

MODYFIKACJA CHEMICZNA KOPOLIMERU GLIKOLIDU Z ϵ -KAPROLAKTONEM I JEJ WPŁYW NA ADHEZJĘ I ŻYWOTNOŚĆ FIBROBLASTÓW *IN VITRO*

ELŻBIETA PAMUŁA*, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA**,
ARTUR SZŁĘK*, MAGDALENA CHADZIŃSKA***,
PIOTR DOBRZYŃSKI****, BARBARA PŁYTICZ***

*AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KRAKÓW

**AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO,

WYDZIAŁ ANATOMII, KRAKÓW

***UNIwersytet Jagielloński, Instytut Zoologii, Kraków

****CENTRUM CHEMII POLIMERÓW PAN, ZABRZE

Streszczenie

*W celu poprawienia biogodności kopolimeru glikolidu z ϵ -kaprolaktonem (PGCap) został on zmodyfikowany poprzez inkubację przez różne okresy czasu w roztworze wodnym zasady sodowej. Zastosowana modyfikacja nie wpłynęła na chropowatość powierzchni lecz spowodowała wytworzenie tlenowych grup funkcyjnych, które nadały powierzchni charakter polarny i spowodowały obniżenie hydrofobowości. Badania *in vitro* wykazały lepszą adhezję i żywotność fibroblastów (L929) hodowanych na próbkach modyfikowanych powierzchniowo.*

[Inżynieria Biomateriałów, 58-60, (2006), 24-28]

Wprowadzenie

Jest wiadome, że zarówno budowa chemiczna powierzchni biomateriału jak i jego topografia wpływają na konformację zaadsorbowanych białek substancji międzykomórkowej, co w konsekwencji warunkuje oddziaływania na granicy faz materiał-komórka [1]. Jednymi z ważniejszych parametrów, które wpływają na zgodność komórkową biomateriałów jest hydrofobowość i swobodna energia powierzchniowa. Wykazano, że komórki łatwiej przylegają do powierzchni o umiarkowanej hydrofilowości, niż do powierzchni bardzo hydrofilowych lub bardzo hydrofobowych. Metody modyfikacji powierzchni, które mogą poprawić hydrofilowość polimerów syntetycznych to: modyfikacja plazmą [3], naświetlanie promieniowaniem UV [4], implantacja jonowa [5] i obróbka chemiczna w ciekłych utleniaczach [5].

Ostatnimi czasy resorbowalne poliestry alifatyczne (polilaktydy, poliglikolid, poli- ϵ -kaprolakton i ich kopolimery) są często przetwarzane w postaci trójwymiarowych porowatych rusztowań do hodowli komórek, przeznaczonych do wytwarzania w warunkach *in vitro* sztucznych tkanek i organów [7]. Jedną z największych wad poliestrów alifatycznych jest ich wysoka hydrofobowość, co może pogarszać zgodność komórkową i często uniemożliwia właściwe zwilżanie rusztowania polimerowego pożywką hodowlaną w warunkach *in vitro*. Nasze poprzednie badania wykazały, że przyleganie, proliferacja i żywotność komórek hodowanych na PGCap były znacznie niższe niż na materiałach kontrolnych i innych poliestrach alifatycznych [8-10].

Celem niniejszej pracy było zmodyfikowanie powierzchni kopolimeru glikolidu z ϵ -kaprolaktonem w celu poprawienia jego hydrofilowości, a także zgodności komórkowej. W tym celu, polimer został inkubowany w 0.1M NaOH przez różne okresy czasu i następnie przebadany w warunkach *in vitro* w kontakcie z fibroblastami z linii L929.

CHEMICAL MODIFICATION OF POLY(GLYCOLIDE- ϵ -CAPROLACTONE) AND ITS IMPACT ON ADHESION AND VIABILITY OF FIBROBLASTS *IN VITRO*

ELŻBIETA PAMUŁA*, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA**,
ARTUR SZŁĘK*, MAGDALENA CHADZIŃSKA***,
PIOTR DOBRZYŃSKI****, BARBARA PŁYTICZ***

*AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, KRAKOW, POLAND

**ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, FACULTY OF ANATOMY, KRAKOW, POLAND

***JAGIELLONIAN UNIVERSITY, INSTITUTE OF ZOOLOGY, KRAKOW,

****CENTER FOR POLYMER CHEMISTRY,

POLISH ACADEMY OF SCIENCES, ZABRZE, POLAND

Abstract

*Copolymer of glycolide and ϵ -caprolactone was modified by incubation in aqueous solution of sodium hydroxide for different periods of time in order to improve its biocompatibility. Applied modification did not influence surface roughness but created oxygenated functions, which enhance surface polarity and diminish hydrophobicity. *In vitro* studies showed better adherence and viability of fibroblasts (L929) cultivated on surface-modified samples.*

[Engineering of Biomaterials, 58-60, (2006), 24-28]

Introduction

It is well known that both the chemistry and the topography of biomaterial surface influence cell behaviour through adsorbing extracellular matrix (ECM) proteins and modifying their conformation what, in a consequence, regulate cell-material interactions [1]. Hydrophobicity and surface free energy are very important factors that affect cytocompatibility of biomaterials. It was already shown that cells prefer to attach on surfaces of moderate hydrophilicity than on very hydrophobic or very hydrophilic ones [2]. Many methods such as plasma treatment [3], UV irradiation [4], ion implantation [5] and chemical treatment in liquid oxidisers [6] may affect hydrophilicity of synthetic polymers.

Resorbable aliphatic polyesters (poly lactides, polyglycolide, poly- ϵ -caprolactone and their copolymers) are recently used to fabricate porous scaffolds for three-dimensional cell culture to create *in vitro* artificial tissues and organs [7]. One of the weak points of aliphatic polyesters is their high hydrophobicity, what may deteriorate cytocompatibility and often enables proper wetting with cell culture medium *in vitro*. Our previous studies show that adhesion, proliferation and viability of cells grown on PGCap was significantly lower than on control materials and on other aliphatic polyesters [8,9,10].

The aim of this study was to modify the surface of poly(glycolide- ϵ -caprolactone) (PGCap) in order to improve its hydrophilicity and cytocompatibility. To this end, the polymer was soaked in NaOH for different periods of time and studied *in vitro* in contact with fibroblasts (L929).

Materials and methods

Copolymer of glycolide and ϵ -caprolactone (PGCap)

Materiały i metody

Kopolimer glikolidu i ϵ -kaprolaktonu (PGCap) zsyntezowano z wykorzystaniem $Zr(acac)_4$ [11]. Z badań NMR wynikało, że stosunek molowy glikolidu do kaprolaktonu w kopolimerze wynosił 9:91. Liczbowo-średnia masa cząsteczkowa M_n , wynosiła 53.4 kDa, a współczynnik polidispersji d , wynosił 1.9. Folie polimerowe odlano z roztworu PGCap (10% w/v) w chlorku metylenu (POCh, Gliwice). Folie o masie 0,2 g inkubowano 0,1M NaOH (POCh, Gliwice) przez 2, 6, 16 i 24 h w temperaturze pokojowej. Po modyfikacji folie intensywnie płukano w wodzie ultraczystej (UHQ, oczyszczanej przez UHQ-PS, Elga, Wielka Brytania) w płucze ultradźwiękowej (Sonic3, Polsonic, Polska). Efektywność płukania sprawdzano mierząc pH i przewodnictwo wody UHQ przed i po kontakcie ze zmodyfikowanymi foliami.

Zwilżalność folii wodą (UHQ) i diodometanem (Aldrich) mierzono metodą kropli za pomocą analizatora kształtu kropli (DSA 10Mk2, Kruss, Niemcy). Energię powierzchniową obliczono według przybliżenia Owens–Wendt–Rabel–Kaelble [12]. Topografię powierzchni analizowano za pomocą mikroskopu sił atomowych (Explorer, Veeco, USA) w trybie kontaktowym. Chropowatość powierzchni wyznaczono za pomocą oprogramowania SPM LAB 5.01. Obecność grup funkcyjnych na powierzchni folii polimerowej oceniono za pomocą spektroskopii w podczerwieni FTIR-ATR (FTS Digilab 60, BioRad).

Dla celów hodowli komórkowych, folie o średnicy 14 mm przemyto w 70% etanolu, wyjałowiono pod lampą UV przez 1 h z każdej ze stron i umieszczono w 24-dołkowych płytkach hodowlanych (Nunc, Dania). Zawiesinę fibroblastów L929 (gęstość komórek 3×10^4 komórek/ml) w pożywkę hodowlaną RPMI 1640 (Sigma, Niemcy) zawierającej 10% celułej surowicy płodowej (ICN, Niemcy) i antybiotyki (100 UI/ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny i 25 μ g/ml amfotericyny, Sigma, Niemcy) osadzono na każdej próbce i na szkiełkach nakrywkowych (Greenpol, Polska) stanowiących kontrolę. Komórki hodowano przez 3 dni w inkubatorze (Nuair, USA) w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO_2 .

Morfologię komórek przylegających do podłoża oceniano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (JSM 5410, JEOL, Japonia) przy powiększeniu 2000 razy. Przed analizą komórki utrwalono w 2,5% aldehydzie glutarowym (Sigma, Niemcy), odwodniono w serii etanolowej, wysuszono w punkcie krytycznym CO_2 (Critical Point Research Industries LADD, USA) i napyłono cienką warstwą złota (JEOL JFC – 1100E, Japonia).

Przyleganie komórek badano za pomocą testu wchłaniania fioletu krystalicznego (CV). Po przepłukaniu próbek w soli fizjologicznej (PBS), przylegające komórki utrwalono w 2% formalinie (POCh, Gliwice) przez 1 h w 21°C i wybarwiono przez 5 min w 0,5 ml fioletu krystalicznego (0,5% w 20% metanolu). Po przepłukaniu wodą, próbki przeniesiono do nowej 24-dołkowej płytki hodowlanej i wyekstrahowano zaabsorbowany barwnik w 1 ml 100% metanolu (POCh, Gliwice). Następnie mierzono gęstość optyczną (O.D.) dla długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru Expert Plus (Asys Hitach, Austria). Żywotność komórek określono za pomocą testu MTT. Do każdego dołka dodano 100 μ l wodnego roztworu MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, Niemcy) o stężeniu 5mg/ml. Po 1-godzinnej inkubacji w ciemności w 37°C reakcję zatrzymano poprzez dodanie 1 ml izopropanolu zawierającego 3% HCl (POCh, Gliwice). Płytkę wytrząsano na wyrząsarce (Elpan, Poland) przez 30 min. Następnie mierzono gęstość optyczną (O.D.) dla długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru Expert Plus (Asys Hitach, Austria).

was synthesised with the use of $Zr(acac)_4$ [11]. Molar ratio of glycolide to ϵ -caprolactone in copolymer was 9:91, as studied by NMR. Number-average molecular mass, M_n , was 53.4 kDa, while polydispersion index, d , was 1.9. Polymeric foils were obtained by solvent casting method from 10 w/v copolymer solution in methylene chloride (POCh, Gliwice, Poland). Polymeric foils (0.2 g) were soaked in 10 ml of 0.1 M NaOH (POCh, Gliwice, Poland) for 2, 6, 16 and 24 h at room temperature. After modification the foils were extensively washed in UHQ water (produced by UHQ-PS apparatus Elga, Great Britain), followed by washing in the ultrasound bath (Sonic3, Polsonic, Poland). Effectiveness of washing was checked by pH and conductivity measurements of UHQ water before and after contact with modified foils.

Wettability of foils was measured by sessile drop with the use of drop shape analysis system (DSA 10Mk2, Kruss, Germany) using water (UHQ) and diodomethane (Aldrich). Surface free energy was calculated according to Owens–Wendt–Rabel–Kaelble approach [12]. Surface topography was studied by atomic force microscopy (Explorer, Veeco, USA) in contact mode. Based on SPM LAB 5.01 software surface roughness was also calculated. Chemical surface functionalities were evaluated by infrared spectroscopy (FTIR-ATR, FTS Digilab 60, BioRad).

For cell culture studies, the foils were washed in 70% ethanol and sterilized under UV lamp for 1 h from both sides and placed into the 24-well culture dishes (Nunc, Denmark). A suspension of L929 fibroblasts in RPMI 1640 (Sigma, Germany) containing 10% foetal bovine serum (ICN, Germany), and antibiotics (100 UI/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin and 25 μ g/ml amfotericin, Sigma, Germany) was seeded on each sample and on control glass coverslips (cell density 3×10^4 cells/ml). The cells were cultured at 37°C in an incubator (Nuair, USA) with humidified 5% CO_2 atmosphere for 3 days.

The morphology of adhered cells was evaluated with scanning electron microscopy (SEM, JSM 5410, JEOL, Japan) under magnification of 2000 times. Before analysis the cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma, Germany), dehydrated in graded ethanol series, dried in CO_2 at critical point (Critical Point Research Industries LADD, USA), and finally sputter coated with a thin gold layer (JEOL JFC – 1100E, Japan).

The adhesion of cells was measured by crystal violet test (CV). The foils were rinsed with saline (PBS), fixed in 2% formalin (POCh, Gliwice, Poland) for 1 h at 21°C and stained with 0.5 ml of crystal violet (0.5% in 20% methanol) for 5 min. After washing with water the foils were transferred to new 24-well dishes and dried in air. Then, absorbed stain was extracted in 1 ml of 100% methanol (POCh, Gliwice, Poland). Finally, the optical density (O.D.) was measured at 570 nm with an Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitach, Austria). Moreover, the aspiration of dye by materials themselves was measured.

The viability of cells was estimated by MTT assay. For each well 100 μ l of 5 mg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, Germany) water solution was added. After 1 h incubation in the dark at 37°C the reaction was stopped by pouring 1 ml of isopropanol containing 3% of HCl (POCh, Gliwice, Poland) and the dish was put on a shaker (Elpan, Poland) for 30 min. Finally, the optical density (O.D.) of formazan in the solution was measured at 570 nm with an Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitach, Austria).

Results and discussion

TABLE 1 presents the water contact angle, dispersive and polar surface free energies as well average surface

t [h]	Θ [°]	γ_d [mJ/m ²]	γ_p [mJ/m ²]	R_a [nm]
0	79.9 (2.0)	47.4 (0.8)	3.4 (0.1)	103 (16)
2	71.9 (2.2)	47.9 (0.5)	4.6 (0.2)	117 (19)
6	66.9 (1.8)	47.1 (0.6)	6.8 (0.2)	129 (31)
16	60.2 (1.6)	47.4 (1.0)	9.8 (0.2)	116 (10)
24	53.2 (4.3)	44.4 (0.7)	14.4 (0.5)	134 (25)

t–modification time / czas modyfikacji, Θ –water contact angle / kąt zwilżania wodą, γ_d –dispersive part of surface free energy / składowa dyspersyjna energii powierzchniowej, γ_p –polar part of surface free energy / składowa polarna energii powierzchniowej, R_a –average roughness / średnia chropowatość

TABELA 1. Właściwości powierzchniowe PGCap w funkcji czasu modyfikacji w 0,1 M NaOH (średnia i odchylenie standardowe w nawiasach).

TABLE 1. Surface properties of PGCap as a function of modification time in 0.1 M NaOH (average and standard deviation in brackets).

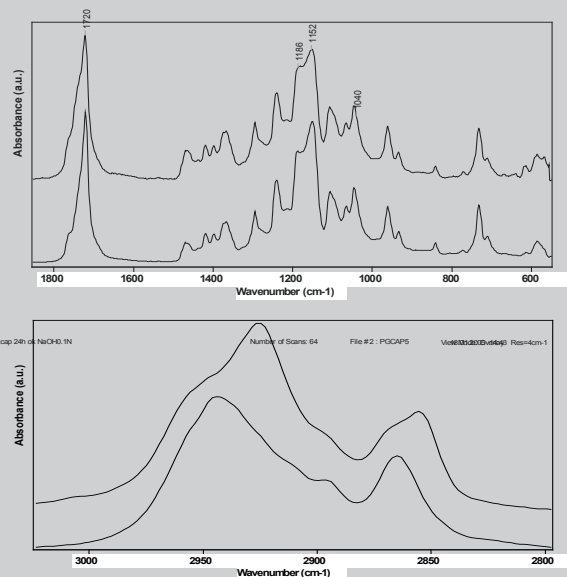
Wyniki i dyskusja

W TABELI 1 zestawiono wyniki kąta zwilżania, składowej polarnej i dyspersyjnej energii powierzchniowej, a także średnią chropowatość powierzchni folii PGCap przed i po modyfikacji w 0,1 M NaOH. Zastosowana modyfikacja powoduje spadek kąta zwilżania i wzrost składowej polarnej swobodnej energii powierzchniowej. Interesujące jest, że składowe dyspersyjne wszystkich próbek, z wyjątkiem modyfikowanej NaOH przez 24h, były do siebie zbliżone.

RYS.1 przedstawia widma FTIR folii PGCap przed i po modyfikacji w 0,1 M NaOH przez 24h. W widmie przed modyfikacją widoczne są następujące pasma: w zakresie 2800-3000 cm⁻¹ od drgań rozciągających grup CH₂ i CH₃, pasmo w położeniu 1700 cm⁻¹ od drgań rozciągających grup C=O, pasma w zakresie 1100-1200 cm⁻¹ od drgań rozciągających grup C-O i C-O-C i pasma w zakresie 400-1500 cm⁻¹ przypisywane drganiom deformacyjnym CH₂ i CH₃. Pasma te są charakterystyczne dla poliestrów alifatycznych [13]. Po modyfikacji w NaOH przez 24 h, w widmie FTIR można zauważyć zmiany położenia i szerokości połowkowych pasm przypisywanych drganiom grup: C=O, C-O i C-O-C. Ponadto pasma w zakresie 2800-3000 cm⁻¹ przypisywane drganiom grup CH₂ i CH₃, a także drganiom grup OH z kwasów karboksylowych zmieniają swój kształt i przesuwają się w kierunku niższych liczb falowych [14]. Wyniki te oznaczają, że obróbka w NaOH powoduje utlenianie i hydrolizę wiązań poliestrowych w PGCap, co w konsekwencji powoduje wzrost polarności i poprawia zwilżalność powierzchni.

RYS.2 przedstawia obrazy topograficzne uzyskane za pomocą mikroskopu sił atomowych powierzchni PGCap przed i po modyfikacji w NaOH. Na powierzchni PGCap występują regularne struktury typowe dla polimerów semikrystalicznych, nazywane sferolitami [RYS.2a]. Sferolity zbudowane są z krystalicznych lamelli, które są lepiej widoczne przy mniejszych obszarach skanowania. Badania AFM wykazują, że ciekły utleniacz wytrawia preferencyjnie obszary amorficzne pomiędzy sferolitami, co sprawia, że krystaliczne lamelle i sferolity są lepiej wyeksponowane [FIG. 2b]. Jednakże, obróbka w NaOH praktycznie nie wpływa na chropowatość powierzchni PGCap [TABELA 1].

Na RYS.3 przedstawiono obrazy SEM fibroblastów L929 hodowanych na foliach PGCap modyfikowanych



RYS.1. Widma FTIR-ATR folii PGCap przed (0h) i po (24h) modyfikacji w 0,1 M NaOH w zakresie 600-1800 cm⁻¹ (a) i 2800-3200 cm⁻¹ (b).

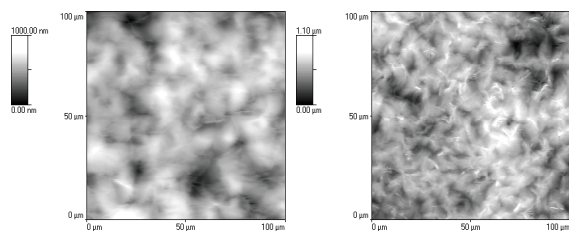
FIG.1. FTIR-ATR spectra of PGCap foils before (0h) and after 24h modification in 0.1 M NaOH in the range 600-1800 cm⁻¹ (a) and 2800-3200 cm⁻¹ (b).

roughness of PGCap foils modified with 0.1 M NaOH for different periods of time. Applied modification caused decrease in contact angle and increase in polar part of surface free energy. Interestingly, dispersive part of surface free energy was similar for all the samples and did not change during modification time, except for the sample treated with NaOH for 24 h.

FIG.1 presents FTIR spectra of PGCap foils before and after 24h modification in 0.1 M NaOH. In the spectrum of PGCap before modification the following bands are visible: in the range 2800-3000 cm⁻¹ from CH₂ and CH₃ stretching, a band at 1700 cm⁻¹ from C=O stretching, bands in the range 1100-1200 cm⁻¹ from C-O and C-O-C stretching and bands the range 400-1500 cm⁻¹ attributed to deformational CH₂ and CH₃. Those bands are characteristic for aliphatic polyesters [13]. After 24-hour modification in NaOH in the FTIR spectrum changes in the shape of the bands attributed to C=O, C-O and C-O-C vibrations are observed. Moreover, the bands in the range 2800-3000 cm⁻¹ attributed to CH₂ and CH₃, as well to OH from carboxylic acids change their shape and shift towards lower wavenumbers [14]. The results mean that NaOH treatment causes oxidation and hydrolysis of polyester bonds in PGCap, what in turn increases surface polarity and improves wettability.

FIG.2 presents AFM scans of PGCap surface before and after 24 h modification in NaOH. On the surface of PGCap regular structures typical of semicrystalline polymers, called spherulites, are present [FIG.2a]. Spherulites consist of crystalline lamella, which are better visible for smaller scan areas (data not presented). AFM studies show that liquid oxidizer preferentially etches amorphous areas of PGCap, situated between spherulites, what results in better exposition of crystalline lamella and spherulites [FIG. 2b]. However, treatment in NaOH practically does not influence surface roughness of PGCap [TABLE 1].

FIG.3 presents SEM pictures of L929 fibroblasts grown on PGCap foils modified with NaOH for different periods of time. The cells on the initial PGCap and that modified for 2 h are round and adhere to the surface with relatively small area. The cells on PGCap modified for 6, 16 and 24h are

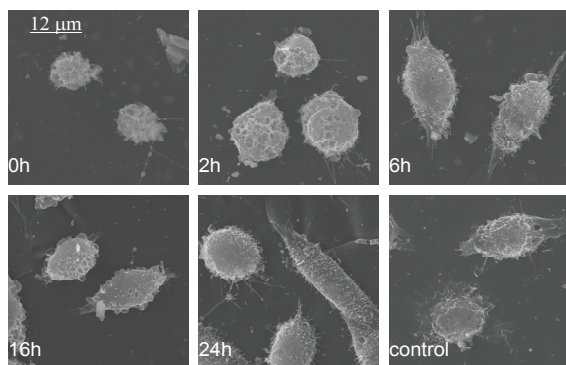


RYS.2. Obrazy topograficzne AFM PGCap przed i po modyfikacji w 0.1 M NaOH przez 24h.
FIG. 2. AFM topography images of PGCap before and after modification for 24 h in NaOH.

NaOH przez różne okresy czasu. Komórki na wyjściowym i modyfikowanym przez 2 h PGCap są okrągłe i przylegają do powierzchni stosunkowo małą powierzchnią. Komórki na foliach modyfikowanych przez 6, 16 i 24 h są bardziej spłaszczone, okrągłe i/lub o kształcie wielokątów. Niektóre z komórek mają wyształcone pseudopodia.

RYS. 4 przedstawia wyniki badań za pomocą dwóch testów: wchłaniania fioletu krystalicznego i redukcji MTT. Test wchłaniania fioletu krystalicznego jest wykorzystywany do oceny przylegania komórek na powierzchni biomateriałów [15]. Test redukcji MTT ocenia żywotność komórek poprzez oznaczenie aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych [16]. Badania wykazały, że zastosowana modyfikacja poprawia istotnie przyleganie komórek do powierzchni w porównaniu z kontrolą. Należy podkreślić, że sama folia PGCap wchłania barwnik, a jego ilość wzrasta wraz z czasem modyfikacji. Może to świadczyć, że NaOH modyfikuje nie tylko powierzchnię ale i wewnątrz materiału.

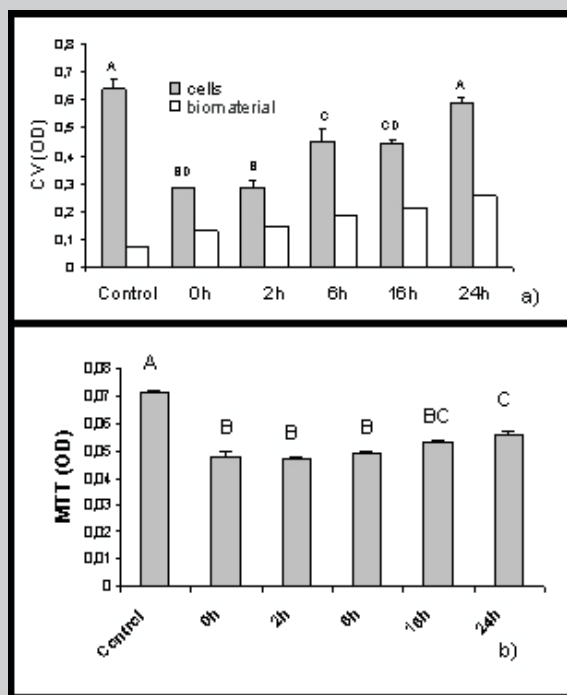
Podsumowując, obróbka w zasadzie sodowej jest metodą, która efektywnie poprawia zwilżalność kopolimeru glikolidu z ϵ -kaprolaktonem, co w konsekwencji wpływa korzystnie na przyleganie i żywotność fibroblastów.



RYS.3. Obrazy SEM fibroblastów L929 hodowanych na PGCap bez modyfikacji (0h) i modyfikowanych w 0,1 M NaOH przez 2, 6, 16 i 24 h i na kontrolnych szkiełkach nakrywkowych.
FIG.3. SEM pictures of L929 fibroblasts grown on PGCap without modification and modified in 0.1M NaOH for 2, 6, 16 and 24 h and on control glass coverslips.

Podziękowania

Praca była finansowana z projektów badawczych 3 T08D01928 i DS773/IZ/ZIE/UJ/2006. Autorzy dziękują Pani Zuzannie Banach (Katedra Histologii i Cytologii, UJ) i Pani Dr Czesławie Paluszkiwicz (Wydział IMiC, AGH) za pomoc odpowiednio: przy badaniach SEM i FTIR.



RYS.4. Adhezja wyznaczona metodą fioletu krystalicznego (a) i żywotność oznaczona testem MTT (b) fibroblastów L929 hodowanych na PGCap bez modyfikacji i modyfikowanych w 0,1 M NaOH i na kontrolnych szkiełkach nakrywkowych. O.D. – gęstość optyczna. Wartości z takimi samymi cyframi (np. A vs. A) nie są różne statystycznie, wartości z różnymi cyframi (np. A vs. B) różnią się statystycznie ($p < 0,05$).

FIG.4. Adhesion by crystal violet (a) and viability by MTT test of L929 fibroblasts grown on PGCap without modification and modified in 0.1 M NaOH and on control glass coverslips. O.D. – optical density. Values sharing letters (e.g. A and A) are not significantly different while values with different letters (e.g. A vs B) vary significantly ($p < 0.05$).

better spread, round and/or polygonal in shape. Some of the cells develop pseudopodia.

FIG.4. presents the result of crystal violet and MTT tests. Crystal violet is a method to evaluate cell adhesion on biomaterial surface [15], while MTT assesses viability of cells by measurement of activity of mitochondrial dehydrogenases [16]. The results show that applied modification considerably improves adhesion of cells in comparison with control. Interestingly, aspiration of dye by the biomaterial itself is considerable and increases with modification time. It may suggest that NaOH modifies not only the surface but also the whole material.

In conclusion, sodium hydroxide treatment is a very effective method to improve wettability of poly(glycolide- ϵ -caprolactone), what ultimately enhances adhesion and viability of fibroblasts.

Acknowledgements

This study was supported by research grants 3 T08D 019 28 and DS/IZ/ZIE/UJ/2006. The authors wish to express their thanks to Zuzanna Banach (Dept. Histology and Cytology, Jagiellonian University) and Dr. Czesława Paluszkiwicz (AGH, Fac. Mater. Sci. and Ceramics) for their help during SEM and FTIR analyses, respectively.

Piśmiennictwo

- [1] K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios, An introduction to tissue-bio-material interactions, Wiley USA, 2002, 149-172.
 [2] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Shen, *Biomaterials* 24, 2003, 3725-3730.
 [3] E. Pamuła, V. De Cupere, Y.F. Dufrene, P.G. Rouxhet, *J Coll Interf Sci* 271, 2004, 80-91.
 [4] H. Kaczmarek, J. Kowalonek, A. Szalla, A. Sionkowska, *Surf Sci* 507-510, 2002, 883-888.
 [5] H. Tsuji, H. Satoh, S. Kieda, S. Ikemura, Y. Gotom, J. Ishikawa, *NIM B* 148, 1999, 1136-1140.
 [6] G.E. Park, A. Pattison, K. Park, T.J. Webster, *Biomaterials* 26, 2005, 3075-3082.
 [7] A. Atala, R. Lanza, *Methods of tissue engineering*, Academic Press, Elsevier, 2002, 619-627.
 [8] E. Pamuła, L. Bacakova, J. Buczyńska, E. Filova, L. Noskova, P. Dobrzyński, M. Bero, *Eng Biomat (Inż Biomat)* 37, 2004, 14-17.

References

- [9] B. Szot, M. Chadzińska, E. Pamuła, E. Menaszek, B. Płytycz, Effects of the resorbable polymers on activity of L929 mouse fibroblasts, *Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism*, Edited by Henryk Lach, Cracow 2005, 489-491.
 [10] M. Chadzińska, E. Pamuła, M. Kretek, J. Krawców, B. Płytycz, *Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism*, Edited by Henryk Lach, Cracow 2006, 88-90.
 [11] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero, *Macromolecules* 34, 2001, 5090-5098.
 [12] D.K. Owens, R. C. Wendt, *J Appl Polym Sci* 13, 1969, 1741.
 [13] E. Pamuła, M. Błażewicz, C. Paluszkiwicz, p. Dobrzyński, *J Mol Str* 596, 2001, 69-75.
 [14] R.T. Morrisom, R.N. Boyd, *Organic Chemistry (Polish Ed)*, vol 1, PWN, Warszawa, 1994, 980-990.
 [15] B. Płytycz, M. Różanowska, R. Seljelid, *Folia Biol* 40, 1992, 3-9.
 [16] K. Berg, M.B. Hansen, S.E. Nielsen, *APMIS* 98, 1990, 156-62.

OCENA WIELOFUNKCYJNEGO STABILIZATORA MIĘDZYWYROSTKOWEGO TYPU „NON-FUSION”; BADANIA NA ZWIERZĘTACH - KOZY

J.STERNA*, L.F. CIUPIK**, J. CHŁOPEK***, A. DOBKIEWICZ****, A. KIERZKOWSKA*****, J. PIENIAŻEK*****

* KAT. CHIRURGII ZWIERZĄT, SGGW, W-WA

**CENTRUM BADAWCZO-ROZWOJOWE IBME/LFC, ZIELONA GÓRA

***WYDZ. INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ AGH, KRAKÓW

****KAT. I ODDZ. KLINICZNY NEUROCHIR. I NEUROTRAUMAT.

ŚL.AM, BYTOM

*****CBR IBME/LFC I UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI, ZIELONA GÓRA

Słowa kluczowe: implant kręgosłupowy, stabilizacja międzywyrastkowa, „non fusion”, dynamiczna, badania biomechaniczne, badania na zwierzętach. *[Inżynieria Biomateriałów, 58-60, (2006), 28-31]*

Wprowadzenie

Każde wprowadzenie do praktyki medycznej nowego wyrobu wymaga interdyscyplinarnego /wszechstronnego podejścia. Tylko zbiorcza analiza wyników: w zakresie inżynierskim, laboratoryjnym-bioinżynierskim, badań *in vitro* i *in vivo* na zwierzętach oraz badań klinicznych wraz z przeprowadzoną analizą ryzyka daje możliwość podjęcia decyzji o wprowadzeniu wyrobu medycznego do użycia przy akceptowalnym (zminimalizowanym) poziomie zagrożenia. Praktyka medyczna zna różnorodne systemy międzywyrastkowe pochodzenia zagranicznego [1-3], często o ograniczonym stosowaniu z powodu niedogodności instalacyjno-konstrukcyjnych i funkcjonalnych.

Badania wyrobów wszczepialnych na zwierzętach opisywane w literaturze dotyczą zwykle szczurów lub królików [4-5] lub do eksperymentów wykorzystywane są kozy [6-7].

Wśród dostępnych zwierząt do oceny pierwszego polskiego wszczepu międzywyrastkowego rozszerzającego

EVALUATION OF MULTIFUNCTIONAL INTERSPINOUS STABILIZER „NON-FUSION” TYPE; TESTS ON ANIMALS - GOATS

J.STERNA*, L.F. CIUPIK**, J. CHŁOPEK***, A. DOBKIEWICZ****, A. KIERZKOWSKA*****, J. PIENIAŻEK*****

* CHAIR OF ANIMAL SURGERY, SGGW, WARSAW

** RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER LFC, ZIELONA GÓRA

***DEPARTMENT OF MATERIAL ENGINEERING AGH, KRAKÓW

****CHAIR AND CLINICAL DEP. OF NEUROSURGERY AND NEUROTRAUMATOLOGY, SILESIAN MEDICAL ACADEMY, BYTOM

***** RESEARCH&DEVELOPMENT CENTER LFC, UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA, ZIELONA GÓRA

Key words: spinal implant, interspinous stabilizer, „non-fusion”, dynamic, biomechanic tests, tests on +animals.

[Engineering of Biomaterials, 5860, (2006), 28-31]

Introduction

Every introduction of new device into medical practice requires interdisciplinary/comprehensive approach. Only cumulative analyze of results: engineering, laboratory-bioengineering range, *in vitro* and *in vivo* test on animals and clinical studies together with performed risk analysis provides the possibility of taking decision regarding introduction of the medical device in use taking into consideration acceptable (minimized) level of thread. Medical practice knows different interspinous systems of abroad origin [1-3], often of limited use because of inconveniences related to installation-construction and functionality. Investigations of medical implantation devices on animals described in literature usually are connected with rats or rabbits [4-5] or for experiments goats are used [6-7].

Among available animals for evaluation of the first Polish interspinous implant, which extends possibilities of treatment of lumbar spine dysfunctions (mainly pain), goats were selected because of their accessibility, liveliness, anatomic