

.....

## WPŁYW WIELKOŚCI PORÓW RESORBOWALNYCH GĄBEK PGLA NA ODPOWIEŹ TKANKOWĄ. BADANIA IN VIVO

ELŻBIETA MENASZEK\*, ELŻBIETA PAMUŁA\*\*

\*UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM,  
ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII,  
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW.

\*\*AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW.

*[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),221-223]*

### Wstęp

Biomateriały polimerowe wykorzystuje się w medycynie od ponad 50 lat. Jedną z grup polimerów biomedycznych są resorbowalne poliestry alifatyczne (poli- $\alpha$ -hydroksykwasy), do których zaliczany jest kopolimer glikolidu z L-laktydem (PGLA). W środowisku tkankowym PGLA jest rozkładany z wytworzeniem nietoksycznych związków: kwasu glikolowego i mlekowego. Produkty te poprzez cykl Krebsa są usuwane z organizmu w postaci dwutlenku węgla i wody. Zastosowanie trójwymiarowych, porowatych rusztowań zasiedlonych komórkami, wszczepianych w miejsce ubytku tkankowego, stwarza dogodne warunki dla odbudowy tkanki. Porowate implanty - gąbki mają za zadanie wspierać trójwymiarowe formowanie tkanki [1]. Hodowlę komó-

## THE EFFECT OF PORE SIZE OF RESORBABLE PGLA FOAMS ON THE TISSUE RESPONSE. IN VIVO STUDY

ELŻBIETA MENASZEK\*, ELŻBIETA PAMUŁA\*\*

\*JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,  
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY,  
9 MEDYCZNA ST., 30-068 KRAKÓW.

\*\*AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 KRAKÓW.

*[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),221-223]*

### Introduction

Polymeric biomaterials have been used in medicine for more than 50 years. Among the biomedical polymers there is a family of resorbable aliphatic polyesters (poly- $\alpha$ -hydroxyacids) to which the copolymer of glycolide and L-lactide (PGLA) belongs. In vivo PGLA is degraded into non-toxic compounds: lactic and glycolic acid. Degradation products of PGLA are removed from the body via normal metabolic pathways (Crebs cycle) in the form of carbon dioxide and water. The use of three-dimensional scaffolds settled with cells and next implanted into the place of tissue loss creates good conditions for the tissue regeneration. The aim of porous implants - foams is to support the three-dimensional tissue formation [1]. The culture of cells is started

rek rozpoczyna się na porowatej strukturze w warunkach in vitro i przenosi utworzony konstrukt w miejsce ubytku tkankowego. Dla prawidłowego rozwoju tkanki niezbędny jest właściwy rozmiar i ciągłość porów, które umożliwiają kontakt komórek, dyfuzję składników odżywczych i metabolitów oraz prawidłową angiogenezę. W miarę rozwoju nowej tkanki implant ulega stopniowej degradacji [2].

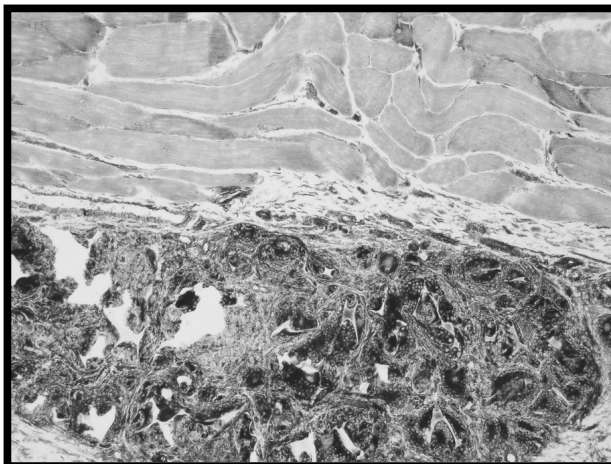
Celem pracy było określenie, jak mikrostruktura otrzymanych podłoży, a w szczególności wielkość porów, wpływa na proces regeneracji tkanek w warunkach in vivo.

## Metody

Bioresorbowalne gąbki z PGLA zsyntezowanego wg metody opisaną poprzednio [3], o różnym rozmiarze porów, otrzymano metodą odlewania z roztworu i wypłukiwania cząsteczek [4]. Jako porogenu użyto ziaren chlorku sodu (rozmiar  $200 \pm 40$  mm) i cytrynianu sodu (rozmiar  $600 \pm 100$  mm). Przy różnym rozmiarze porów, całkowita objętość porów była taka sama dla obu gąbek [5]. Eksperyment przeprowadzono na szczurach rasy Hooded Oxford chowu wsobnego, którym pod narkozą i w warunkach sterylnych wprowadzano kawałki gąbek o wielkości 4mm x 2mm x 2 mm do naciętego mięśnia udowego. Zwierzęta podzielono na grupy w zależności od długości trwania eksperymentu: 7, 30, 90, 150 i 210 dni. Po upływie danego czasu zwierzęta uśmiercano i pobierano wycinek mięśnia wraz z implantem. Tkanekę zamrażano w ciekłym azocie a następnie skrawano przy użyciu kriostatu. Na uzyskanych skrawkach tkankowych wykonano reakcje histochemiczne i histologiczne w celu oceny stanu czynnościowego tkanek, procesu zabudowy tkankowej implantu oraz stopnia nasilenia stanu zapalnego wokół ciała obcego, jakim jest implant.

## Wyniki i dyskusja

Na podstawie obserwacji mikroskopowych wykonanych preparatów stwierdzono lepszą zabudowę tkankową w przypadku gąbki o mniejszych porach. Różnice, które zaznaczyły się już w serii 30-dniowej, w kolejnych seriach stawały się coraz bardziej widoczne. Zabudowa wszczepu była



**RYS. 1.** Przekrój przez mięsień z implantem PGLA ( $200 \pm 40$  mm). Reakcja na aktywność dehydrogenazy NADH, seria 210 dni. Powiększenie 10x.

**FIG. 1.** The cross-section through the muscle with PGLA ( $200 \pm 40$  mm) implant. The reaction for the NADH dehydrogenase activity, 210-day series. Original magnification 10x.

in vitro on the porous structure of scaffold and next the obtained construct is placed in the site of the tissue loss.

To submit the proper growth of the tissue, the pores should be interconnected and large enough to permit cellular migration, diffusion of nutrients and metabolites, and the proper angiogenesis. As the new tissue is developing the implant undergoes gradual degradation.

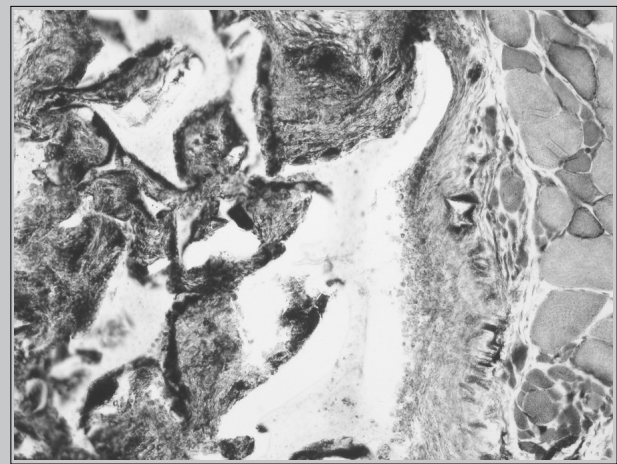
The purpose of the study was to evaluate the effect of scaffold microstructure, especially the pore size on the process of tissue regeneration in vivo [2].

## Methods

Copolymer of glycolide and L-lactide was synthesized in the Centre of Polymer Chemistry, Polish Academy of Sciences, Zabrze, according to a method described previously [3]. Bioresorbable PGLA foams with different pore size were produced through a solvent casting / particulate leaching technique [4]. Sodium chloride and sodium citrate particles were used as porogens (pore size:  $200 \pm 40$  mm and  $600 \pm 100$  mm respectively). The volume fraction of pores was the same for both types of foams [5]. The study was performed on inbred Hooded Oxford rats. Pieces of foams (4 mm x 2mm x 2 mm) were implanted into the cut gluteal muscles under anaesthesia and in sterile conditions. The in vitro study was approved by Bioethics Committee.

Animals were divided into groups, depending on the duration of the experiment: 7, 30, 90, 150 and 210 days. After the expiry of a time period animals were sacrificed and tissue blocks containing the biomaterial were excised. Samples were frozen in liquid nitrogen and cut into 8mm thick slides in a cryostat microtome. On the obtained slides histological and histochemical reactions were carried out to estimate the metabolic state of tissues, processes of tissue development into and around the implant, and the intensity of inflammation.

## Results and discussion



**RYS. 2.** Przekrój przez mięsień z implantem PGLA ( $600 \pm 100$  mm). Reakcja na aktywność dehydrogenazy NADH, seria 210 dni. Powiększenie 10x.

**FIG. 2.** The cross-section through the muscle with PGLA ( $600 \pm 100$  mm) implant. The reaction for the NADH dehydrogenase activity, 210-day series. Original magnification 10x.

zwarta, gąbka wykazywała większy stopień fragmentacji, wszystkie przestrzenie wypełnione były komórkami. W przypadku gąbki o większych porach, nawet w serii 210-dniowej obserwowano miejsca implantu tylko częściowo wypełnione komórkami.

Badania histoenzymatyczne na aktywność oksydazy cytochromu c i dehydrogenazy zredukowanego koenzymu NAD [6] - kluczowych enzymów łańcucha oddechowego, wykazały aktywność tkanek otaczających implant porównywalną z aktywnością tkanek odległych od implantu. Nie wykazano istotnych różnic między aktywnością tych enzymów dla obu gąbek, co pozwala wnioskować, że wielkość porów nie wpływa na biogodność implantowanego materiału.

Nasilenie stanu zapalnego oceniono na podstawie obserwacji aktywności enzymu lizosomalnego - fosfatazy kwasnej [7] oraz liczebności komórek wpływających na przebieg stanu zapalnego - mastocytów i eozynofili. W serii 7-dniowej nasilenie zapalenia było takie samo w przypadku obu gąbek. W dalszych seriach aktywność fosfatazy kwasnej oraz liczebność wielojądrowych komórek olbrzymich i eozynofili była wyższa wokół gąbek o mniejszych porach. Mogło to być spowodowane większym stopniem degradacji PGLA oraz lepszą penetracją komórek do wnętrza implantu i, co za tym idzie, większą powierzchnią kontaktu tkanki z materiałem.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że regeneracja tkanki mięśniowej i zabudowa tkankowa implantu postępują sprawniej przy użyciu podłoża tkankowego o mniejszym rozmiarze porów (ok. 200  $\mu\text{m}$ ), co możemy porównać z wynikami pracy dotyczącej regeneracji tkanki kostnej. Whang i wsp. stwierdzili, że optymalny rozmiar porów dla regeneracji tej tkanki mieści się w zakresie 100-350  $\mu\text{m}$  [8].

## Podziękowania

Autorki dziękują Panu Dr P. Dobrzyńskiemu i Panu Doc. M. Bero (Centrum Chemii Polimerów, Zabrze) za dostarczenie próbek kopolimerów. Pracę sfinansowano ze środków budżetowych na naukę w latach 2005-2008 (3 T08D 019 28)

## Piśmiennictwo

- [1] Ma P.X. (2004) *Materials Today* 7(5): 30-40.
- [2] Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.-K. (2001) *Tissue Engineering* 7: 679-689.
- [3] Dobrzyński P., Kasperczak J., Janeczek J., Bero M (2001) *Macromolecules*: 5090-5098.
- [4] E. Pamuła, M. Błażewicz, B. Czajkowska, P. Dobrzyński, M. Bero, J. Kasperczyk, (2004) *Annals of Transplantation* 9(1A) Suppl., 64-67.

Microscopic analysis of obtained slides shows much better tissue ingrowth into the foam with smaller pores. Differences occurred in 30-day series; in subsequent series became more visible. The newly-formed tissue was compact, the pores were filled with cells, and the foam was in higher degree fragmented (FIG.1). In the case of the foam with bigger pores, even in 210-day series the places only partly filled with tissue were still seen (FIG.2).

The histoenzymic studies evaluating activity of cytochrome c oxidase and NADH dehydrogenase [6] - the key enzymes of respiratory chain - showed the activity of tissues in close proximity to the implants compared to those further away. Any significant differences between activities of these enzymes of both foams were seen, which indicates that there is no effect of pore size on biocompatibility of implanted materials.

The intensity of inflammation was estimated by observations of the acid phosphatase activity [7] and number of inflammatory cells: mast cells, eosinophils and multinucleated giant cells. In 7-day series the intensity of inflammation was similar for both foams. In further series the acid phosphatase activity and number of multinucleated giant cells and eosinophils were higher around foams with smaller pores. The reason for this may be much better penetration of cells inside the implant and higher surface area of the tissue - biomaterial interface.

Obtained results show much better tissue ingrowth into the foam with the pores of about 200  $\mu\text{m}$  and proper regeneration of muscle tissue around the implant. Our results can be compared to those of Whang et al., who stated that the optimal pore size for the bone tissue regeneration varies between 100 and 350  $\mu\text{m}$  [8].

## Acknowledgements

The authors thank Dr P. Dobrzyński and Doc M. Bero (Centre of Polymer Chemistry, Polish Academy of Sciences, Zabrze) for providing the copolymer samples. This study was supported by the Polish Budget Funds for Scientific Research within the years 2005-2008, as a research project No 3 T08D 019 28

## References

- [5] Pamuła E., Błażewicz M., Buczyńska J., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M. (2003) *Inżynieria Biomateriałów* 30: 95-99.
- [6] Pearse E.A.G. (1991) *Histochemistry Theoretical and Applied*. Tom 3. Wyd. Churchill Livingstone, Longman Group.
- [7] Goldberg A.F., Barka T. (1962) *Nature* 195: 297.
- [8] Whang K., Healy E., Elenz D.R. (1999) *Tissue Engineering* 5: 35-45.