

ENZYMATYCZNA MINERALIZACJA HYDROŻELÓW GLIKOLU KATECHOLO- POLYETYLENOWEGO (cPEG) W ZASTOSOWANIACH JAKO KOSTNY MATERIAŁ ZASTĘPCZY

T.E.L. DOUGLAS^{1*}, P.B. MESSERSMITH², J.A. JANSEN¹,
S.C.G. LEEUWENBURGH¹

¹DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
Radboud University Medical Center Nijmegen,
P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, Holandia,

²DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING,
Chemistry of Life Processes Institute,
and Institute for Bionanotechnology in Medicine,
Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA.

*MAILTO: T.DOUGLAS@DENT.UMCN.NL

Strzeszczenie

Fosfataza alkaliczna (ALP), enzym odgrywający rolę w mineralizacji kości, został związany wewnątrz kleistego hydrożelu chemicznie zbliżonego do białek omulków, składającego się z glikolu katecholo-polyetylenowego (cPEG). Następnie, przygotowane hydrożele zostały zanurzone w roztworze glicerofosforanu wapniowego (CaGP) w celu ich zmineralizowania i poprzez to polepszenia ich przydatności jako materiału zastępczy kości. Związany ALP zachował swoją bioaktywność i przyczynił się do tworzenia materiału podobnego do apatyty wewnątrz cPEG-żelów. Ilość tego materiału oraz wytrzymałość mechaniczna wzrastały zarówno wraz ze zwiększeniem okresu inkubacyjnego jak i stężenia fosfatazy. Wyniki pokazują zasadę działania mineralizacji za pośrednictwem fosfatazy ALP.

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 105-106]

Wstęp

Hydrożel przypominający białka omulków, składający się z czteroramiennego glikolu polyetylenowego (PEG), podstawionego grupami katecholowymi, zwanego PEG-iem katecholowym (PEG), znalazł zastosowanie jako klej tkankowy i wykazał dobrą zgodność biologiczną z naturalną tkanką (1). Fosfataza alkaliczna (ALP) jest enzymem sprzyjającym mineralizacji kości poprzez swoją zdolność do odrywania biologicznie związanego fosforanu. Przyczyniając się do jednorodnej mineralizacji hydrożelów, ALP zwiększa ich wytrzymałość mechaniczną tudzież polepsza ich przydatność jako materiały zastępcze kości. Zastosowanie ALP przedstawia godną uwagi alternatywę dla innych metod, jak np. techniki wprowadzania do hydrożelu cząsteczek fosforanu wapniowego (CaP) której wada jest skłonność CaP do tworzenia agregatów. W naszych badaniach ALP został związany w cPEG podczas tworzenia żelu aby następnie spowodować jego mineralizację poprzez zanurzenie w wodnym roztworze glicerofosforanu wapniowego, źródła wapnia i fosforanu.

Metodyka

Czteroramienny cPEG został zsyntezowany jak w poprzedniej publikacji (2). Zmieszano 200 mg/ml cPEG w 2x

ENZYMATIC MINERALIZATION OF CATECHOL-POLYETHYLENE GLYCOL (cPEG) HYDROGELS FOR BONE REPLACEMENT APPLICATIONS

T.E.L. DOUGLAS^{1*}, P.B. MESSERSMITH², J.A. JANSEN¹,
S.C.G. LEEUWENBURGH¹

¹DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
Radboud University Medical Center Nijmegen,
P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, Holandia,

²DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING,
Chemistry of Life Processes Institute,
and Institute for Bionanotechnology in Medicine,
Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA.

*MAILTO: T.DOUGLAS@DENT.UMCN.NL

Abstract

Alkaline Phosphatase (ALP), an enzyme involved in mineralization of bone, was incorporated into mussel protein-inspired adhesive hydrogels consisting of catechol-polyethylene glycol (cPEG) and incubated in calcium glycerophosphate (CaGP) solution to induce their mineralization with a view to improving their suitability as materials for bone replacement. Incorporated ALP retained its bioactivity and induced formation of apatite-like material within cPEG gels which rose with increasing incubation time and ALP concentration, as well as an increase in mechanical strength. The results prove the principle of ALP-mediated enzymatic mineralization.

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 105-106]

Introduction

A mussel protein-inspired adhesive hydrogel consisting of 4-armed polyethylene glycol (PEG) substituted with catechol end-groups, or catechol-PEG (PEG) has been used as a tissue adhesive and shown good biocompatibility (1). Alkaline Phosphatase (ALP) is an enzyme involved in mineralization of bone by cleavage of phosphate from organic phosphate. The use of ALP to induce homogenous mineralization of hydrogels to increase their mechanical strength or render them more suitable for bone replacement applications is an alternative to, for example, incorporation of calcium phosphate (CaP) particles, which tend to aggregate. In this study, ALP was incorporated into cPEG during gel formation in order to induce gel mineralization through incubation in aqueous calcium glycerophosphate (CaGP) solution, which served as a calcium and phosphate source

Materials and methods

4-arm cPEG was prepared as described previously (2). 200 mg/ml cPEG in 2x phosphate buffered saline (PBS), ALP in 2x PBS and 0.08 M NaIO₄ (crosslinker) in H₂O were mixed in the volumetric ratio 1:1:2. Resulting gels were mineralized by incubation in 0.1M calcium glycerophosphate (CaGP) in H₂O for 1-8 days with daily medium change. The solid weight percentage, i.e. the gel weight percentage not consisting of water, was calculated as: (weight after incubation and subsequent freeze-drying/weight before incubation)•100.

zbuforowanym roztworze solnym fosforanu (PBS), ALP w 2x PBS i 0.08 M NaIO₄ (crosslinker) w H₂O stosunkach objętościowych 1:1:2. Powstające żele zostały poddane działaniu 0.1M wodnym roztworze glicerofosforanu wapniowego (CaGP) w przeciągu 1-8 dni w celu mineralizacji. Roztwór był wymieniany codziennie. Waga procentowa materiału stałego, to znaczy nie zawierającego wody, wyliczyła się w następujący sposób: (waga po mineralizacji i następującej liofilizacji/ waga przed mineralizacją)•100. Mineral utworzony wewnątrz cPEG-żelów zawierających ALP analizowano FTIR po uprzednim zniszczeniu składnika organicznego cPEG czterotygodniowym płukaniem w 1.25M NaOH.

Wyniki i dyskusja

Żele zawierające ALP wykazywały wysoki stopień zmineralizowania, widoczny we wzroście mętności (RYS.1). Analiza mineralu utworzonego w cPEG-żelach zawierających ALP za pomocą FTIR (RYS.2) wykazała pik przy 1030 cm⁻¹ oraz podwójny pik między 600 a 520 cm⁻¹, charakterystyczny dla apatytu. Oszacowanie wagi procentowej materiału stałego w żelach (RYS.3) unaocniło zwiększenie jego ilości jako funkcji rosnącego okresu inkubacji w roztworze glicerofosforanu wapniowego oraz wzrastającego stężenia ALP.

Podsumowanie i perspektywy

Badania przedstawiają praktyczną metodę wywołania krystalizacji mineralu podobnego do apatytu w cPEG-hydrożelach za pomocą związanego w trakcie powstawania żelu ALP i następującej mineralizacji w roztworze glicerofosforanu wapniowego. Przyszłe badania skupią się na charakteryzacji właściwości mechanicznych oraz zgodności biologicznej zmineralizowanych żelów odnośnie ich zastosowania jako kostny materiał zastępczy oraz na związaniu ALP wewnątrz innych materiałów hydrożelowych istotnych dla inżynierii tkankowej.

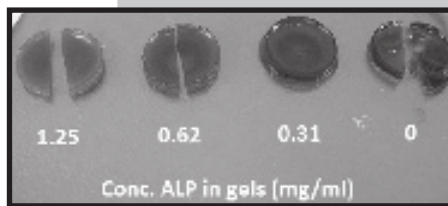
Podziękowanie

Badania zostały sfinansowane z programu "Samogojące Materiały" organizacji SenterNovem.

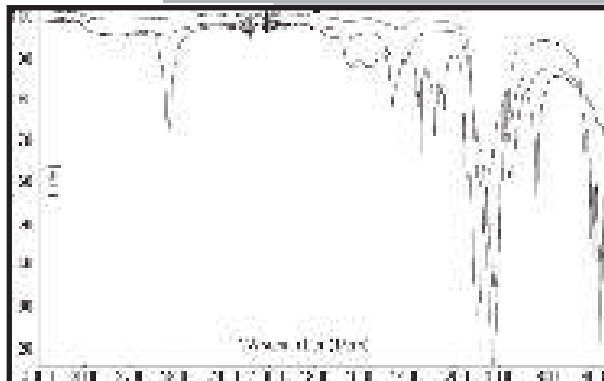
Piśmiennictwo

(1) Bilic G et al. Am J Obstet Gynecol. 2010 Jan;202(1):85.e1-9.

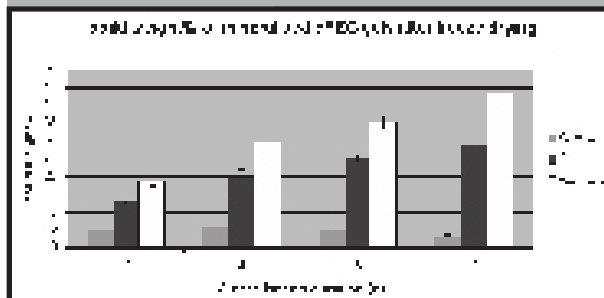
Mineral formed in cPEG gels containing ALP was examined by FTIR after destruction of the cPEG component by 4 week incubation in 1.25M NaOH.



RYS.1. 50 mg/ml cPEG-hydrożele zawierające ALP po 7 dniach w roztworze 0.1M CaGP (aq)
FIGURE 1. 50 mg/ml cPEG hydrogels containing ALP incubated for 7 d in 0.1 M CaGP (aq)



RYS.2. Widmo FTIR cPEG-a (czarny) i cPEG-a zawierającego ALP zmineralizowanego w 0.1 M CaGP (aq) i zanurzonego w 1.25M NaOH w celu wyizolowania mineralu (niebieski). Hydroksyapatyt (czerwony) jest pokazany dla porównywania.
FIGURE 2. FTIR spectra of cPEG (black) and cPEG containing ALP, mineralized in 0.1M CaGP (aq) then incubated in 1.25M NaOH to isolate mineral (blue). Hydroxyapatite (red) is shown for comparison.



RYS.3. Proporcja masy stałej cPEG-żelów zawierających 0, 1.25 lub 2.5 mg/ml ALP zmineralizowanych przez 2-8 dni w 0.1M CaGP (aq). Proporcja masy stałej wzrasta z wzrastającym okresem inkubacyjnym oraz zawartości ALP.
FIGURE 3. Solid weight percentage of cPEG gels containing 0, 1.25 or 2.5 mg/ml ALP incubated for 2-8 days in 0.1M CaGP. Weight % increases with incubation time and ALP content.

Results and discussion

Gels containing ALP mineralized, resulting in an increase in opacity (FIGURE 1). Analysis of mineral formed in cPEG gels containing ALP by FTIR (FIGURE 2) revealed a peak at approximately 1030 cm⁻¹ and a double peak between 600 and 520 cm⁻¹, both characteristic of apatite. Calculation of solid weight percentage of gels (FIGURE 3) showed that mass fraction due to mineral deposition increased with increasing ALP content and duration of incubation in CaGP solution.

Summary and outlook

This work showed the feasibility of inducing apatite-like mineral formation in cPEG hydrogels by incorporation of ALP during hydrogel formation and subsequent incubation in CaGP solution. Future work will concentrate on characterisation of mechanical properties and biocompatibility of mineralized gels with a view to their future use as bone substitutes, as well as the incorporation of ALP in other hydrogel materials of relevance for tissue engineering.

(1) Bilic G et al. Am J Obstet Gynecol. 2010 Jan;202(1):85.e1-9.

(2) Lee BP et al. Biomacromolecules. 2002;3(5):1038-47.

Acknowledgements

The authors thank the SenterNovem (NL) Self-Healing Materials program for financial support.

References

(2) Lee BP et al. Biomacromolecules. 2002;3(5):1038-47.