

- Badane powierzchnie wykazują charakter hydrofilowy.
- Obiecującą modyfikacją wydaje się być naniesiona warstwa dekstranu, która w największym stopniu zwiększa odporność korozyjną oraz chropowatość powierzchni.
- Wytworzenie na powierzchni trawionej w roztworze pirania charakterystycznych mikroporowatości, niewykrywalnych przy zastosowaniu profilometru, może być dodatkowym czynnikiem sprzyjającym wzrostowi komórek. Problem ten będzie przedmiotem dalszych badań.

## Podziękowanie

Praca badawcza zrealizowana w ramach projektu badawczego zamawianego 5/PBZ-KBN-082/T08/2002.

## Piśmiennictwo

- [1] M.Wieland, M.Textor, B.Chehoudai, D. M.Brunette, Synergistic interaction of topographic features in production bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts, *Biomaterials* 26 (2005) 1119-1130.
- [2] D.D.Deligianni, N.Katsala, S. Ledas, D.Sotiropoulou, J.Amedee, Y.F.Missirlis, Effect of surface roughness of titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22(2001) 1241-1251.
- [3] S.Kanagaraja, A.Wennerberg, C.Eriksson, H.Nygren, Cellular reaction and bone apposition to titanium surface with different surface roughness and oxide thickness cleaned by oxidation, *Biomaterials* 22(2001) 1809-1818.

## HYDROLITYCZNA I ENZYMATYCZNA DEGRADACJA KOPOLIMERA GLIKOLIDU Z L-LAKTYDEM

ELŻBIETA PAMUŁA, MAGDALENA M. RUTKOWSKA

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA  
EPAMULA@AGH.EDU.PL

### Streszczenie

Kopolimer glikolidu z L-laktydem (PGLA) poddano degradacji w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) i roztworze PBS zawierającym trypsynę. Zmiany zwilżalności w funkcji czasu degradacji badano metodą kropli, podczas gdy topografię i morfologię powierzchni oceniano za pomocą mikroskopu sił atomowych i mikroskopu do światła odbitego. Wykazano, że folie PGLA tracą spójność w czasie 6 tygodni w wyniku degradacji w masie. Trypsyna nie przyspiesza procesu degradacji PGLA.

[*Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),49-52*]

### Wprowadzenie

Kopolimery glikolidu z L-laktydem są z powodzeniem wykorzystywane jako biomateriały, nośniki leków i rusztowania dla komórek w inżynierii tkankowej [1]. Materiały te ulegają degradacji w wyniku reakcji hydroлізу wiązań poliestrowych, chociaż wykazano, że obecność niektórych en-

## Acknowledgement

49

This work was supported by the State Committee for Scientific Research - grant No 5/PBZ-KBN-082/T08/2002.

## References

- [4] J.W.M.Vehof, P.H.M. Spuwen, J.A.Jensen, Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh, *Biomaterials* 21 (2000) 2003-2009.
- [5] P. Tambasco de Oliveira, A.Nanci, "Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells", *Biomaterials* 25 (2004) 403-413.
- [6] M.Lewandowska, H.Garbac, B.Polak, W.Fabianowski, M.Lewandowska-Szumiał: "Modyfikacje powierzchni siateczek tytanowych przeznaczonych na implanty" *Inżynieria Biomateriałów*. 38-43 (2004) 60-62.

## HYDROLITYCZNA I ENZYMATYCZNA DEGRADACJA DEGRADATION OF POLY-(GLYCOLIDE-CO-L-LACTIDE)

ELŻBIETA PAMUŁA, MAGDALENA M. RUTKOWSKA

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND  
EPAMULA@AGH.EDU.PL

### Abstract

Copolymer of glycolide and L-lactide (PGLA) has been submitted to degradation in phosphate buffered saline (PBS) and in PBS containing trypsin. The evolution of wettability during degradation was studied by sessile drop while topography and morphology were evaluated by atomic force microscopy and optical microscopy. It was shown that PGLA foils lose their integrity within 6 weeks, due to 'in bulk' degradation. Trypsin seems not to accelerate degradation of PGLA. [*Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),49-52*]

### Introduction

Copolymers of glycolide and L-lactide have received considerable attention as degradable devices for medicine, drug delivery, and scaffolds for tissue engineering applications [1]. Such materials degrade through simple hydrolysis of polyester bonds, however it was shown that presence or enzymes isolated from fungi or bacteria can accelerate their degradation time, for example proteinase K preferentially degrades L-lactyl units of poly(lactides) [2-3]. It was recently shown that trypsin can influence degradation of porous scaf-

zymów wyizolowanych z grzybów lub bakterii może przyspieszać ich czas degradacji, np. proteinaza K powoduje preferencyjne rozrywanie wiązań w poli-L-laktydach [2-3]. Ostatnio stwierdzono, że trypsyna może wpływać na degradację porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej wykonanych z kopolimeru glikolidu z L-laktydem, przyspieszając ich ubytek masy [4]. Trypsyna jest enzymem o szczególnym znaczeniu, ponieważ jest rutynowo wykorzystywana w hodowlach komórkowych in vitro. Trypsynę klasyfikuje się do grupy hydrolaz, dlatego potencjalnie może ona również powodować rozrywanie wiązań poliestrowych. Z tego względu, wydaje się niezwykle ważne określenie, czy enzym ten wpływa na kinetykę degradacji materiałów wykorzystywanych jako podłoża dla komórek.

Celem pracy było ocenienie wpływu trypsyny na degradację folii PGLA. Zastosowano stężenie trypsyny odpowiadające warunkom hodowli komórkowych.

## Część eksperymentalna

### Materiały

Kopolimer glikolidu z L-laktydem (PGLA) zsyntezowano według metody opisanej poprzednio [5]. PGLA miał następujące właściwości: stosunek molowy glikolidu do L-laktydu - 17:83, liczbowo-średnia masa cząsteczkowa,  $M_n=50,5$  kDa, współczynnik polidispersji  $d=2,3$  i temperatura transformacji,  $T_g=54^\circ\text{C}$ . Folie o grubości  $0,18\pm 0,02$  mm otrzymano metodą odlewania z roztworu polimeru w chlorku metylenu (POCh, Gliwice, Polska) na szklane szalki Petriego i suszenia na powietrzu i w próżni co najmniej przez 24h.

Próbki polimerowe (średnica 15 mm) umieszczono w 24-dolkowych płytkach hodowlanych (Nunc, Dania) i do każdego dołka dodano 2 ml buforowanego roztworu soli fizjologicznej PBS (137 mM NaCl, 6,44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) lub roztworu trypsyny w PBS (5 mg/ml, Sigma, Niemcy). Badaniom poddano powierzchnię dolną folii, tj. kontaktującą się ze szkłem w trakcie otrzymywania. Płytki umieszczono w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  na czas od 1 do 6 tygodni. Następnie próbki przemyto dziesięciokrotnie poprzez odpompowanie 1,5 ml płynu i dodanie 1,5 ml wody UHQ (PureLab, Elga, Niemcy). Próbki suszono w eksykatorku nad  $\text{P}_2\text{O}_5$  przez 2 tygodnie. W pozostałych próbkach co tydzień wymieniano roztwór poprzez odpompowanie 1,5 ml płynu i dodanie 1,5 ml świeżego płynu.

### Metody

Badania topografii powierzchni przeprowadzono w powietrzu za pomocą mikroskopu sił atomowych Explorer (ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Obrazy w trybie kontakt zarejestrowano za pomocą sond  $\text{Si}_3\text{N}_4$  o stałej sprężystości 0,05 N/m i nominalnej krzywiznie ostrza 20 nm (Veeco NanoProbe<sup>TM</sup> Tips, model MLC-EXMT-A). Obrazy zarejestrowano dla różnych obszarów skanowania:  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ,  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ ,  $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ ,  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  dla trzech losowo wybranych miejsc (rozdzielczość  $300 \times 300$  punktów) z szybkością skanowania 5 linii/s. Wszystkie obrazy poddano procesowi spłaszczania z wykorzystaniem oprogramowania dostarczonego wraz z urządzeniem. Dla wszystkich obszarów skanowania wyznaczono chropowatość Ra.

Morfologię folii obserwowano za pomocą mikroskopu do światła odbitego (Nicon, Epiphot 300, powiększenie 20x). Kąt zwilżania wyznaczono metodą kropli za pomocą automatycznego systemu analizy kształtu kropli DSA 10 Mk2 (Kruss, Niemcy). Krople wody UHQ (oczyszczonej przez Purelab UHQ, Elga, Niemcy) o objętości  $0,2\ \mu\text{l}$  kładziono na powierzchni próbki. Wynik przedstawiano jako średnią z 10-12 pomiarów pojedynczych kropli.

folds made of copolymers of glycolide and L-lactide, by enhancing their weight loss [4]. Trypsin is an enzyme of particular interest, because it is routinely used for cell culturing in vitro. Trypsin is classified to the group of hydrolases, therefore it potentially could catalyze degradation of polyester bonds. Hence, it is important to know if this enzyme affects degradation kinetics of materials used as a support of cells.

The aim of this study was to evaluate the influence of trypsin on degradation of PGLA foils. The concentration of trypsin was that of used in cell culture conditions.

## Experimental part

### Materials

Copolymer of glycolide and L-lactide (PGLA) was synthesized according to the method described previously [5]. PGLA had the following parameters: molar ratio of glycolide and L-lactide - 17:83, number average molecular weight,  $M_n=50.5$  kDa, polydispersion index  $d=2.3$  and glass transition temperature,  $T_g=54^\circ\text{C}$ . Foils having thickness of  $0.18\pm 0.02$  mm were obtained by slip casting of polymer solution in methylene chloride (POCh, Gliwice) on glass Petri dishes, followed by air and vacuum drying for at least 24 h. The polymer samples (diameter of 15 mm) were placed into Nunclon Multidishes (24 wells, Nunc, Denmark) and 2 ml of phosphate buffered saline PBS (137 mM NaCl, 6.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) or trypsin solution in PBS (5 mg/ml, Sigma, Germany) were poured to each well. Always the lower surface of the foil, e.g. contacting glass during slip-casting, was analysed. The multidishes were put in an incubator at  $37^\circ\text{C}$  for 1 - 6 weeks. Samples were then rinsed 10 times by pumping 1.5 ml of the liquid and adding 1.5 ml UHQ water (Pure Lab UHQ, Elga, Germany) followed by drying in a desiccator over  $\text{P}_2\text{O}_5$  for two weeks. In the remaining samples the solution was exchanged every week by pumping 1.5 ml of the liquid and adding 1.5 ml of the fresh liquid.

### Methods

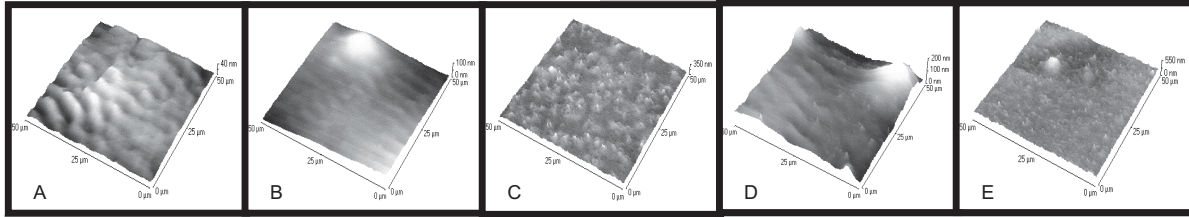
Topography measurements were performed under ambient laboratory conditions with an Explorer atomic force microscope (ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Contact mode topographic images were recorded using  $\text{Si}_3\text{N}_4$  tips with a spring constant of 0.05 N/m and a nominal radius of curvature of 20 nm (Veeco NanoProbe<sup>TM</sup> Tips, model MLCT-EXMT-A). The images were recorded at different scan areas:  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ,  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ ,  $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ ,  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  for three aleatory chosen places ( $300 \times 300$  data points) and with scan rate of 5 lines/s. All images were flattened using a third order polynomial algorithm provided with the instrument. Roughness (Ra) was calculated for all scanned areas.

Morphology of the foils was observed by an optical microscope (Nicon, Epiphot 300, magnification 20x).

The contact angle was measured by sessile drop method by an automatic drop shape analysis system DSA 10 Mk2 (Kruss, Germany). UHQ-water (produced by Purelab UHQ, Elga, Germany) droplets of the volume of  $0.2\ \mu\text{l}$  were put on each sample and the contact angle was obtained by averaging the results of 10-12 measurements.

## Results and discussion

Visual examination shows that PGLA foils were initially transparent. After 1 week of incubation in both media the foils become white and opaque. Interestingly the foils in contact with pure PBS remain glistening, while that degraded



**RYS. 1.** Obrazy topograficzne AFM powierzchni PGLA (obszar skanowania  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ): A-przed degradacją ( $z=40\text{ nm}$ ), B-po 1 tygodniu w PBS ( $z=100\text{ nm}$ ), C-po 1 tygodniu w roztworze trypsyny ( $z=350\text{ nm}$ ), D-po 3 tygodniach w PBS ( $z=200\text{ nm}$ ) i E-po 3 tygodniach w roztworze trypsyny ( $z=550\text{ nm}$ ).

**FIG. 1.** AFM topographical images of PGLA surface (scan area  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ): A-before degradation ( $z=40\text{ nm}$ ), B-after 1 week in PBS ( $z=100\text{ nm}$ ), C-after 1 week in trypsin solution ( $z=350\text{ nm}$ ), D-after 3 weeks in PBS ( $z=200\text{ nm}$ ) and E-after 3 weeks in trypsin solution ( $z=550\text{ nm}$ ).

## Wyniki i dyskusja

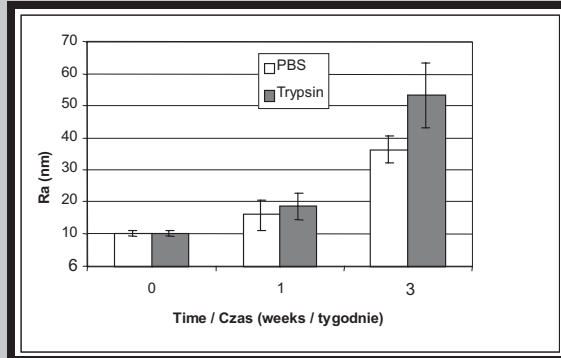
Folie PGLA były początkowo przezroczyste. Po pierwszym tygodniu inkubacji, niezależnie od rodzaju płynu stały się białe i nieprzezroczyste. Folie kontaktujące się z PBS pozostały lśniące do końca eksperymentu, podczas gdy inkubowane w roztworze trypsyny stały się matowe. Po 4 tygodniach degradacji folie zaczynały się kruszyć podczas wyjmowania z dołków.

RYS.1 przedstawia obrazy topograficzne AFM folii PGLA przed i po inkubacji w PBS i PBS zawierającym trypsynę. Powierzchnia folii PGLA przed degradacją była stosunkowo gładka i występowały na niej tylko struktury faliste o wysokości nie przekraczającej  $40\text{ nm}$  (RYS.1A). Taka budowa powierzchni jest charakterystyczna dla folii polimerowych otrzymanych metodą odlewania z roztworu i powstaje w czasie odparowywania rozpuszczalnika. Inkubacja w PBS powodowała powstawanie wybrzuszeń na powierzchni, których wysokość osiągała  $100\text{ nm}$  i  $200\text{ nm}$  dla czasów degradacji odpowiednio 1 i 3 tygodnie (RYS.1B, D). Na powierzchni folii kontaktującej się z roztworem trypsyny obserwowano aglomeraty białka już po 1 tygodniu inkubacji (RYS.1C). Aglomeraty białka tworzyły monowarstwę po 3 tygodniach inkubacji (RYS.1D).

Inkubacja w obu mediach powodowała wzrost chropowatości powierzchni Ra (RYS.2), głównie z powodu wytworzenia się wybrzuszeń. Chropowatość folii PGLA inkubowanej w roztworze trypsyny była zawsze nieco wyższa z uwagi na zaadsorbowane cząsteczki białka.

Mikrostrukturę folii obserwowaną za pomocą mikroskopu do światła odbitego przedstawiono na RYS.3. Przed degradacją powierzchnia folii polimerowej była gładka (RYS.3A). Inkubacja w PBS przez 6 tygodni spowodowała powstanie wybrzuszeń o średnicy około  $200\mu\text{m}$  (RYS.3C). Na powierzchni próbek degradowanych w roztworze trypsyny już po pierwszym tygodniu występowały białe wydzielania (RYS.3B). Wielkość wydzieleń wzrastała w funkcji czasu inkubacji. Po 6 tygodniu inkubacji białko tworzyło monowarstwę.

RYS.4 przedstawia zależność kąta zwilżania w funkcji czasu inkubacji w obu mediach. Kąt zwilżania folii degradowanej w czystym PBS nie zmienił się w funkcji czasu, chociaż folie stawały się nieprzezroczyste i kruche. Kąt zwilżania folii inkubowanej w roztworze trypsyny obniżał się do 3

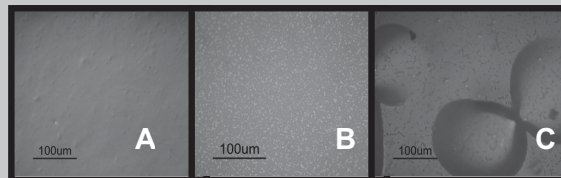


**RYS. 2.** Zależność chropowatości Ra od czasu degradacji w PBS i roztworze trypsyny (obszar skanowania  $100\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ ,  $n=3 \pm$  odchylenie standardowe).

**FIG. 2.** Evolution of Ra roughness as a function of degradation time in PBS and trypsin solution (scan areas  $100\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ ,  $n=3 \pm$  standard deviation).

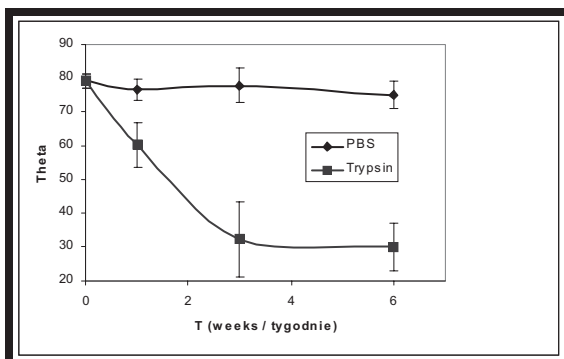
in trypsin solution become mat. After 4 weeks of degradation the foils start to crumble while taking them out of the wells.

FIG.1 presents AFM topographical images of the PGLA surface before and after incubation in PBS and PBS supplemented with trypsin. The surface of PGLA before degradation was quite smooth and only wave-like features of the high not exceeding  $40\text{ nm}$  were present (FIG.1A). Such topographical features are characteristic for polymeric foils obtained by slip casting and are created during evaporation of the solvent. Incubation in PBS resulted in creation of bangles (FIG.1B, D); their high was  $100\text{ nm}$  and  $200\text{ nm}$  for degradation time 1 and 3 weeks, respectively. On the surface of foils being in contact with trypsin protein agglomerates were clearly visible after 1 week of incubation (FIG.1C). The protein agglomerates formed a monolayer after 3 weeks of incubation (FIG.1D).



**RYS. 3.** Morfologia powierzchni PGLA: (A) przed degradacją, (B) 1 tydzień po degradacji w roztworze trypsyny i (C) 6 tygodni w roztworze PBS (mikroskop od światła odbitego, powiększenie 20x).

**FIG. 3.** Morphology of the PGLA surface: (A) before degradation, (B) after 1 week of degradation in trypsin solution and (C) and after 6 weeks in PBS (optical microscope, magnification 20x).



**RYS. 4. Zależność kąta zwilżania od czasu inkubacji w PBS i roztworze trypsyny.**

**FIG. 4. Evolution of water contact angle as a function of incubation time in PBS and in trypsin solution.**

tygodnia i później nie ulegał zmianie. Wyniki wskazują, że wzrost hydrofilowości był wynikiem adsorpcji cząstek białka.

Podsumowując, folie PGLA ulegają bardzo szybkiej degradacji w środowisku wodnym. Po pierwszym tygodniu stają się nieprzezroczyste i po 6 tygodniach tracą spoiwość. Pojawienie się wybrzuszeń już po pierwszym tygodniu inkubacji i ich wzrost do szóstego tygodnia sugerują, że folie degradują się w masie. Stały kąt zwilżania poprzez cały czas inkubacji w PBS wykazuje, że erozja powierzchni nie jest głównym mechanizmem degradacji folii PGLA. Trypsyna nie wpływa na degradację folii PGLA, chociaż warstwa zaadsorbowanego białka może stanowić barierę dyfuzyjną dla produktów degradacji (rozpuszczalnych oligomerów) i zapobiegać ich wydzielaniu się do środowiska wodnego.

## Podziękowania

Praca sfinansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji (projekt Nr 3 T08D 019 28)

## Piśmiennictwo

- [1] S. Dumitriu; Polymeric biomaterials; Marcel Dekker Inc., USA 2002; str. 91-97, 179-181.
- [2] M. S. Reeve, S. P. McCarthy, M. J. Downey, R.A. Gross; Polylactide stereochemistry: effect on enzymatic degradability; Macromolecules 27 (1994) 825-831.
- [3] Z. Gan, D. Yu, Z. Zhong, Q. Liang, X. Jing; Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(DL-lactide) blends in phosphate buffer solution; Polymer 40 (1999) 2859-2862.

Incubation in both media causes an increase of  $R_a$  roughness (FIG.2), mainly due to creation of bangles. The roughness of PGLA foils incubated in contact with trypsin was always slightly higher due to adsorbed protein molecules.

The microstructure of the foils observed under optical reflection microscope is presented in FIG.3. Before degradation the surface of polymeric foil was smooth (FIG.3A). Incubation in PBS for 6 weeks resulted in creation of many bulges about 200  $\mu\text{m}$  in diameter (FIG.3C). On the surface of samples degraded in trypsin solution already after 1-week incubation white spots appeared (FIG.3B). The size of spots increases as a function of incubation time. After 6 weeks of incubation a monolayer of the protein was observed.

FIG.4 presents the evolution of water contact angle as a function of incubation time in both media. Contact angle of the samples degraded in pure PBS did not change during degradation, although the foils changed colour and become fragile. Contact angle of the foils incubated with trypsin solution decreased till the third week and remained constant. The results imply that increase of hydrophilicity was due to adsorption of protein molecules.

In conclusion, PGLA foils degrade very fast in aqueous media. After 1 week they become opaque and after 6 week they lose integrity. Appearance of bangles already after 1-week degradation and their grow till the 6th week suggest that the foils degrade 'in bulk'. Contact angle stability for the whole period of incubation in PBS suggest that surface erosion is not the main degradation mechanism of PGLA. Trypsin seems not to influence degradation of PGLA, although protein layer can act as a diffusion barrier preventing degradation products (soluble oligomers) to be released to the aqueous medium.

## Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Information Society Technologies, as a research project No 3 T08D 019 28

## References

- [4] Q. Cai, G. Shi, J. Bei, S. Wang; Enzymatic degradation behaviour and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin; Biomaterials 24 (2003) 629-638.
- [5] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero; Synthesis of biodegradable copolymers with use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by  $\text{Zr}(\text{acac})_2$ ; Macromolecules 34 (2001) 5090-5098.