

STRUKTURY POLILAKTYDOWE OTRZYMYWANE NA DRODZE DIALIZY – NOWE MATERIAŁY NA RUSZTOWANIA DO HODOWLI KOMÓRKOWYCH

MARIUSZ GADZINOWSKI, STANISŁAW SOSNOWSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI

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

Alifatyczne, biodegradowalne poliestry kwasów karboksylowych (polilaktyd, poliglikolid, poli(e-kaprolakton), poli-hydroksymaślan i pochodne kopolimery) są stosowane jako materiały do otrzymywania rusztowań do hodowli komórkowych. Na przydatność poliestrów do wspomnianych powyżej celów wpływa nie tylko ich budowa chemiczna lecz również struktura w skali submilimetrowej. Najbardziej dogodnie 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 dogodny transport środków odżywczych do komórek i usuwanie produktów ich metabolizmu. Jednym ze sposobów wytwarzania takich rusztowań może być ich budowa z mikrocząstek polimerowych o odpowiedniej wielkości i kształtach. W pracy zaproponowano sposób otrzymywania cząstek z biodegradowalnego polimeru-poli(L,L-laktydu) metodą dializy, roztworu polimeru w rozpuszczalnikach organicznych, podczas której następuje wymiana rozpuszczalnika na wodę i stopniowe wytrącanie polimeru w postaci cząstek. Jako stabilizatora zawiesiny użyto terpolimeru blokowego poli(glikol etylenowy)-b-poliglicydol-b-poli(L,L-laktyd). Optymalizacja procesu umożliwiła otrzymanie cząstek charakteryzujących się wysoką porowatością, cechą zazwyczaj pożądaną w wypadku podłoża do hodowli komórkowych.

Poli(L,L-laktyd) otrzymano metodą polimeryzacji pseudoanionowej z użyciem triizopropoksyglinu $Al(O-Pr)_3$ jako inicjatora i 1,4-dioksanu jako rozpuszczalnika [1, 2]. Średni ciężar cząsteczkowy (M_n) poli(L,L-laktydu), oznaczony metodą GPC, wynosił 20 000.

Stabilizator (terpolimer blokowy poli(glikol etylenowy)-b-poliglicydol-b-poli(L,L-laktyd)). Stabilizator zsyntetyzowano metodą żyjącej polimeryzacji anionowej według następującego schematu [3] pokazanego obok.

Otrzymywanie mikrocząstek: Poli(L,L-laktyd) rozpuszczono w następujących rozpuszczalnikach: THF, acetonitryl, DMSO, DMF, 1,4-dioksan. W każdym przypadku stężenie poli(L,L-laktydu) było równe 1,0%. Do roztworów dodano w charakterze stabilizatora terpolimer blokowy: poli(glikol etylenowy)-b-poliglicydol-b-poli(L,L-laktyd). Roztwory poddano dializie wobec wody w workach dializacyjnych SERVA SpectraPor, MWCO=1000. Cząstki otrzymywane na drodze dializy wydzielano wykorzystując ich sedymentację w polu grawitacyjnym. Obrazy mikrocząstek rejestrowano stosując skaningowy mikroskop elektronowy Jeol 35C.

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

NEW POLY(L,L-LACTIDE) STRUCTURES OBTAINED BY DIALYSIS – NEW MATERIAL FOR CELL CULTURES

75

MARIUSZ GADZINOWSKI, STANISŁAW SOSNOWSKI, STANISŁAW SOSNOWSKI

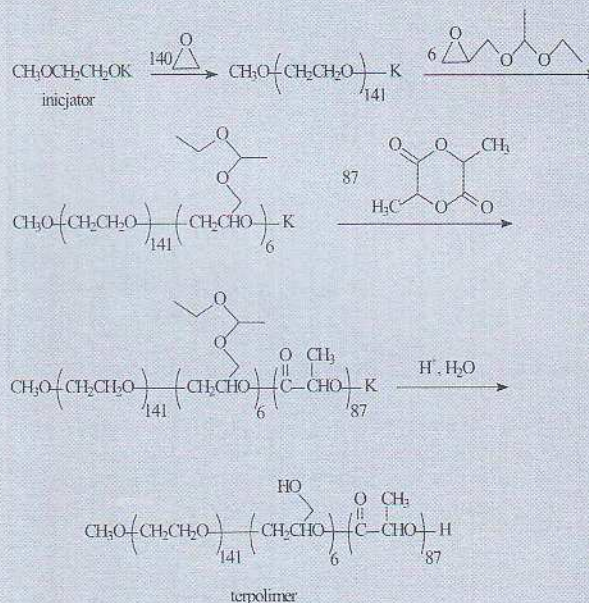
CENTER OF MOLECULAR AND MACROMOLECULAR STUDIES,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES
SIENKIEWICZA 112, 90-363 ŁÓDŹ, POLAND

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. The best scaffolds are made from porous materials containing not only pores larger than several micrometers (pores in which cells could grow) but also smaller pores enabling transportation of nutrients and removal of metabolites. In this paper we propose a new method for obtaining poly(L,L-lactide) particles 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 particle dispersions. Proper selection of solvent and adjustment of polymer concentration allowed obtaining microporous particles, potentially useful as scaffolds for cell cultures.

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

Stabilizer (block terpolymer poly(ethylene glycol)-b-polyglycidol-b-poly(L,L-lactide)) was synthesized by living anionic polymerization as described below:

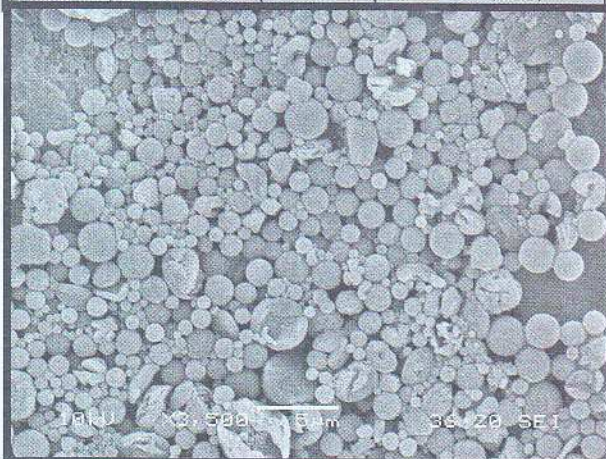
Formation of microparticles: Poly(L,L-lactide) was dis-



meru:

1. Wpływ stężenia terpolimeru na wielkość sferycznych cząstek otrzymanych z roztworu w 1,4-dioksanie. Jedynie z roztworów w 1,4-dioksanie otrzymywano sferyczne cząstki.
2. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na wielkość i kształt otrzymanych cząstek przy stałym stężeniu terpolimeru równym

Symbol próbki Sample code	Stężenie Concentration Poly(L,L-lactide) [%]	Stężenie terpolimeru Stabilizer concentration [%]	Średnica cząstek D_n (wskaznik polidispersyjności D_w/D_n) Particle size D_n (polydispersity D_w/D_n) [μm]
M1	1.0	0.01	1.30 (2.39)
M2		0.02	0.99 (2.72)
M3		0.05	1.35 (1.97)
M4		0.10	1.27 (3.12)
M5		0.20	1.22 (2.41)
M18		1.0	1.27 (1.99)



Przykładowe zdjęcie cząstek (próbka M18) otrzymanych w wyniku dializy z roztworu polimeru w 1,4-dioksanie. Stężenie terpolimeru 1,0%.

SEM micrograph of microparticles (sample M18) obtained from 1,4-dioxane solution. Concentration of terpolymer 1.0%.



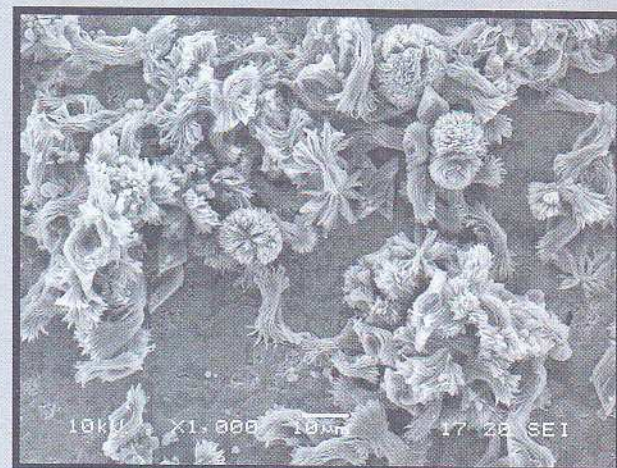
Zdjęcie cząstek otrzymanych w wyniku dializy z acetonitrylu. Stężenie terpolimeru 1,0%.

SEM micrograph of microparticles obtained from acetonitrile. Concentration of terpolymer 1.0%.

solved in THF, acetonitrile, DMSO, DMF and 1,4-dioxane. In each sample concentration of poly(L,L-lactide) was equal 1.0%. Poly(ethylene glycol)-b-polyglycidol-b-poly(L,L-lactide) block terpolymer, used as a stabilizer, was added to each sample. 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 35C apparatus. Relations between size and shape of microparticles and the nature of solvent and polymer concentration were investigated.

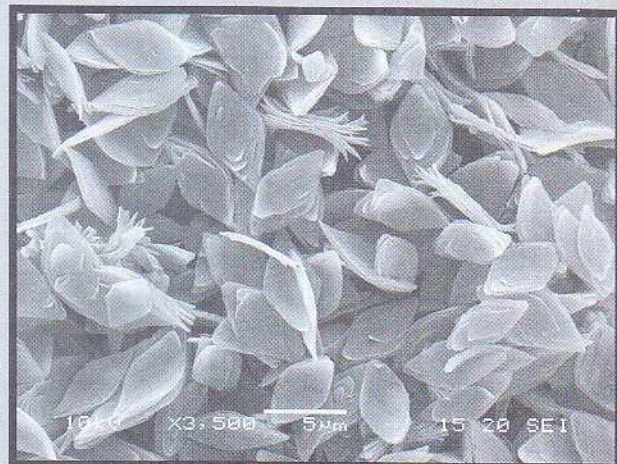
1. Relation between diameters of spherical particles and concentration of terpolymer in 1,4-dioxane. Only from solution in 1,4-dioxane the spherical particles were obtained.
2. Relation between shapes of particles and nature of the solvent. Concentration of stabilizer was equal 0.1% (studies for THF, acetonitrile, DMSO, and DMF 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, DMSO, and DMF yielded crystalline microparticles with partially exfoliated lamellar structures. Poly(L,L-lactide) microparticles have been



Zdjęcie cząstek otrzymanych w wyniku dializy z acetonitrylu. Stężenie terpolimeru 0,1%.

SEM micrograph of microparticles obtained from acetonitrile. Concentration of terpolymer 0.1%.



Zdjęcie cząstek otrzymanych w wyniku dializy z acetonitrylu. Stężenie terpolimeru 0%

SEM micrograph of microparticles obtained from acetonitrile. Concentration of terpolymer

0.1% (zależność badana w THF, acetonitrylu, DMSO, DMF). Stwierdzono wyraźną zależność morfologii otrzymanych cząstek od rodzaju rozpuszczalnika, natomiast wpływ stężenia użytego stabilizatora był znacznie słabszy. Cząstki utrzymywane na drodze dializy z roztworów w 1,4-dioksanie miały kształt kulisty. Dializa z roztworów w THF, acetonitrylu, DMSO, DMF prowadziła do powstawania cząstek pod postacią krystalitów rozwarstwiających się na pojedyncze lamele. Poli(L,L-laktyd)owe mikrocząstki o nieregularnych kształtach stanowiły materiał wyjściowy do otrzymywania rusztowań na drodze tabletkowania w kontrolowanych warunkach.

Podziękowania

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

WYTWARZANIE MAKROKAPSULEK POLIMEROWYCH Z PRZEZNACZENIEM DO HODOWLI KOMÓREK

MAREK KOZICKI*, MAREK KOŁODZIEJCZYK**,
KATARZYNA FILIPCZAK*, PIOTR ULAŃSKI*, IRENEUSZ JANIK*,
JANUSZ MARIAN ROSIAK*

*INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

**KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I TRANSPLANTOLOGICZNEJ,
AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE, UL. NOWOGRODZKA 59

Z chwilą opublikowania pracy na temat wytwarzania hybrydowych struktur, tj. enkapsulacji wysepek Langerhansa w matrycach alginianowych pokrytych poli(L-lizyną) (Lim i Sun, 1980), nastąpił wzrost zainteresowania alternatywnymi metodami leczenia uszkodzonych gruczołów dokrewnych poprzez, np. wszczepianie takich hybrydowych układów. Opublikowano wiele metod wytwarzania hybrydowych struktur zarówno w oparciu o naturalne jak i syntetyczne polimery. W większości przypadków skupiono się na wytwarzaniu hybrydowych mikrokapsulek, makrokapsulek oraz urządzeń typu hollow-fiber.

W naszym zespole opracowane zostały metody wytwarzania struktur zaliczanych do kategorii mikro- i makrokapsulek. Metody te oparte są na konstruowaniu kapsulek poprzez sieciowanie naturalnego polimeru, alginianu sodu, jonami metali dwuwartościowych, przeważnie jonami Ca⁺⁺. Powierzchnia kapsulek może być dodatkowo modyfikowana poprzez pokrywanie polimerami i sieciowanie chemicznie. W innym podejściu stosujemy otaczanie kapsulek dodatkową otoczką alginianową o regulowanej grubości. Wytwarzane otoczki stanowią zarówno wzmocnienie kapsulek jak i regulują transport masy z i do kapsulek. Opracowaliśmy również przyjazną dla komórek metodę pokrywania kapsulek alginianowych niebiodegradowalnymi polimerami w celu stworzenia struktur trwałych w kontakcie z płynami

used as starting material for preliminary studies on scaffolds formation by pelleting microparticles under controlled pressure.

Acknowledgements

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

Piśmiennictwo

References

[1] A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules* 31, 2114-2122 (1998)

[2] A. Duda, S. Penczek *Mechanism of aliphatic polyester formation in Biopolymers, Vol 3b: Polyesters II - Properties and Chemical Synthesis*, ed. A. Steinbüchel, Y. Doi, Wiley-VCH, Weinheim 2002, chapter 12, pp 371-430.

[3] M. Gadzinowski, S. Sosnowski, *J. Polym. Sci, Part A*, in press.

PREPARATION OF POLYMERIC MACROCAPSULES FOR CELL CULTIVATION

MAREK KOZICKI*, MAREK KOŁODZIEJCZYK**,
KATARZYNA FILIPCZAK*, PIOTR ULAŃSKI*, IRENEUSZ JANIK*,
JANUSZ MARIAN ROSIAK*

*INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY, TECHNICAL
UNIVERSITY OF LODZ,

WRÓBLEWSKIEGO 15 ST, 93-590 LODZ, POLAND

**KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I TRANSPLANTOLOGICZNEJ,
AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE,
UL. NOWOGRODZKA 59, WARSAW, POLAND

Since Lim and Sun published their results on hybrid structures preparation i.e. the pancreatic islet encapsulation in the way of crosslinking of sodium alginate and its complexation by poly(L-lysine) (Lim and Sun, 1980), the increased interest in alternative methods of damaged endocrine glands treatment, e.g. by implantation of hybrid structures, has been observed. There have been some methods of the hybrid structures manufacture described basing both on natural and synthetic polymers application. Most of them aim at construction of hybrid microcapsules, macrocapsules and hollow-fibre type devices.

In our group the methods of manufacture of structures that are categorised to micro- and macrocapsules have been developed. These methods are based on crosslinking of natural polymer, sodium alginate, by divalent cations, usually Ca⁺⁺. The surface of capsules can additionally be modified by covering it with the other polymers chemically crosslinked. Another approach is to support the capsules with an alginate cover, which thickness can easily be regulated. The covers are designed to strengthen the fragile capsules and regulate mass transport to and from the capsules. We have also developed cell-friendly method of manufacture of synthetic nonbiodegradable cover of cap-