

BIODEGRADOWALNE PODŁOŻA DO HODOWLI TKANKOWYCH O BIMODALNYM ROZKŁADZIE WIELKOŚCI PORÓW

MARIUSZ GADZINOWSKI, STANISŁAW SOSNOWSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI

CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH I MAKROMOLEKULARNYCH
PAN, UL. SIENKIEWICZA 112, 90-363 ŁÓDŹ

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 118-120]

Alifatyczne, biodegradowalne poliestry kwasów karboksylowych (polilaktyd, poliglikolid, poli(e-kaprolakton), polihydroksymaślan i pochodne kopolimery) są stosowane jako materiały do otrzymywania rusztowań do hodowli komórkowych. Na przydatność poliesterów do wspomnianych powyżej celów wpływa nie tylko ich budowa chemiczna, lecz również struktura w skali submilimetrowej. Najbardziej dogodne wydają się być rusztowania o budowie porowatej zawierającej nie tylko pory o szerokościach przekraczających kilkanaście mikrometrów, w których mogą wzrastać komórki, lecz i pory mniejsze, umożliwiające usuwanie produktów degradacji podłoża akumulujących się wewnątrz litych wstępek poliestrowych [1]. Jednym ze sposobów wytwarzania rusztowań o bimodalnym rozkładzie porów może być konstruowanie z mikrocząstek polimerowych o odpowiedniej wielkości i kształtach. W pracy zaproponowano sposób otrzymywania rusztowań z mikrocząstek poli(L,L-laktydowych otrzymanych podczas dializy roztworu polimeru w rozpuszczalnikach organicznych wobec wody. Podczas powolnej wymiany rozpuszczalnika na wodę wytrącają się mikrocząstki polimeru stabilizowane makrocząsteczkami dodanego terpolimeru blokowego poli(glikol etylenowy)-b-polyglycidol-b-poli(L,L-laktyd). Otrzymane mikrocząstki wykorzystano do wytwarzania porowatych rusztowań, przeznaczonych do hodowli tkankowych, metodą prasowania z NaCl.

Poli(L,L-laktyd) otrzymano metodą polimeryzacji pseudoanionowej inicjowanej triizopropoksyglinem ($Al(O-iPr)_3$) prowadzonej w suchym 1,4-dioksanie [2, 3]. Średni ciężar cząsteczkowy (M_n) poli(L,L-laktydu), oznaczony metodą GPC, wynosił 20 000.

Stabilizator (terpolimer blokowy poli(glikol etylenowy)-b-polyglycidol-b-poli(L,L-laktyd).

Stabilizator zsyntetyzowano metodą żyjącej polimeryzacji anionowej według SCHEMATU 1 [4].

Otrzymywanie mikrocząstek

Poli(L,L-laktyd) rozpuszczono w następujących rozpuszczalnikach: 1,4-dioksan, THF, acetonitryl i DMSO. W każdym przypadku stężenie poli(L,L-laktydu) było równe 1,0%. Do roztworów dodano 0,1% terpolimeru blokowego poli(glikol etylenowy)-b-polyglycidol-b-poli(L,L-laktyd) w charakterze stabilizatora. Roztwory poddano dializie wobec wody w workach dializacyjnych SERVA SpectraPor, MWCO=1000. Mikrocząstki otrzymywane na drodze dializy wydzielano wykorzystując ich sedymentację w polu grawitacyjnym. Obrazy mikrocząstek rejestrowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Jeol 5500 LV.

Zbadano zależność wielkości i kształtu otrzymanych cząstek od rodzaju użytego rozpuszczalnika i stężenia terpoli-

BIODEGRADABLE SCAFFOLDS WITH A BIMODAL PORE SIZE DISTRIBUTION

MARIUSZ GADZINOWSKI, STANISŁAW SOSNOWSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI

CENTER OF MOLECULAR AND MACROMOLECULAR STUDIES,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
SIENKIEWICZA 112, 90-363 LODZ, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 118-120]

Aliphatic, biodegradable polyesters of carboxylic acids (polylactides, polyglycolide, poly(ϵ -caprolactone), polyhydroxybutyrate and related copolymers) have been used as materials for tissue engineering. Suitability of polymers for the mentioned above purposes depends not only on their chemical nature but also on their structure on submillimeter level. Studies of a degradation of polylactide implants shows, that products of degradation accumulate inside solid samples [1]. This causes acceleration of degradation by autocatalysis. Thus, the best scaffolds should be made as porous materials containing not only pores larger than several tenths of micrometers (pores in which cells could grow) but also smaller pores enabling transportation products of the degradation. Such structures could be made by fusing microparticles possessing an appropriate sizes and morphology. In this work we used a poly(L,L-lactide) particles obtained by dialysis of polymer solution in organic solvents against water. During this process particles are formed by polymer precipitation. Poly(ethylene glycol)-b-polyglycidol-b-poly(L,L-lactide) block terpolymer has been used as a stabilizer of particle dispersions. Morphology of formed particles depends on selected solvent. Obtained poly(L,L-lactide) particles were used for construction of scaffolds by simple salt leaching technique.

Poly(L,L-lactide) was synthesized by pseudoanionic polymerization using aluminium triisopropoxide ($Al(O-iPr)_3$) as an initiator and 1,4-dioxane as a solvent [2, 3]. Number averaged molecular weight (M_n) of synthesized poly(L,L-lactide), determined by GPC, was equal 20000 Da.

Stabilizer (block terpolymer poly(ethylene glycol)-b-polyglycidol-b-poly(L,L-lactide) was synthesized by living anionic polymerization as described earlier [4] (SCHEME 1).

Formation of microparticles

Poly(L,L-lactide) was dissolved in THF, acetonitrile, DMSO, DMF, and 1,4-dioxane. In each sample concentration of poly(L,L-lactide) was equal 1.0%. Concentration of poly(ethylene glycol)-b-polyglycidol-b-poly(L,L-lactide) block terpolymer, used as a stabilizer was equal 0.1%. Samples were placed into dialysis tubes (SERVA SpectraPor, MWCO=1000). Obtained particles were isolated by sedimentation. SEM microphotographs of microparticles were recorded using a Jeol 5500 LV apparatus.

Bellow there are SEM microphotographs of particles obtained from solutions in various solvents.

It has been found that morphology of obtained particles strongly depends on the nature of solvent but does not depend on concentration of terpolymer used as a stabilizer. Particles obtained from solutions in 1,4-dioxane were spherical. Dialysis from THF, acetonitrile, and DMSO solutions yielded crystalline microparticles with partially exfoli-

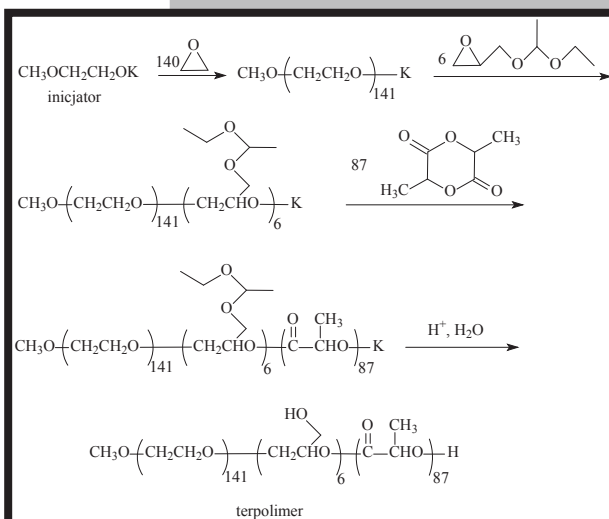
meru. Poniżej pokazano przykłady morfologii cząstek uzyskanych z roztworów w różnych rozpuszczalnikach.

Stwierdzono wyraźną zależność morfologii otrzymanych cząstek od rodzaju rozpuszczalnika. Cząstki otrzymywane na drodze dializy z roztworów w 1,4-dioksanie miały kształt kulisty. Dializa z roztworów w THF, acetonitrylu i DMSO prowadziła do powstawania cząstek pod postacią krystalitów rozwarstwiających się na pojedyncze lamele. Mikrocząstki poli(L,L-laktyd)owe otrzymane stanowiły materiał wyjściowy do otrzymywania rusztowań na drodze tabletkowania w kontrolowanych warunkach.

Wytwarzanie podłoża do hodowli tkankowych

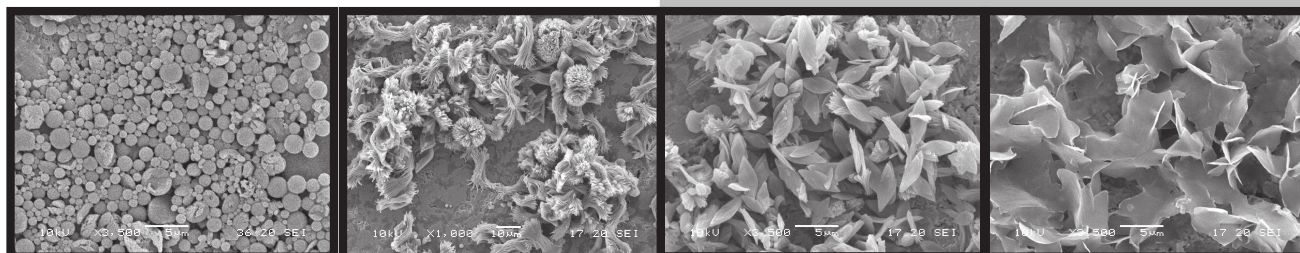
Mikrocząstki polilaktydowe, otrzymane przez dializę roztworu w acetonitrylu wobec wody, mieszano z kryształami NaCl (80-350 mm), umieszczano w cylindrycznej formie (o średnicy 6 mm) i ścisano pod ciśnieniem 10 MPa, w temperaturze 70°C, przez 24 h. NaCl usuwano z tabletek przez kąpiel w dużym nadmiarze wody destylowanej w ciągu 48 godzin. Następnie tabletki przemywano wodą destylowaną, suszono 24 godziny na powietrzu i 4 godziny pod próżnią (<0.01 mmHg).

Powyżej pokazano obrazy SEM ilustrujące szczegóły budowy otrzymanych podłoży. Można zaobserwować obecność porów o wielkości ok. 200-300 mm, dogodnych do za-



SCHEMAT 1.
SCHEME 1.

ated lamellar structures. Poly(L,L-lactide) microparticles have been used as starting material for preliminary studies on formation of scaffolds by pelleting microparticles under controlled pressure. **Formation of scaffolds** Poly(lactide) particles obtained from solution of poly(L,L-lactide) in acetonitrile against water were mixed with NaCl crystals (80-350 mm), placed in cylindrical molding form (diameter equal 6 mm), and pressed under pressure 10 MPa, at temperature 70°C, during 24 h. After that pellets were immersed in large excess of distilled water for 48 h, rinsed using distilled water, and dried 24 h in air, and finally 4 h under high vacuum. Above there are shown SEM microphotographs of various details of obtained scaffolds. Microphotographs show pres-

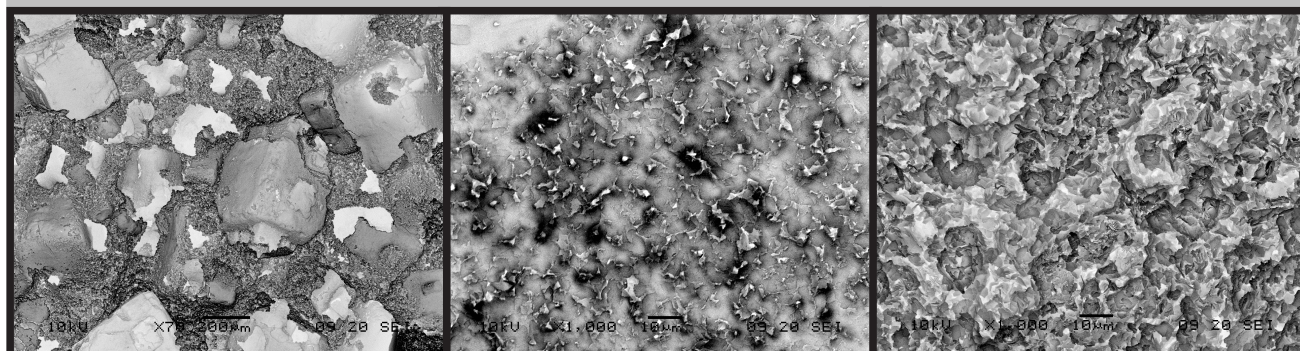


Mikrocząstki otrzymane z roztworu w 1,4-dioksanie.
Particles obtained from 1,4-dioxane solution.

Mikrocząstki otrzymane z roztworu w acetonitrylu.
Particles obtained from acetonitrile solution.

Mikrocząstki otrzymane z roztworu THF.
Particles obtained from THF solution.

Mikrocząstki otrzymane z roztworu w DMSO.
Particles obtained from DMSO solution.



Obraz podłoża otrzymany przy niewielkim powiększeniu pokazujący obecność dużych porów.
Microphotograph at low magnification, showing coarse morphology of scaffold made from poly(L,L-lactide) microparticles.

Obraz ściany dużego poru, w której znajdują się pory o wielkości ok. 1 mm.
Microphotograph of the surface of macropore wall exhibits existence of pores of micrometer sizes.

Obraz przelomu ściany poru pokazujący mikroporowaty charakter materiału.
Microphotograph of the macropore wall fracture shows microporous structure of the scaffold.

siedlenia przez komórki, a także porów o rozmiarach ok. 1 mm, odpowiednich do odprowadzanie produktów degradacji polilaktydu. Opisaną metodą uzyskano całkowitą porowatość przekraczającą 80%. Testy przydatności takich podłoży do hodowli osteoblastów in vitro są w toku.

Podziękowania

Praca była finansowana ze środków KBN, grant 05/PBZ-KBN-082/2002/06.

Piśmiennictwo

- [1] I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert, *Biomaterials*, 16, 305-311 (1995).
 [2] A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules*, 31, 2114-2122 (1998).
 [3] A. Duda, S. Penczek Mechanism of aliphatic polyester formation

WPŁYW TiN NA TWORZENIE BIOFILMU I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ KOMÓREK W WARUNKACH IN VITRO

SOWIŃSKA A.*, ZAJĄCZKOWSKA A.*, CUKROWSKA B.*,
WIERZCHOŃ T.***, SOBIECKI R.***, CZARNOWSKA E.*

*ZAKŁAD PATOLOGII, INSTYTUT -
POMNIK CENTRUM ZDROWIA DZIECKA,
04 - 730 WARSZAWA, AL. DZIECI
POLSKICH 20

** WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
02-507 WARSZAWA, WOŁOSKA 141

[*Inżynieria Biomateriałów*, 38-43, (2004), 120-123]

Wstęp

Struktura i właściwości warstw azotowanych na stopach tytanu zależą od zastosowanej metody i jej parametrów wytwarzania. Warstwy azotowane typu $TiN+Ti_2N+aTi(N)$ uzyskane w warunkach wyładowania jarzeniowego poprawiają odporność na zużycie i korozję stopów tytanu oraz wykazują dobrą biozgodność, co zostało stwierdzone w naszych badaniach [1, 2]. Wydaje się, że warstwy azotowane jarzeniowo wytworzone na implantach tytanowych, biozgodne z kością, pozwoliłyby na długotrwałe przebywanie tych implantów w organizmie. Celem obecnie przeprowadzanych badań była ocena biozgodności TiN z ludzkimi fibroblastami w warunkach in vitro pod kątem rozmieszczenia biofilmu i adhezji komórkowej do próbek oraz aktywności biologicznej zaadherowanych komórek.

Materiały i metody

Wytwarzanie warstwy azotowanej

Próbki ze stopu tytanu Ti6Al4V zostały poddane proce-

ence of big pores appropriate for settlement of cultured cells and small pores across walls facilitating removal of products of degradation of polymeric material from walls. Proposed procedure allowed preparation of scaffolds with total porosity above 80%. In vitro tests of culturing osteoblast cells on these scaffolds are in progress.

Acknowledgements

This work was supported by the State Committee of Scientific Research, grant No. 05/PBZ-KBN-082/2002/06.

References

- in *Biopolymers*, Vol 3b: Polyesters II - Properties and Chemical Synthesis, ed. A. Steinbüchel, Y. Doi, Wiley-VCH, Weinheim 2002, chapter 12, pp 371-430.
 [4] M. Gadzinowski, S. Sosnowski, *J. Polym. Sci, Part A*, 41, 3750-3760 (2003).

THE EFFECT OF TiN ON FORMED BIOFILM AND CELL BEHAVIOR IN VITRO

SOWIŃSKA A.*, ZAJĄCZKOWSKA A.*, CUKROWSKA B.*,
WIERZCHOŃ T.***, SOBIECKI R.***, CZARNOWSKA E.*

*PATHOLOGY DEPT.,
THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,
04- 730 WARSAW, AL. DZIECI POLSKICH 20,
**FACULTY OF MATERIALS SCIENCES AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
02-507 WARSAW, WOŁOSKA 141

[*Engineering of Biomaterials*, 38-43, (2004), 120-123]

Introduction

The method of producing nitrided surface layer, along with the process parameters used have a marked effect on surface properties and characteristic. Nitrided surface layers produced under glow discharge conditions improved wear and corrosion resistance of titanium alloys and exhibit good biocompatibility as have been shown in our studies [1, 2]. This layer might be a candidate for application in long term bone implants. In this study to create a requirement for these applications, we investigated the biocompatibility of TiN using human fibroblasts in term of biofilm morphology, cell arrangement and physiological behavior.

Materials and methods

Nitrided surface layer preparation

Specimens of the Ti6Al4V alloy were subjected to a nitriding process under glow discharge conditions at a temperature of 850°C in an atmosphere of nitrogen and under 4 hPa pressure. Samples were cleaned with ethanol and distilled water and sterilised for one cycle in a plasma - Sterrad 100 apparatus in an atmosphere of H_2O_2 at 54°C for 1 h.

Surface layer characteristics

The surface layers were examined as regards their: