7. strefa zawierająca ooddzielone ziarna byłej fazy  $\beta$  i płytkowej struktury fazy  $\alpha$ , o mikrotwardości 515 HV<sub>0,05</sub>;

 8. strefa wpływu ciepła (SWC), głębokość 1,65 mm;
Przetopienie laserowe przy dużej prędkości skanowania prowadziło do dużej nieciągłości i niejednorodności. Wzrost mocy lasera spowodował lepsze wykształcenie warstwy i polepszenie jej cech.

Badania składu fazowego strefy bliskiej strefie przetopienia ujawniły obecność różnorodnych tlenków, azotków, złożonych faz, a nawet czystego pierwiastka Ti (TABELA 1). TABELA 2 ukazuje skład fazowy próbki wyznaczony przy użyciu goniometru X-Pert.

### Wnioski

Przetapianie laserowe stopu Ti-6Al-4V, schłodzonego w ciekłym azocie, przyniosły efekty w postaci szerokiej i twardej warstwy o bardzo złożonej mikrostrukturze. Strefy bliskie powierzchni wykazały obecność tlenków tytanu rutylu i anatazu oraz azotków przy zmodyfikowanej powierzchni stopu.

# Podziękowania

Autorzy są wdzięczni dr M. Gaździe (PG) i mgr R. Majorowi (IMIM) za ich cenny wkład w wykonanie badań. Praca naukowa jest finansowana ze środków na naukę w latach 2005-2007 jako projekt badawczy.

# Piśmiennictwo

 Yue T.M., Cheung T.M., Man H.C.: The effects of laser surface treatment on the corrosion properties of Ti-6AI-4V alloy in Hank's solution. Journal of Materials Science Letters 19 (2000) 205-208.
Yue T.M., Yu J.K., Mei Z., Man H.C.: Excimer laser surface treatment of Ti-6AI-4V alloy for corrosion resistance enhancement. Materials Letters 52 (2002) 206-212.

# ADHEZJA I WZROST LUDZKICH CHONDROCYTÓW NA POWIERZCHNI BIORESORBOWALNYCH MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH

Arkadiusz Orchel\*, Anna Dylla\*, Katarzyna Jelonek\*, Janusz Kasperczyk\*, Piotr Dobrzyński\*\*, Aleksander Owczarek\*\*\* Ireneusz Bielecki\*\*\*\*, Zofia Dzierżewicz\*

\*Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny, Śląska Akademia Medyczna,

UL. NARCYZÓW 1, SOSNOWIEC 41-200, POLSKA

\*\*Polska Akademia Nauk, Centrum Chemii Polimerów,

ul. M. Sklodowskiej-Curie 34, Zabrze 41-819, Polska \*\*\*\*Katedra i Zakład Bioniki,

UL. OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND \*\*\*\*ODDZIAŁ LARYNGOLOGII SPSK NR 6, GÓRNOŚLĄSKIE CEN-TRUM ZDROWIA DZIECKA I MATKI W KATOWICACH. UL. MEDYKÓW 16, 40-752 KATOWICE, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),223-226]

The examinations of the phase composition of zone close to the melted surface showed a variety of oxides, nitrides, complex phases and even pure element, Ti. In TABLE 2 the intensity of X-ray diffraction of reflexes measured by X`Pert goniometer are shown.

#### Conclusion

The laser melting of the Ti-6Al-4V alloy cooled in liquid nitrogen effects in thick and hard layer of very complex phase microstructure.

The near-surface zone shows a variety of rutile and anatase titanium oxides, and titanium nitrides, which are together of a great potential as surface modification of bioalloy is considered.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the valuable contribution of Dr. Gazda, GUT, and Mr. Major, IMME. This scientific work has been financially supported by scientific funds in 2004-2005 as a research project.

#### References

[3] Guillemot F., Prima E. *et al.*, Ultraviolet laser surface treatment for biomedical applications of  $\beta$  titanium alloys: morphological and structural characterization. Applied Physics A 77 (2003) 899-904.

# GROWTH OF HUMAN CHONDROCYTES ON BIODEGRADABLE SYNTHETIC POLYMERS

Arkadiusz Orchel\*, Anna Dylla\*, Katarzyna Jelonek\*, Janusz Kasperczyk\*, Piotr Dobrzyński\*\*, Aleksander Owczarek\*\*\* Ireneusz Bielecki\*\*\*\*, Zofia Dzierżewicz\*\*

\*Department of Biopharmacy, Medical University of Silesia, Narcyzów 1, Sosnowiec 41-200, Poland \*\*Polish Academy of Sciences, Centre of Polymer Chemistry, M. Sklodowskiej-Curie 34, Zabrze 41-819, Poland \*\*\*Department of Bionics, Medical University of Silesia, Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec, Poland \*\*\*\*Department of Otolaryngology, Medical University of Silesia, Medyków 16, Katowice 40-752, Poland

[Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),223-226]

**MATERIAŁÓW** 

#### 223

# 224 Wstęp

Ograniczona zdolność chrząstki do regeneracji jest głównym czynnikiem utrudniającym opracowanie skutecznych metod terapii ubytków w obrębie tkanki chrzęstnej. Zapotrzebowanie na nowe metody terapeutyczne, które zapewniłyby pełną regenerację uszkodzonej chrząstki jest jedną z przyczyn szybkiego rozwoju, w ostatnich latach, technik inżynierii tkankowej. Kluczowe znaczenie dla rozwoju tej stosunkowo młodej dziedziny ma opracowanie biozgodnych, bioresorbowalnych materiałów, które mogłyby być wykorzystane do wytwarzania trójwymiarowych podłoży, o mikrostrukturze i właściwościach sprzyjających zasiedlaniu ich przez komórki. Najbardziej perspektywicznymi biomateriałami wydają się być syntetyczne polimery z grupy poliestrów alifatycznych. Kopolimery glikolidu, laktydu, ɛ-kaprolaktonu oraz trimetylenowęglanu (TMC) są szeroko badane pod kątem ich kątem wykorzystania ich do konstrukcji rusztowań dla przeszczepianych komórek [1,2]. Materiały te powinny być biozgodne i posiadać właściwości, które stymulują adhezję, namnażanie oraz różnicowanie wyselekcjonowanych komórek. Jednakże tradycyjne metody syntezy tych biomateriałów wykorzystują bardzo toksyczne związki cyny jako inicjatory procesu polimeryzacji. Całkowita eliminacja tych związków z polimeru jest praktycznie niemożliwa, co skutkuje ich powolnym przenikaniem do układu krążenia pacjenta [4]. Ponadto obecność omawianych materiałów w organizmie może powodować reakcję zapalną [5].

Celem pracy była ocena procesów adhezji oraz wzrostu ludzkich chondrocytów na powierzchni szeregu biodegradowalnych materiałów polimerowych różniących się składem chemicznym, strukturą łańcucha, masą cząsteczkową oraz strukturą przestrzenną. Jako biodegradowalne materiały polimerowe zostaną zastosowane kopolimery glikolidu, laktydu, ε-kaprolaktonu oraz TMC, otrzymywane metodami wykorzystującymi nietoksyczne inicjatory polimeryzacji.

# Materiały i metody

Wszystkie próby kopolimerów (TABELA 1) otrzymano na podstawie wcześniej opisanych procedur kopolimeryzacji [6]. Kopolimeryzację przeprowadzono w masie w atmosferze argonu, umieszczając komonomery z Zr(Acac)<sub>4</sub> w szczelnie zamkniętych szklanych ampułach. Ampuły umieszczono w łaźni olejowej zaopatrzonej w shaker, w temperaturze 120°C.

Masę cząsteczkową (Mn) oraz polidyspersję (D) wyznaczono za pomocą chromatografii żelowej przy użyciu chromatografu Physics SP 8800. Widma H-1 (300MHz) i C-13 (75MHz) NMR kopolimerów wykonano na spektrometrze Varian Unity Inova. Jako rozpuszczalnik zastosowano osuszony DMSO-d<sub>6</sub> lub CDCI<sub>3</sub>. Widma protonowe otrzymano przy czasie akwizycji 3.74sek., szerokości impulsu PW = 7 µs, i 4.7 sek. odstępem między impulsami, natomiast węglowe z czasem akwizycji 1.8 sek., szerokością impulsu PW = 9 µs i odstępem między impulsami 3 sek.

Otrzymane kopolimery rozpuszczano w 1,1,1,3,3,3-HFIP (1,1,1,3,3,3-Heksafluoro-2-propanol; Fluka) uzyskując roztwory o jednakowej lepkości, które następnie wprowadzano do studzienek mikropłytek testowych do hodowli komórkowej. Do studzienek kontrolnych wprowadzano sam rozpuszczalnik. Mikropłytki te suszono, najpierw na powietrzu a następnie w próżni w celu całkowitego usunięcia rozpuszczalnika. Następnie płytki sterylizowano promieniowaniem  $\gamma$ . Chondrocyty izolowano z chrzęstnych fragmentów przegrody nosowej pacjentki w wieku 33 lat. Po wypłukaniu fragmentu chrząstki zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej był on trawiony przy pomocy 133 U/ml ko-

## Introduction

The restricted capacity of articular cartilage for self repair significantly impedes treatment of damaged cartilage. The clinical need for effective method of therapy of cartilage defects is the important reason of the rapid development of tissue engineering techniques. Biodegradable copolymers of glycolide, L-lactide, ε-caprolactone and trimethylene carbonate (TMC) have been considered to be useful for tissue engineering and as the carriers for controlled release of drugs [1, 2]. These materials must be biocompatible to be well tolerated by the body as well as must support cell adhesion, growth and differentiation [3]. However, traditional methods of their synthesis employ highly toxic tin compounds as initiators of polymerization. Complete elimination of these compounds from the polymers is practically impossible which results in their slow penetration into patients blood circulation system [4]. Moreover, the implant composed of polymeric material may often induce severe inflammatory reaction [5]. The aim of our study was to examine adhesion and growth of human chondrocytes on a set of novel biodegradable materials from copolymers of L-lactide, glycolide, ε-caprolactone and trimethylene carbonate. Their synthesis was carried out with the use of nontoxic zirconium acetylacetonate as an initiator of polymerization.

# Materials and methods

All copolymer samples (TABLE 1) were obtained on the basis of copolymerization procedures described earlier [6]. Briefly, copolymerizations were conducted in bulk in argon atmosphere, comonomers with the  $Zr(acac)_4$  as initiator were charged into glass ampoules and sealed. The ampoules were conditioned in an oil bath equipped with shaker at 120°C.

Molecular weights (Mn) and polydispersity (D) of the copolymers were determined by gel permeation chromatography with a Physics SP 8800 chromatograph. The H-1 (300MHz) and C-13 (75MHz) NMR spectra of the copolymers were recorded with a Varian Unity Inova. Dried DMSO-d<sub>6</sub> or CDCl<sub>3</sub> were used as a solvent. The proton spectra were obtained with a 3.74-s acquisition time, 7µs pulse width and 4.7s delay time between pulses and the carbon spectra with 1.8s the acquisition time, 9 µs pulse width, the delay between pulses 3s.

The obtained copolymers were dissolved in 1,1,1,3,3,3 HFIP (Fluka) to obtain polymer solutions with the same viscosity and used as the polymeric film coating the 96well plates. HFIP alone was added to wells in one row that constituted the control. Then the culture plates were dried under the air atmosphere and under reduced pressure to remove solvent completely and sterilized with exposure to  $\gamma$  irradiation. The cells were isolated from the specimen of cartilage from the nasal septum of thirty three year old patient. Harvested cartilage was washed with the chilled balanced salt solution, diced and incubated in MEM (Minimum Essential Medium, Sigma) with 133 U/ml collagenase and 1 mg/ml hyaluronidase. Isolated cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 10 mM HEPES buffer. To study the cell adhesion, chondrocytes were plated into 96-well plates coated with the uniform thin polymer films and the cells were allowed to attach to the substrates undisturbed in the incubator for 4 hours. Adherent cell number was guantitated by means of CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). The basis for this assay is the use of the green fluorescent dye (CyQUANT GR dye), which exhibits strong fluorescence

lagenazy oraz 1 mg/ml hialuronidazy. Wyizolowane komórki hodowano w pożywce MEM (Minimum Essential Medium, Sigma) zawierającej 10% bydlęcej surowicy płodowej, 100 U/ml penicylinę, 100 µg/ml streptomycynę i 10 mM HE-PES. Hodowlę prowadzono w temp. 37°C, w atmosferze o składzie 95% powietrze/5% CO<sub>2</sub> i o wilgotności 95%. Do oceny adhezji chondrocytów do badanych materiałów wykorzystano test CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). Podstawowym składnikiem tego testu jest barwnik fluorescencyjny (CyQUANT GR), który emituje promieniowanie λ=520nm po związaniu się z kwasami nukleinowymi i wzbudzeniu promieniowaniem  $\lambda$  = 480nm. Do studzienek mikropłytki wprowadzano po 104 komórek w 100µl pożywki, a następnie płytki inkubowano w inkubatorze przez 4 godziny. Następnie studzienki dwukrotnie płukano PBS, płytki zamrażano i aż do wykonania oznaczenia przechowywano w temp. -70°C. Dla oceny szybkości proliferacji chondrocytów na powierzchni badanych materiałów do poszczególnych studzienek mikropłytki wprowadzano po 2×103 komórek zawieszonych w 200µl pożywki. Komórki te hodowano na powierzchni badanych materiałów 4 doby po czym studzienki płukano PBS i zamrażano w temp.-70°C. Liczbę komórek w poszczególnych dołkach określano przy pomocy testu CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit.

### Wyniki i dyskusja

Podczas syntezy poliestrów alifatycznych takich jak polilaktydy, poliglikolid i poli-ɛ-kaprolakton zazwyczaj używa się silnie toksycznych związków cyny jako inicjatorów procesu polimeryzacji [4]. Jednakże, w ostatnich latach podejmowane były próby zastosowania inicjatorów niskotoksycznych takich jak acetyloacetonian cyrkonu [7,8]. Materiały polimerowe syntetyzowane przy pomocy Zr(Acac)<sub>4</sub> charakteryzowały się odpowiednimi właściwościami mechanicznymi oraz szybkością degradacji. Stwierdzono, że na powierzchni kopolimerów L-laktydu, glikolidu i ɛ-kaprolaktonu możliwy był wzrost osteoblastów, fibroblastów i monocytów, przy czym nie obserwowano cytotoksycznego działania powyższych podłoży na te komórki [9, 10,11].

Badania prowadzono na siedmiu materiałach polimerowych: 1) 90:10 poli( $\varepsilon$ -kaprolaktono-ko-glikolid) (PGA10%-PCL90%, Mn = 63.000 Da); 2) 85:15 poli(L-laktydo-ko-glikolid) (LPLA 85% - PGA 15%, Mn = 75.600Da); 3) 70:30 poli(L-laktydo-ko-

ε-kaprolakton) (LPLA 70% -PCL 30%, Mn = 60.300Da); 4) 70:30 poli(L-laktydo-kotrimetylenowęglan) (LPLA 70% - TMC 30%, Mn = 36.000Da); 5) 30:70 poli(Llaktydo-ko-trimetylenowęglan) (LPLA 30% - TMC 70%, Mn = 17.500Da); 6) 30:70 poli(glikolido-ko-trimetylenowęglan) (PGA 30% - TMC 70%, Mn = 6000Da); 7) 50:50 poli(glikolido-ko-trimetylenowęglan) (TMC 50% - PGA 50%, Mn=60000). Ich mikrostrukturę, przedstawioną w TABELI 1, scharakteryzowano na podstawie parametrów wyznaczonych z widm <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, takich jak: średnia długość laktydylowych, glikolidylowych, kaproilowych i węglanowych (odpowiednio - L<sub>LL</sub>,

			_			
No	Kind of copolymer	Mn	D	The aver- age length of blocks	R	T"
1	92%ε-caprolactone / 8% glycolide	63000	2.1	L <sub>GG</sub> = 0.72 L <sub>Cap</sub> = 4.1	1.6	1,07
2	85%L-lactide/ 15% glycolide	75600	2.0	L <sub>LL</sub> = 9.24 L <sub>GG</sub> = 1.63	0.41	0.2
3	75%L-lactide/ 25% ε-caprolactone	60300	2.1	L <sub>LL</sub> = 7.8 L <sub>Cap</sub> = 2.6	0.45	-
4	70%L-lactide/ 30% TMC	36000	2.6	L <sub>LL</sub> = 6.28 L <sub>T</sub> = 2.44	0.5	2.78
5	70% TMC/ 30% L-lactide	17500	2.0	L <sub>T</sub> = 4.11 L <sub>LL</sub> = 1.52	0.57	0.63
6	30% glycolide / 70% TMC	6000	1.5	L <sub>GG</sub> = 2.9 L <sub>T</sub> = 7.64	0.3	-
7	50% glycolide / 50% TMC	60000	2.1	L <sub>GG</sub> = 1.6 L <sub>T</sub> = 1.6	0.94	1.1

TABELA 1. Charakterystyka mikrostruktury badanych kopolimerów.

TABLE 1. Microstructure characteristic of the studied copolymers.



RYS.1. Liczba ludzkich chondrocytów zakotwiczonych na różnych materiałach polimerowych po 4 godzinach inkubacji (kolor szary) oraz po 4 dniach hodowli (kolor czarny). n=18, średnia ± SD, \*P<0,05; (0. Kontrola; 1. PGA10%-PCL90%; 2. LPLA85%-PGA15%; 3. LPLA70%-PCL30%; 4. LPLA70%-TMC30%; 5. LPLA30%-TMC70%; 6. PGA30%-TMC70%; 7. TMC50%-PGA50%) FIG.1. Number of human chondrocytes adhered to the various polymer films after 4h of incubation (grey) and 4 days of culture (black). n=18, mean ± SD, \*P<0,05 compared to control. (0. Control; 1. PGA10%-PCL90%; 2. LPLA85%-PGA15%; 3. LPLA70%-PCL30%; 4. LPLA70%-TMC30%; 5. LPLA30%-TMC70%; 6. PGA30%-TMC70%; 7. TMC50%-PGA50%).

enhancement when bound to cellular nucleic acids. For the assessment of the cell proliferation, cells were seeded into 96-well plates coated with the polymers and cultured for 4 days. Cell number was quantitated using CyQUANT<sup>®</sup> Cell Proliferation Assay Kit

# **Results and discussion**

Synthesis of aliphatic polyesters such as polylactides, polyglycolide and poly- $\epsilon$ -caprolactone usually is carried out with the use of highly toxic tin compounds as initiators

[4]. However, several attempts were recently made to use the initiators of lower toxicity such as zirconium acetylacetonate [7,8]. Polymeric materials synthesized using Zr(Acac), displayed appropriate mechanical properties and degradation rate. Copolymers of L-lactide, glycolide, ε-caprolactone produced using Zr(Acac), appeared to promote the growth and viability of osteoblasts, fibroblasts and monocyte-like cells [9, 10,11]. Different kinds of biodegradable copolymers have been selected to examine their influence to human chondrocytes growth: 1) 90:10 poly(ε-caprolactone-coglycolide) (PGA10%-PCL90%, Mn=63.000); 2) 85:15 poly(L-lactideco-glycolide)(LPLA85%-PGA15%, Mn=75.600); 3) 70:30 poly(L-lactide-co-ɛ-caprolactone)(LPLA70%-PCL30%, Mn=60.300); 4) 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (LPLA70%-TMC30%,

225

226

L<sub>GG</sub>, L<sub>Cap</sub>, L<sub>T</sub>) bloków, procentowej zawartości jednostek
glikolidylowych (F<sub>GG</sub>) lub laktydylowych (F<sub>LL</sub>); współczynnika randomizacji (R) lub transestryfikacji (T<sub>II</sub>).

Jak pokazano na RYS.1, chondrocyty, w ciągu czterogodzinnej inkubacji, ulegały adhezji zarówno do badanych materiałów polimerowych jak i do podłoża kontrolnego (powierzchnia plastiku przepłukana HFIP). Jednakże, liczba komórek na trzech podłożach była istotnie mniejsza niż w kontroli, były to polimery: LPLA 85% - PGA 15%, PGA 30% - TMC 70% i TMC 50% - PGA 50%.

Zwiększona, w stosunku do wyjściowej, liczba komórek po 4 dniach hodowli świadczy o tym, że proliferacja chondrocytów zachodziła na wszystkich badanych podłożach (RYS.1). Generalnie, na powierzchni badanych materiałów komórki wzrastały nieco wolniej niż w kontroli. Istotne statystycznie zahamowanie wzrostu zaobserwowano w przypadku trzech polimerów: LPLA 70% - PCL 30% (3), LPLA 70% - TMC 30% (4), PGA 30% - TMC 70% (7). Interesujący wydaje się fakt, że szybkość proliferacji chondrocytów na powierzchni materiału o składzie: LPLA 85% - PGA 15% nie różniła się istotnie od kontroli pomimo iż adhezja do tego podłoża zachodziła stosunkowo powoli. Niewykluczone, że zjawisko to jest związane ze zwiększoną ekspresją receptorów integrynowych w komórkach inkubowanych na powierzchni tego polimeru. El-Amin i wsp., zaobserwowali zwiększoną ekspresję podjednostek integryn α2, α3, α4, α5, α6 i β1 w ludzkich osteoblastach inkubowanych na podłożu o zbliżonym składzie chemicznym (50:50 poli(L-laktydo-koglikolid) [12].

Jednakże, biorąc pod uwagę różnicę pomiędzy adhezją i proliferacją komórek na powierzchni polimerowej i standardowej hodowlanej powierzchni plastikowej, stwierdzono iż wszystkie badane kopolimery charakteryzowała dobra tolerancja komórkowa i są odpowiednimi materiałami do hodowli ludzkich chondrocytów. Mn=36.000); 5) 30:70 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate)(LPLA30%-TMC70%, Mn=17.500); 6) 30:70 poly(glycolide-co-trimethylene carbonate)(PGA30%-TMC70%, Mn=6000); 7) 50:50 poly(glycolide-co-trimethylene carbonate) (TMC50%-PGA50%, Mn=60000). Their characteristic, conducted on the basis on the parameters determined from <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra as the average length of the lactidyl, glycolidyl, caproyl, carbonate ( $L_{LL}$ ,  $L_{GG}$ ,  $L_{Cap}$ ,  $L_{r}$ , respectively)blocks; the percentage content of glycolide ( $F_{GG}$ ) or lactide ( $F_{LL}$ ); randomization (R) or transesterification ( $T_{\mu}$ ) ratio, is presented in TABLE 1.

As shown in FIG.1, chondrocytes adhered to all the polymer films studied as well as they adhered to the control plastic substrate after 4h of incubation. The number of adherent cells was significantly decreased on solely three polymeric materials: LPLA85%-PGA15%, PGA30%-TMC70% and TMC50%-PGA50%.

The increased cell number on the polymer surfaces at the end of the culture period (4 days) confirmed that proliferation occurred on all the substrates (FIG.1). However, generally on polymer surfaces chondrocytes proliferated slower than on standard cell culture plastic. Significant inhibition of the growth was observed on three materials: LPLA70%-PCL30% (3), LPLA70%-TMC30% (4), PGA30%-TMC70% (7). It could be noted that cell proliferation on LPLA85%-PGA15% did not differ significantly from the control in spite relatively weak adhesion of chondrocytes on that substrate. It could be presumed as a result of increased expression of integrin receptors in cells incubated on that material [12]. However, taking into account the difference between cell adhesion and proliferation on polymer surface and standard

adhesion and proliferation on polymer surface and standard cell culture plastic, it should be noted that all of the studied copolymers are well-tolerated and appropriate for human chondrocytes growth.

### Piśmiennictwo

[1] Kasperczyk J., Stokłosa K., Trzepietowska-Stępień K., Wilczok A., Dobrzyński P., Bero M., Sokół M., Przybyszewski W., Jurkowski M.: Chemik 2, 95 (2006)

[2] Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M.: Biomaterials, 17, 93 (1996)

[3] Di Toro R., Betti V., Spampinato S.: Eur. J. Pharm. Sci. 21, (2004), 161-169.

<sup>1</sup>] Czajkowska B., Dobrzynski P., Bero M. J.: Biomed. Mater. Res. A., 74, (2005), 591-597.

[5] Rotter N., Ung F., Roy A.K., Vacanti M., Eavey R.D., Vacanti C.A., Bonassar L.J.: Tissue Eng., 11, (2005), 192-200

[6] Dobrzyński P., Kasperczyk J.: J. Polym. Sci., 44 (2006), 98 - 114 [7] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Macromolecules, 34, (2001), 5090-5098.

References

[8] Dobrzyński P., Kasperczyk J.: J.Polym.Sci., 44, (2006), 98-114.

[9] Pamuła E., Bačakova L., Buczyńska J., Filova E., Noskova L., Dobrzyński P., Bero M.: Eng. Biomater., 37, (2004), 11-15

[10] Pamuła E., Błażewicz M., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J.: Ann.Transplant., 9, (2004), 64-67.

[11] Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M.:J Biomed Mater Res A., 74, (2005), 591-597.

[12] El-Amin S.F., Attawia M., Lu H.H., Shah A.K., Chang R., Hickok N.J., Tuan R.S., Laurencin C.T.: J. Orthop. Res., 20, (2002), 20-28.

ym. Sci., 44 (2006), 98 ckok N. 20-28.