

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

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

¹ KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

² KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

³ KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

⁴ CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH, POLSKA AKADEMIA NAUK, UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE

⁵ KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII DZIECIĘCEJ, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. MEDYKÓW 16, 40-752 KATOWICE

* E-MAIL: JWŁADARZ@POCZTA.ONET.PL

Streszczenie

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

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

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

SECRETION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES BY HUMAN CHONDROCYTES CULTURED ON BIODEGRADABLE POLYMERS

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

¹ DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

² DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

³ DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

⁴ CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, CURIE-SKŁODOWSKA 34 ST., 41-819 ZABRZE, POLAND

⁵ DEPARTMENT OF PEDIATRIC SURGERY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, MEDYKÓW 16, 40-752 KATOWICE, POLAND

* E-MAIL: JWŁADARZ@POCZTA.ONET.PL

Abstract

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

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

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

Wprowadzenie

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

Materiały i metody

Kopolimery wykorzystane w badaniach (TABELA 1) zsyntetyzowano w oparciu o procedury opisane we wcześniejszych publikacjach [23]. Kopolimeryzację prowadzono z wykorzystaniem jako inicjatora acetyloacetonianu cyrkonu (Zr(Acac)₄). Eksperymenty przeprowadzono na ośmiu materiałach polimerowych: 1) poli(ϵ -kaprolaktono-ko-glikolid) 92:8 (PCLGA 92:8); 2) poli(L-laktydo-ko-glikolid) 85:15 (PLAGA 85:15); 3) poli(L-laktydo-ko- ϵ -kaprolakton) 75:25 (PLACL 75:25); 4) poli(L-laktydo-ko-węglan trimetyleny) 70:30 (PLATMC 70:30); 5) poli(L-laktydo-ko-węglan trimetyleny)

It was also demonstrated to down-regulate aggrecan and type II collagen synthesis by chondrocytes [13, 14]. However, this cytokine may also have protective effects in the cartilage. Some works have reported that IL-6 induced the expression of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP) [15]. However, reports indicating inhibition of chondrocytes proliferation in the presence of IL-6 signify its adverse impact on the cartilage [14].

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

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

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

Materials and methods

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

30:70 (PLATMC 30:70); 6) poli(glikolido-ko-węglan trime-tylenu) 30:70 (PGATMC 30:70); 7) poli(L-laktydo-ko-ε-kaprolaktono-ko-glikolid) 66:24:10 (P(LA-CL-GA) 66:24:10); 8) poli(L-laktydo-ko-węglan trimetylenu) 50:50 (PLATMC 50:50). Podłoża polimerowe, na których prowadzono hodowlę chondrocytów scharakteryzowano na podsta-wie liczbowo średniej masy molowej (M_n), dyspersji (I_p), temperatury zeszklenia (T_g) oraz parametrów opisujących mikrostrukturę łańcuchów tj. średnia długość jednostek laktydylowych, glikolidowych, kaproilowych i węglanowych (odpowiednio – I_{LL} , I_{GG} , I_{Cap} , I_T), współczynnik bezładności (R) oraz współczynnik transestryfikacji drugiego stopnia (T_{II}). Wartości analizowanych parametrów dla poszczególnych materiałów polimerowych przedstawiono w TABELI 1. Kopolimery rozpuszczano w 1,1,1,3,3,3-Heksafluoro-2-propanolu (1,1,1,3,3,3-HFIP; Fluka) i wprowadzano do stu-dzienek mikroplitek do hodowli komórkowych. Mikroplityki suszono na powietrzu, a następnie w próżni, w celu cał-kowitego usunięcia rozpuszczalnika. Opłaszczono płytki wyjaławiano promieniowaniem γ (25 kGy).

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

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

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

TABELA 1. Charakterystyka badanych kopolimerów.
TABLE 1. Characterization of the studied copolymers.

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

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

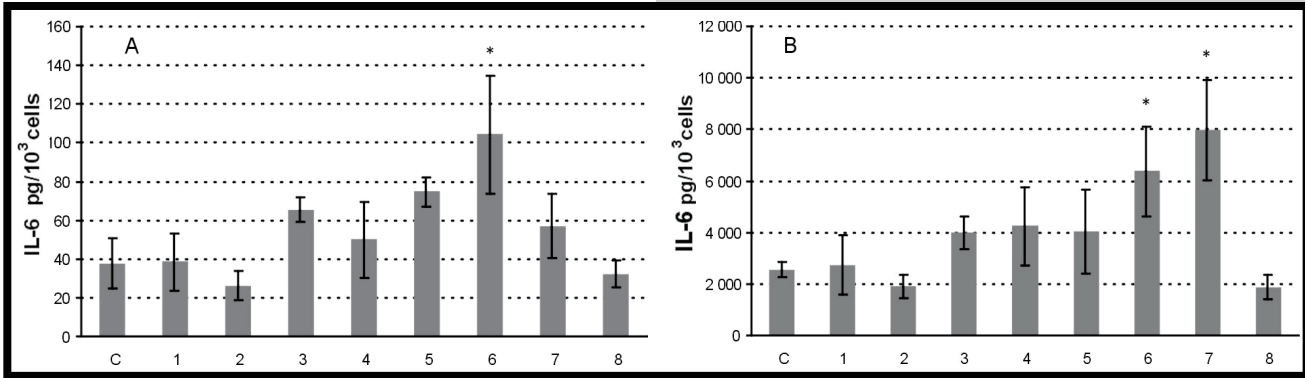
W ramach niniejszej pracy dokonano oceny biogodności wybranych biodegradowalnych materiałów w oparciu o poziom sekrecji prozapalnych cytokin przez komórki rosnące na ich powierzchni. W przeprowadzonym eksperymencie nie stwierdzono sekrecji IL-1 α oraz IL-1 β zarówno przez kontrolne hodowle chondrocytów,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

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

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

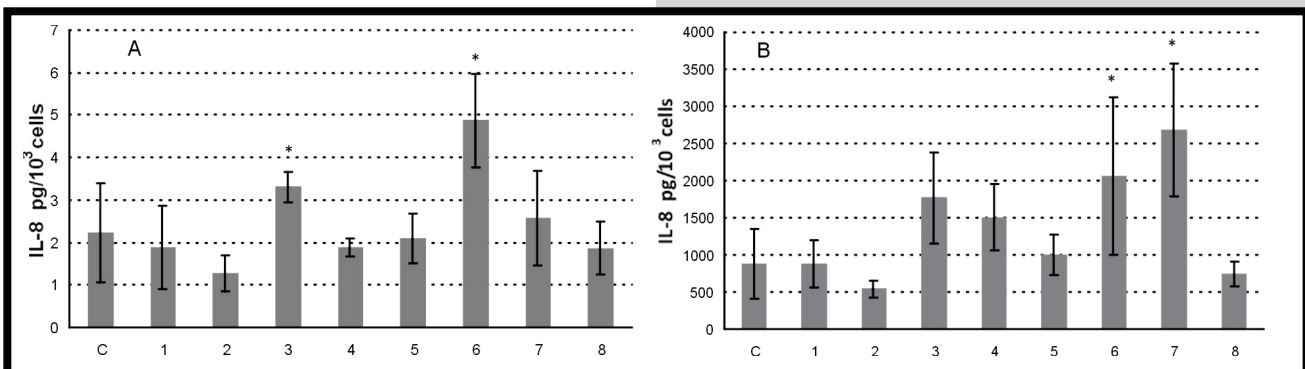
In the present experiment we have studied biocompatibility of the selected biodegradable polymers based on the level of proinflammatory cytokines released by cells growing on their surface. Our study did not show secretion of IL-1 α and IL-1 β , neither by the control cultures of chondrocytes nor by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

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



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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wnioski

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

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

Podziękowania

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

Conclusions

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

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

Acknowledgements

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

- [1] Kaźnica A., Joachimiak R., Drewa T., Drewa G.: Zastosowanie inżynierii tkankowej w wybranych działach medycyny regeneracyjnej. *Med. Biol. Sci.* 21 (2007) 9-14.
- [2] Lloyd A. W.: Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Med. Device Technol.* 13 (2002) 18-21.
- [3] Hrycaj P., Łącki J.K.: Od zwyrodnienia do zapalenia - współczesne poglądy na patogenezę choroby zwyrodnieniowej stawów. *Nowa Med.* 2 (2002) 7-16.
- [4] Verbruggen C.: Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology.* 45 (2006) 129-138.
- [5] Malejczyk J.: Regulacja odtwarzania i niszczenia macierzy chrząstki stawowej. *Terapia* 5 (1997) 46-48.
- [6] Goldring M.B.: The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 1916-1926.
- [7] Martel-Pelletier J., McCollum R., Fujimoto N., Obata K., Cloutier J.M., Pelletier J.P.: Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* 70 (1994) 807-815.
- [8] Sanchez C., Deberg M.A., Burton S., Devel P., Reginster J.Y., Henrotin Y.E.: Differential regulation of chondrocyte metabolism by oncostatin M and interleukin-6. *Osteoarthr. Cartilage* 12 (2004) 801-810.
- [9] Aida Y., Maeno M., Suzuki N., Namba A., Motohashi M., Matsumoto M., Makimura M., Matsumura H.: The effect of IL-1beta on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. *Life Sci.* 79 (2006) 764-771
- [10] Westacott C.I., Sharif M.: Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin. Arthritis Rheum.* 25 (1996) 254-272.
- [11] Goldring M.B.: The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res.* 40 (1999) 1-11.
- [12] Kraan M.C., Patel D.D., Haringman J.J., Smith M.D., Weedon H., Ahern M.J., Breedveld F.C., Tak P.P.: The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). *Arthritis Res.* 3 (2001) 65-71.
- [13] Legendre F., Dudhia J., Pujol J.P., Bogdanowicz P.: JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2903-2912.
- [14] Kontny E., Maśliński W.: Interleukina 6 – znaczenie biologiczne i rola w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Reumatologia* 47 (2009) 24-33.
- [15] Cronstein B.N.: Interleukin-6. A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65 (2007) S11-S15.
- [16] Attur M.G., Dave M., Akamatsu M., Katoh M., Amin A.R.: Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthr. Cartilage* 10 (2002) 1-4.
- [17] Houssiau F.A., Devogelaer J.P., van Damme J., de Deuxchaisnes C.N., Van Snick J.: Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.* 31 (1988) 784-788.
- [18] Pulsatelli L., Dolzani P., Piacentini A., Silvestri T., Ruggeri R., Gualtieri G., Meliconi R., Facchini A.: Chemokine production by human chondrocytes. *J. Rheumatol.* 26 (1999) 1992-2001.
- [19] Madhok R., Crilly A., Watson J, Capell H.A.: Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* 52 (1993) 232-234.

- [20] Schutte R.J., Xie L., Klitzman B., Reichert W.M.: In vivo cytokine-associated responses to biomaterials. *Biomaterials* 30 (2009) 160-168.
- [21] Żywicka B., Czarny A., Zaczynska E., Karaś J.: Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, indukcja cytokin prozapalnych *in vitro* oraz badania biogodności ceramiki węglanowej *in vivo*. *Polimery w Medycynie* 36 (2006) 23-36.
- [22] Nair L. S., Laurencin C. T.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762-798.
- [23] Dobrzyński P., Kasperczyk J.: Synthesis of biodegradable copolymers with low-toxicity zirconium compound. IV. Copolymerization of glycolide with trimethylene carbonate and 2,2-dimethyltrimethylene carbonate : microstructure analysis of copolymer chains by high-resolution Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 14 (2006) 98-114.
- [24] Orchel A., Dylla A., Jelonek K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Owczarek A., Bielecki I., Dzierżewicz Z.: Growth of human chondrocytes on biodegradable synthetic polymers. *Eng. Biomater.* 2008 58-60 (2006) 223-226.
- [25] Czajkowska B, Dobrzynski P, Bero M.: Interaction of cells with L-lactide/glycolide copolymers synthesized with the use of tin or zirconium compounds. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 74 (2005) 591-597
- [26] Pamula E., Blazewicz M., Czajkowska B., Dobrzynski P., Bero M., Kasperczyk J.: Elaboration and Characterization of Biodegradable Scaffolds from poly (L-Lactide-co-glycolide) synthesized with Low-Toxic Zirconium Acetylacetonate. *Ann. Transplant.* 9 (2004) 64-67.
- [27] Orchel J., Orchel A., Kasperczyk J., Pamula E., Padaszyński P., Dobrzyński P., Pałasz A., Bielecki I., Jelonek K., Dzierżewicz Z.: Growth and differentiation of human chondrocytes on biodegradable polymeric scaffolds. *Inż. Biomater. / Eng. Biomater* 81-84 (2008) 8-11.
- [28] Orchel A., Jelonek K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Orchel J., Dzierżewicz Z.: Biocompatibility of biodegradable synthetic polymers for human fibroblasts. *Eng. Biomater.* 81-84 (2008) 5-8.
- [29] Seid J.M., Rahman S., Graveley R., Bunning R.A., Nordmann R., Wishart W., Russell R.G.: The effect of interleukin-1 on cytokine gene expression in cultured human articular chondrocytes analyzed by messenger RNA phenotyping. *Arthritis Rheum.* 36 (1993) 35-43.
- [30] De Ceuninck F., Dassencourt L., Anract P.: The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 (2004) 960-969.
- [31] Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Abramson S.B.: Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 1237-1247.
- [32] Bender S., Haubeck H.D., Van de Leur E., Dufhues G., Schiel X., Lauwerijns J., Greiling H., Heinrich P.C.: Interleukin-1 beta induces synthesis and secretion of interleukin-6 in human chondrocytes. *FEBS Lett.* 263 (1990): 321-324.
- [33] David F., Farley J., Huang H., Lavoie J.P., Laverty S.: Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. *Vet. Surg.* 36 (2007) 221-227.
- [34] Rotter N., Ung F., Roy A.K., Vacanti M., Eavey R.D., Vacanti C.A., Bonassar L.J.: Role for interleukin 1alpha in the inhibition of chondrogenesis in autologous implants using polyglycolic acid-poly lactic acid scaffolds. *Tissue Eng.* 11 (2005) 192-200.