradacji ekstrahowanych z poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-węglanu trimetyleny) 75:14:11 oraz poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-ε-kaprolaktonu) 55:29:16 względem ludzkich chondrocytów.

## Materiały i metody

W badaniu zastosowano dwa rodzaje terpolimerów: poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-węglanu trimetyleny) (P(L-LA-GA-TMC)) 75:14:11 oraz poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-ε-kaprolaktonu) (P(L-LA-GA-CL)) 55:29:16, które zostały zsyntetyzowane w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze. W reakcji terpolimerizacji jako inicjatora użyto nietoksycznego acetyloacetonianu cyrkonu  $\text{Zr}(\text{Acac})_4$ . Syntezę polimeru prowadzono w masie, w temperaturze 120°C przez 72 h.

Liczbowo średnią masę cząsteczkową ( $M_n$ ) i rozrzut mas cząsteczkowych (D) analizowano metodą chromatografii żelowej (Viscotek RImax; kolumny Viscotek 3580), stosując chloroform jako eluent z szybkością przepływu 1 mL/min w oparciu o standardy polistyrenowe. Udział komonomerów wyznaczano metodą spektroskopii 1-H NMR o wysokiej rozdzielczości (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600 MHz) z zastosowaniem  $\text{CDCl}_3$  jako rozpuszczalnika. Właściwości termiczne oceniano za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) (TA DSC 2010; TA Instruments, New Castle, DE).

All applicable biomedical materials must characterize biocompatibility, which means that they can not cause toxic, cytotoxic, allergenic, or carcinogenic reactions. The first study evaluating the biocompatibility of the material is determination of its cytotoxicity [5].

Cytotoxicity of polymer materials depends on many factors: molecular mass of polymer, degradation rate and mass of the final product, its structure and shape (e.g. presence of sharp edges) [5,6]. Essential are substances released during degradation process (initiator, trace amount of low-molecular weight impurities or solvent) [7,8]. The final product of poly(L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) degradation is L-lactic acid, glycolic acid and 6-hydroxyhexanoic acid [9, 10]. The fast degradation rate and releasing of high amount of acidic products may cause significant pH reduction at the site of implantation and induce inflammatory response [7]. The main advantage of using polymers obtained from trimethylene carbonate (TMC) (homo- and copolymers) is degradation to 1,3-propanediol [11].

The new methods of synthesis of aliphatic polyesters and polyester carbonates aim to use nontoxic initiators of polymerization reaction. Currently, stannous octoate ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) is commonly used in synthesis of polymeric materials for biomedical applications [7]. However, it's high toxicity causes development of polymerization methods using calcium, iron or zirconium as the initiator [12]. It was determined, that polymers obtained with the use of  $\text{Zr}(\text{Acac})_4$  have positive effect on cells viability and activity compared to polymers containing trace amount of tin compounds [7].

The aim of this study was to assess the in vitro cytotoxicity of the degradation products extracted from poly(L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene-carbonate) and poly(L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) on human chondrocytes.

## Materials and methods

Two terpolymers, synthesized at the Centre of Polymer and Carbon Materials of Polish Academy of Sciences in Zabrze were used in this study: poly(L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene carbonate) (P(L-LA-GA-TMC)) 75:14:11 and poly(L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) (P(L-LA-GA-CL)) 55:29:16. Terpolymerization reaction was conducted in bulk at 120°C for 72h, with the use of non-toxic zirconium acetylacetonate  $\text{Zr}(\text{Acac})_4$  as initiator.

Number average molecular weight ( $M_n$ ) and molecular weight dispersity (D) were analyzed by means of gel permeation chromatography (Viscotek RImax; Viscotek 3580 columns), with chloroform as eluent and 1 mL/min flow rate, based on polystyrene standards. Terpolymers composition was investigated with the use of 1-H NMR high resolution spectroscopy (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600 MHz) with  $\text{CDCl}_3$  as solvent. Thermal properties were examined by differential scanning calorimetry (DSC) (TA DSC 2010; TA Instruments, New Castle, DE).

Compression method with the use of hydraulic press was used to obtain polymeric matrices. The steel frame of 40,2cm<sup>2</sup> dimension was filled with appropriate amount of polymer, which was compressed in elastic state (above  $T_g$ ) between heated stainless steel blocks with pressure of 2,3 tons for 1 minute in the case of P(L-LA-GA-CL) and 4 minutes in the case of P(L-LA-GA-TMC). Then the polymer film was cut in order to prepare 1 cm diameter matrices, which were sterilized with high-energy electron beam radiation in dose of 25 kGy.

Extracts were prepared of polymeric matrices by adding chondrocytes growth medium (Clonetics CGM Single Quots, Lonza) for 3 days at 37°C (in compliance with the ISO 1993-13 standard). The volume of incubation medium was calculated from the following equation:

Matryce polimerowe wykonano poprzez prasowanie materiału polimerowego w stanie elastycznym (powyżej  $T_g$ ) za pomocą prasy hydraulicznej. Odpowiednią ilość terpolimeru umieszczano w stalowej formie (ramce o powierzchni 40,2 cm<sup>2</sup>), między termostatowanymi blokami wykonanymi ze stali nierdzewnej i prasowano z siłą nacisku 2,3 tony w czasie 1 minuty (P(L-LA-GA-CL)) lub 4 minut w przypadku P(L-LA-GA-TMC). Otrzymano w ten sposób film polimerowy o grubości 1 mm, z którego wycięto matryce o średnicy 1 cm. Zostały one następnie poddane sterylizacji wysokoenergetyczną wiązką elektronów w dawce 25 kGy.

Ekstrakcję substancji wymywalnych z matryc polimerowych przeprowadzono w medium hodowlanym (Clonetics CGM Single Quots, Lonza) w czasie 3 dni w temperaturze 37°C (zgodnie z wytycznymi normy ISO 10993-5). Objętość płynu ekstrakcyjnego obliczono wg. wzoru:

#### Objętość medium = 25 x masa matrycy (g)

Część matryc poddano procesowi ekstrakcji bezpośrednio po ich wytworzeniu i sterylizacji. Pozostałe poddano wstępnej degradacji, którą prowadzono w wodzie dejonizowanej, w temperaturze 37°C (degradacja w czasie rzeczywistym) przez 30, 60 i 90 dni. Wstępnie zdegradowane matryce przenoszono do pożywki i poddawano ekstrakcji w sposób opisany powyżej.

Kontrolę negatywną stanowiły matryce wykonane z polietylenu o wysokiej masie cząsteczkowej (UHMWP – ultra-high molecular weight polyethylene), degradowane i poddawane ekstrakcji w sposób analogiczny do badanych próbek.

Test cytotoksyczności przeprowadzono na chondrocytach pochodzących z chrząstki stawu kolanowego 50 letniego mężczyzny, rasy kaukaskiej (Lonza, nr kat. CC-2550, 11.11.2005 - krioprezerwacja). Hodowlę chondrocytów prowadzono na płytkach 96-dółkowych w warunkach standardowych (w temperaturze 37°C, atmosferze z 5% zawartością CO<sub>2</sub> i 90% wilgotnością). 24 h po założeniu hodowli ze studzienek płytki testowej usunięto medium, dodano ekstrakty rozcieńczone pożywką CGM w stosunku 1:4 oraz 1:10 i prowadzono inkubację przez kolejne 3 dni.

Szybkość wzrostu komórek oceniano za pomocą testu „In Vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B Based” (Sigma-Aldrich, nr kat. TOX-6) zgodnie z dołączonym protokołem – komórki utrwalono przy pomocy 10% TCA (kwas trójchlorooctowy) i wybarwiono sulforodaminą-B, która wiąże się z białkami zawartymi w komórce. Następnie niezwiązany barwnik wypukano (1% kwasem octowym), a inkorporowany barwnik uwolniono roztworem Tris (o zasadowym odczynie pH). Ostatnim etapem testu był pomiar spektrofotometryczny absorbancji przy długości fali 570 nm oraz 690nm (długość referencyjna).

Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem programu komputerowego Statistica 8. Analizy jednorodności wariancji dokonano testem Levena i Browna-Forsythe'a. Wyniki analizowano wykorzystując analizę wariancji (ANOVA) oraz test RIR Tukeya. Za poziom istotności statystycznej przyjęto  $p < 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

W pracy analizowano wpływ substancji wymywalnych, otrzymanych w drodze ekstrakcji z bioresorbowalnych terpolimerów zsyntetyzowanych przy użyciu Zr(Acac)<sub>4</sub> i przetwarzanych metodą prasowania, na wzrost chondrocytów ludzkich w warunkach in vitro. Przed rozpoczęciem procesu ekstrakcji część matryc poddano wstępnej degradacji w wodzie. Do otrzymania matryc zastosowano poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-węglan trimetylenu) 75:14:11 oraz poli(L-laktydo-ko-glikolido-ko-ε-kaprolakton) 55:29:16, których charakterystykę przedstawiono w TABELI 1.

#### Medium volume = 25 x matrix mass (g)

Some extracts were obtained of non-degraded matrices (after processing and sterilization). The rest of them were degraded in deionized water at temperature of 37°C (real time degradation) for 30, 60 and 90 days. After predetermined time of degradation, matrices were removed from water and placed in vials with culture medium in order to prepare extracts according to protocol described above.

Ultra high molecular weight polyethylene (UHMWP) was used as negative control. Degradation and extracts of UHMWP was prepared in the same way as the other samples.

Cytotoxicity test was performed on normal human chondrocytes-knee (Lonza, cat. n. CC-2550, 11.11.2005 – cryopreserved). The cells were cultured in 96 well plates, under standard conditions (at 37°C, in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> / 95% air). After 24 hours of incubation, CGM medium was removed from wells, and extracts diluted with CGM were added. The cells were incubated with extracts for 3 days.

Cells proliferation was quantified with the use of In Vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B Based (Sigma-Aldrich, Poland) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were fixed with TCA (trichloroacetic acid) and then stained with sulforhodamine-B, which is a dye staining cellular proteins. The unbound dye was removed with 1% acetic acid, and incorporated dye liberated from cells with Tris solution. Absorbance was measured at  $\lambda=570$  nm and  $\lambda=690$  nm (reference wavelength).

Statistical analysis was performed using Statistica 8, with quantity tests: normality tests, Leven's and Brown-Forsythe's variance tests, variance analysis (ANOVA) and RIR Tukey's test ( $p < 0,05$ ).

## Results and discussions

The influence of substances extracted from bioresorbable terpolymers, synthesized with Zr(Acac)<sub>4</sub> as initiator and processed by compression, on human chondrocytes growth in vitro, was analyzed in this work. Some of the matrices were degraded in water for 30, 60 or 90 days before extraction. Characterization of poly(L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene carbonate) 75:14:11 and poly(L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) 55:29:16 used to obtain matrices is presented in TABLE 1.

P(LA-GA-CL) had lower number average molecular weight ( $M_n$ ) compared with P(LA-GA-TMC) and higher molecular-weight dispersity (D). Melting points were identified in thermograms of both polymers, however relatively low melting enthalpy signifies low content of crystalline phase.

Proliferation of chondrocytes incubated with extracts of the matrices, extracts of UHMWP (negative control) and in growth medium (control) is shown in FIG. 1.

The obtained results did not show growth inhibition of chondrocytes incubated with extracts of P(LA-GA-TMC) 75:14:11, compared with control (growth medium) and UHMWP, regardless used dilution and degree of matrices' degradation. It signifies biocompatibility of P(LA-GA-TMC) before degradation and after 30, 60 and 90 days of degradation. However, matrices after 90 days of degradation characterized very low mass loss (7,4%), but very significant decrease of molecular weight ( $M_n=2600$  Da), so further studies are necessary to confirm lack of cytotoxicity on later stages of degradation, after disintegration of polymer matrix.

Growth inhibition was observed in case of chondrocytes incubated with extracts of P(LA-GA-CL) 55:29:16 matrices after 60 and 90 days of degradation diluted with culture

P(LA-GA-CL) charakteryzował się znacznie niższą liczbowo średnią masą cząsteczkową ( $M_n$ ) w porównaniu z P(LA-GA-TMC) oraz większą polidispersją (D). Chociaż na termogramach obu polimerów stwierdzono punkty topnienia, jednak dość niskie wartości entalpii topnienia świadczą o małym udziale frakcji krystalicznych.

Szybkość wzrostu chondrocytów w hodowli kontrolnej oraz inkubowanych w obecności ekstraktów przedstawia RYS. 1.

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono istotnego zahamowania wzrostu chondrocytów inkubowanych w obecności ekstraktów uzyskanych z matryc P(LA-GA-TMC) 75:14:11 w porównaniu z kontrolą (medium hodowlane) oraz UHMWP, niezależnie od zastosowanego rozcieńczenia i stopnia zdegradowania matryc. Świadczy to o biogodności matryc P(LA-GA-TMC) 75:14:11 niedegradowanych oraz poddanych 30-, 60- i 90- dniowej degradacji. Jednakże, mając na uwadze fakt, iż matryce po 90 dniach degradacji charakteryzował niewielki ubytek masy (7,4%), ale silny spadek masy cząsteczkowej ( $M_n=2\ 600$  Da), konieczne są dalsze badania, potwierdzające brak cytotoxyczności na późniejszym etapie degradacji, po dezintegracji matrycy polimerowej.

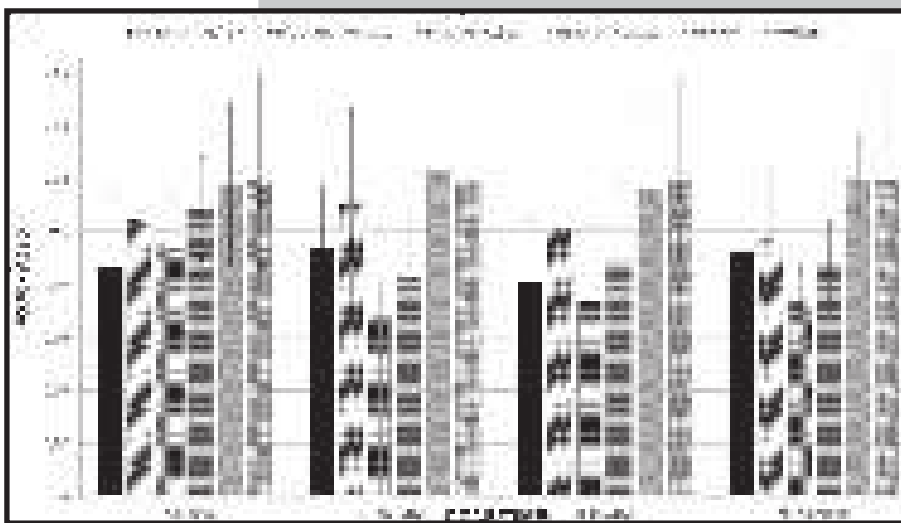
Zaobserwowano zahamowanie wzrostu chondrocytów inkubowanych w obecności rozcieńczonych porządką ekstraktów (1:4), otrzymanych z matryc P(LA-GA-CL) 55:29:16, poddanych 60- i 90-dniowej degradacji. Nie wykazano natomiast różnicy w wzroście komórek inkubowanych z ekstraktem otrzymanym z matrycy poddanych 30-dniowej degradacji. W związku z szybkim przebiegiem degradacji hydrolytycznej P(LA-GA-CL) 55:29:16 i niewielką ilością materiału, jaki pozostał po degradacji, niemożliwe było wyznaczenie zmian ubytku masy i  $M_n$ . Jak jednak wspomniano, materiał ten charakteryzował się już przed degradacją dość niską masą cząsteczkową i wysoką polidispersją ( $D=4,9$ ), która świadczy o obecności łańcuchów polimerowych o niskiej masie cząsteczkowej. Według danych z piśmiennictwa naukowego [7] produkty degradacji o niskiej masie cząsteczkowej odpowiadają mogą za cytotoxyczność polimerów. Badania wykazały korelację pomiędzy spadkiem  $M_w$  polimerów do ok 10000 – 500 Da a indukcją stanu zapalnego. Nie ulega wątpliwości, iż stan zapalny negatywnie oddziałuje na otaczające implant tkanki [7]. Drugim czynnikiem, odpowiedzialnym za oddziaływanie cytotoxyczne jest spadek pH wywołany przez uwolnienie kwasowych produktów degradacji. Wg Cordewener i wsp. istnieje wyraźna zależność między spadkiem odczynu pH a inhibicją wzrostu komórek (CGI - ang. cell growth inhibition). Wyższa początkowa masa cząsteczkowa P(LA-GA-TMC) 75:14:11 oraz obecność jednostek węglanowych degradujących do 1,3-propandiolu pozwala zatem na eliminację ryzyka związanego z uwolnieniem dużych ilości produktów degradacji i znacznego obniżenia pH

Czynnikiem, który może wpływać na zmianę właściwości materiałów i w konsekwencji ich biogodność jest także metoda przetwarzania. W niniejszej pracy matryce terpolimerowe uzyskano w procesie prasowania materiału.

**TABELA 1. Charakterystyka matryc P(LA-GA-TMC) i P(LA-GA-CL) przed degradacją (FT FCap, FLL, FGG – zawartość procentowa odpowiednio: jednostek węglanowych, kaproilowych, laktydylowych i glikolidylowych;  $M_n$ –liczbowa średnia masa cząsteczkowa, D–rozrzut mas cząsteczkowych ( $M_w/M_n$ ),  $T_g$ –temperatura zeszczenia,  $T_m$ –temperatura topnienia,  $\Delta H_m$ –entalpia topnienia.**

**TABLE 1. Characterization of P(LA-GA-TMC) and P(LA-GA-CL) (FT FCap, FLL, FGG - the percentage content of carbonate, caproyl, lactidyl and glycolidyl units, respectively;  $M_n$ –number average molecular weight, D–molecular-weight dispersity  $M_w/M_n$ ),  $T_g$ –glass transition temperature,  $T_m$ –melting temperature,  $\Delta H_m$ –melting enthalpy).**

	F <sub>T</sub>	F <sub>CAp</sub>	F <sub>LL</sub>	F <sub>GG</sub>	$M_n$ [Da]	D	$T_g$ [°C]	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J/G]
P(LA-GA-TMC)	11		75	14	39400	2,2	52	120	8
P(LA-GA-CL)		35	50	15	12300	4,9	29	92	12



**RYS. 1. Wpływ ekstraktów na wzrost ludzkich chondrocytów. Wykres przedstawia wartości średnie poziomu absorpcji ( $\pm SD$ ),  $n=9$ ,  $p<0,05$ . Grupą kontrolną były chondrocyty inkubowane w ekstraktach matryc polietylenowych (kontrola negatywna) oraz hodowane w czystym medium wzrostowym.**

**FIG. 1. Influence of extracts on human chondrocyte growth. Bars show the average value of absorbance levels ( $\pm SD$ ),  $n=9$ ,  $p<0,05$ . Control groups were chondrocytes incubated in extracts from polyethylene (negative control) and in growth medium.**

medium to 1:4. There were no significant changes in proliferation of chondrocytes incubated with extract of matrix after 30 days of degradation. It was impossible to determine the mass loss and decrease of  $M_n$  of P(LA-GA-CL) 55:29:16, because of low amount of remaining material due to fast hydrolytic degradation. However, as was mentioned above, this material before degradation had relatively low molecular weight and high polidispersy ( $D=4,9$ ), which indicated the presence of low molecular weight polymer chains. According to the literature data [7], low molecular weight degradation products can cause cytotoxicity. Correlation between decrease of  $M_n$  to 10000 – 500 Da and induction of inflammation was shown. Undoubtedly, inflammation has negative effect on tissues surrounding implant [7]. pH decrease, caused by released acidic degradation products is a second factor, responsible for cytotoxic effect. According to Cordewener et al. there is a strict correlation between pH decrease and cell growth inhibition (CGI).

Badania Chłopka i wsp. [13] poli(L-laktydo-ko-DL-laktydu) 70:30), wskazują, iż prasowanie polimerów zmienia ich zachowanie w środowisku biologicznie czynnym. Zaobserwowano, iż polimery poddane procesowi prasowania charakteryzowały się szybszą degradacją oraz większą zmianą odczynu pH i przewodnictwa płynu inkubacyjnego. Możliwe zatem, że przetwarzanie metodą prasowania P(L-LA-GA-CL) 55:29:16 miało wpływ na właściwości matryc, przyspieszenie ich degradacji oraz wywołanie efektu cytotoksycznego.

Należy pamiętać, że nawet całkowity brak cytotoxiczności materiału polimerowego nie jest wystarczający, aby stwierdzić, że dany materiał jest w pełni biogodny – konieczne są dalsze badania [5]. Z pewnością jednak, na podstawie dotychczasowych analiz, obiecującym materiałem jest P(L-LA-GA-TMC) 75:14:11. Dalsze badania w przypadku P(L-LA-GA-CL) 55:29:16 powinny zmierzać do poprawy jego właściwości fizykochemicznych i obniżenia tempa degradacji (synteza materiału o wyższej masie cząsteczkowej, wyższym Tg lub wybór innej metody przetwórstwa).

## Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono zahamowania wzrostu chondrocytów inkubowanych w obecności ekstraktów uzyskanych z matryc P(L-LA-GA-TMC) 75:14:11 w porównaniu z kontrolą (medium hodowlane) oraz UHMWP, niezależnie od zastosowanego rozcieńczenia i stopnia zdegradowania matryc. Zaobserwowano natomiast zahamowanie wzrostu chondrocytów inkubowanych w obecności rozcieńczonych pożywką ekstraktów (1:4), otrzymanych z matryc P(L-LA-GA-CL) 55:29:16, poddanych 60- i 90-dniowej degradacji.

## Podziękowania

*Praca finansowana w ramach projektu MEMSTENT (Grant Nr: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-03).*

Higher molecular weight of P(L-LA-GA-TMC) 75:14:11 before degradation and the presence of carbonate units, which degrade to 1,3-propanediol enable to eliminate the risk of releasing large amount of acidic degradation products and significant pH decrease.

Processing method is also a factor that may affect the properties of materials and their biocompatibility. Compressing method was used to obtain polymeric matrices in this study. The results of the studies on poly (L-lactide-co-DL-lactide) 70:30) conducted by Chłopek et al [13] indicated that compression of polymers changed their behavior in a biologically active environment. It was observed that the polymers processed by compressing method characterized faster degradation, more significant changes of pH and conductivity of incubating solution. Therefore, the used processing method of P(L-LA-GA-CL) 55:29:16 may be a factor that affected the properties of matrices and led to acceleration of degradation process and induction of cytotoxic effect.

It should be mentioned that polymer that does not show cytotoxic effect can not be considered as completely biocompatible, because further studies are needed [5]. However, the obtained results revealed a great potential of P(L-LA-GA-TMC) 75:14:11. Further studies in the case of P(L-LA-GA-CL) 55:29:16 are needed to improve its physicochemical properties and reduce the degradation rate (synthesis of material with higher molecular weight, higher Tg, or modification of processing method).

## Conclusions

The obtained results did not show any growth inhibition of chondrocytes incubated with extracts of P(LA-GA-TMC) 75:14:11, compared to growth medium (control) and UHMWP (negative control), regardless the used dilution and degree of matrices' degradation. Growth inhibition was observed in case of chondrocytes incubated with extracts of P(LA-GA-CL) 55:29:16 matrices after 60 and 90 days of degradation diluted with medium to 1:4.

## Acknowledgments

*This work was financially supported by project MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-03).*

## Piśmiennictwo

- [1] Behl M, Lendlein A. Shape-memory polymers. *Mater. Today* 10 (2000) 20-28.
- [2] Ratna D, Karger-Kocsis J. Recent advances in shape memory polymers and composites: a review. *J Mater Sci* 43 (2008) 264-265.
- [3] Wischke C. i wsp. Evaluation of a degradable shape-polymer network as matrix for controlled drug release. *J control release* 138 (2009) 243-250.
- [4] Ratna D, Karger-Kocsis J. Recent advances in shape memory polymers and composites: a review. *J Mater Sci* 43 (2008) 264-265.
- [5] Błażewicz S, Stoch L. *Biomateriały polimerowe*. [W:] Nałęcz M. *Biocybernetyka I inżynieria biomedyczna 2000*, Warszawa: Akademicka oficyna wydawnicza exit (2003).
- [6] Bostman O, Vijanen J, Salminen S, Pihlajamaki H. Response of articular cartilage and subchondral bone to internal fixation devices mad of poly-L-lactide: a histomorphometric and microradiographic study on rabbits. *Biomaterials* 21 (2009) 2553-2560.
- [7] Cordwener F. W, Maarten F, Joziassse C. A. P, Schmitz J. P, Bos R. R. M, Rozema F. R., Pennings A. J. Cytotoxicity of poly(96L/4D-lactide): the influence of degradation and sterilization. *Biomaterials* 21 (2000) 2433-2442.

## References

- [8] Pamuła E, Błażewicz M, Czajkowska B, Dobrzyński P, Bero M, Kasperczyk J. Elaboration and Characterization of Biodegradable Scaffolds from Poly (L-lactide-co-glycolide) Synthesized with Low-Toxic Zirconium Acetylacetonate. *Annals of transplantation*, (2004), 9, 64-67.
- [9] Bouissou C, Walle C. Poly(lactide-co-glycolic acid) microspheres. In: Uchegbu I. F, Schatzlein A. G. *Polymers in Drug Delivery*. CRC Taylor&Francis (2006) 81-99.
- [10] Yu H, Wooley P. H, Yang S. Y. Biocompatibility of Poly-ε-caprolactone-hydroxyapatite composite on mouse bone marrow-derived osteoblasts and endothelial cells, *J Orthop Surg Res* 4 (2009) 5.
- [11] Zhang Z, Grijpma D. W, Feijen J. Creep-resistant Poros structures based on stereo-complex forming triblock copolymers of 1,3-trimethylene carbonate and lactides. *J Mater Sci-Mater M* 15 (2004) 381-385.
- [12] Dobrzyński P, Pastusiak M, Bero M. Less toxic acetylacetonates as initiators of trimethylene carbonate and 2,2-Dimethyltrimethylene carbonate ring opening polymerization. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* 43 (2005) 1913-1922.
- [13] Chłopek J, Morawska-Chochół A, Wietecha A. Wpływ metody przetwórstwa na właściwości polilaktydu. *Inżynieria biomateriałów* (2009) 89-91, 217-220.