Metodologia i preparaty

# Preparaty

## PBS

Phosphate-buffered saline

Do przygotowania roztworów 1mM i 10mM potrzebne są:

Tabela 1.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Związek | Ilość do dodania (1x) | Końcowa koncentracja (1x) | Ilość do dodania (10x) | Końcowa koncentracja (10x) |
| H2O (koniecznie destylowana) |  |  |  |  |
| HCl |  |  |  |  |
| NaCl | 8g | 137mM | 80g | 1,37M |
| KCl | 0,2g | 2,7mM | 2g | 27mM |
| Na2HPO4 | 1,44g | 10mM | 14,4g | 100mM |
| KH2PO4 | 0,24g | 1,8mM | 2,4g | 18mM |

Rozpuścić reagenty w 800mL wody. Dostroić pH do 7.4 używając HCl. Dopełnić wodą do 1l. Końcowe koncentracje, do których będzie się dążyć zostały podane w tabeli 1.

## FBS

Fetal bovine serum

Nie jest konieczne, natomiast jego dodatek daje dużo lepsze przybliżenie warunków biologicznych i wpływa korzystniej na obserwację biodegradacji.

## Penicylina

## Streptomycyna

# Sterylizacja

Wymieniam tutaj różne formy sterylizacji, które są możliwe do wykonania w dostępnych warunkach. Nie musi to być 100% sterylizacja, chodzi o podstawową dezynfekcję. Połączenie penicyliny i streptomycyny powinno zapobiec rozwojowi bakterii, gdyby takie się namnożyły.

Sterylizujemy szklane probówki, jak również same rusztowania.

## Alkohol

### Alkohol etylowy

Alkohol etylowy stosowany do dekontaminacji, charakteryzuje się szybką aktywnością bakteriobójczą (10 sekund), są zdolne do inaktywacji prątków, wirusów oraz grzybów, nie niszczy jednak sporów bakteryjnych. Alkohol etylowy (60-80%) jest aktywny wobec wirusów lipofilnych i większości hydrofilnych (adenowirusy, rotawirusy), natomiast nie inaktywuje wirusów zapalenia wątroby typu A i polio.

### Alkohol izopropylowy

Alkohol izopropylowy stosowany do dekontaminacji, charakteryzuje się szybką aktywnością bakteriobójczą (10 sekund), są zdolne do inaktywacji prątków, wirusów oraz grzybów, nie niszczy jednak sporów bakteryjnych. Alkohol izopropylowy (60-80%) jest aktywny wobec wirusów lipofilnych i większości hydrofilnych (adenowirusy, rotawirusy, enterowirusy), natomiast nie inaktywuje wirusów zapalenia wątroby typu A i polio, a także w przeciwieństwie do alkoholu etylowego nie jest aktywny wobec enterowirusów.

### Sterylizacja wysokotemperaturowa

Sterylizacja bieżącą parą wodną (tyndalizacja)

Polega na trzykrotnym eksponowaniu sterylizowanych materiałów na działanie pary wodnej (100oC) przez 20-30min w odstępach 24 godzinnych. Po każdych ogrzaniu materiał jest ochładzany i pozostawiany w temperaturze pokojowej. Para wodna niszczy formy wegetatywne drobnoustrojów, a formy przetrwalnikowe obecne w sterylizowanym materiale w fazie temperatury pokojowej przechodzą w formy wegetatywne niszczone w kolejnym cyklu podgrzania. Sterylizacja przeprowadzana jest w aparatach Kocha lub Arnolda.

## Sterylizacja niskotemperaturowa

Sterylizacja plazmowa

Plazma charakteryzuje się wysoką zdolnością niszczenia mikroorganizmów w wyniku interakcji obecnych w niej wolnych rodników hydroksylowych z DNA, RNA, enzymami i fosfolipidami drobnoustrojów. Proces sterylizacji przebiega w temp. 38-50oC w czasie 30-75 minut, a produktem końcowym jest tlen i woda.

# Urządzenia i szkło laboratoryjne

Potrzebne będą również urządzenia oraz szkło do poprawnego i sprawnego przeprowadzenia eksperymentu.

Tabela 2.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nazwa | Przeznaczenie | Uwagi |
| Probówki | Do przeprowadzenia eksperymentu | Pojemność przynajmniej 10ml, najlepiej 55ml – z zatyczkami, z możliwością włożenia ich do wirówki |
| Zlewki, kolby | Do przygotowania preparatów | Pojemność 1l |
| Bagietki | Do mieszania |  |
| Pipety | Do odmierzania | Pojemności 1 i 5ml |
| pH-metr | Kontrola pH | Najlepiej automatyczny, ale może być też papierek uniwersalny |
| „Inkubator” | Utrzymanie temperatury 37oC |  |
| Waga laboratoryjna | Kontrola zmian masy rusztowania | Dokładność 0,001gm |
| Wstrząsarka | Dokładne wymieszanie roztworu | Przynajmniej 100rpm |
| Wirówka |  | Przynajmniej 3000rpm |
| Suszarka | Do osuszania preparatu |  |

# Procedura

1. Sterylizacja probówek oraz rusztowań
2. Po sterylizacji (metoda sterylizacji do przedyskutowania) probówek wprowadza się do nich około 0.150gm rusztowania polimerowego (również po sterylizacji), zalewa 40cm3 PBS (1x w jednej probówce oraz 10x w drugiej) dodaje się 10%FBS, 100U/cm3 penicyliny oraz 100ug/cm3 streptomycyny.
3. Wstawia się tak przygotowany preparat do wstrząsarki ustawionej na 70rpm na 4 tygodnie (ten krok jest również do omówiania, można przeprowadzić przyspieszone wstrząsanie trwające krócej (24 godziny) i pozostawić je przez 4 tygodnie bez wstrząsania – jednakże jest ono wskazane ze względu na przyspieszenie procesu degradacji, jak również odwzorowania warunków fizjologicznych).
4. Codzienna kontrola pH (zakres od 5.0-7.4) w razie zmian pH, usunięcie PBS i wprowadzenie świeżego.
5. Po 2 tygodniach wirowanie próbek z prędkością 3000rpm przez 20 minut. Pozostawienie części rusztowań do dalszej degradacji, pobranie części próbek do analizy.
6. Pobrane próbki są osuszane w temp. 70oC przez trzy dni.

# Dane

Na początku wszystkie rusztowania zostaną dokładnie zanalizowane:

* Masa
* Rozmiary
* Porowatość
* Właściwości elastyczne

Podobnie po przeprowadzonym eksperymencie.

Porównanie otrzymanych danych pozwoli na wyciągnięcie wniosków, co do stopnia biodegradowalności materiału.

# Czy polimer jest biodegradowalny?

Zdefiniowanie pojęcia „polimer degradowalny” stanowi pewną trudność, ponieważ w zasadzie wszystkie związki wielkocząsteczkowe w warunkach użytkowania stopniowo ulegają procesom starzenia. Zatem należy wprowadzić pewnie dodatkowe kryteria, pozwalające na rozróżnienie polimerów degradowalnych od niedegradowalnych. Jednym z paramtetrów jest stosunek czasu degradacji polimeru (tp) do czasu życia człowieka (th).

Polimer określa się jaklo degradowalny, gdy D -> 0, natomiast niedegradowalny gdy D -> ∞.

W naszym przypadku lepszym było by określenie stosunku czasu degradacji polimeru (tp) do czasu regeneracji tkanki kostnej (tk).

W związku z tym, że chcemy, aby rusztowanie było zastępowane przez tkankę kostną to degradacja nie może być zbyt szybka, ale polimer powinien ustępować osteocytom. Oznacza to, że będzie się dążyć do tego, aby stosunek ten wynosił <1-3). Czas regeneracji tkanki kostnej w zależności od stopnia uszkodzenia wynosi od 3-9 miesięcy.