

## MINERALIZACJA ENZYMATYCZNA HYDROŻELI Z GUMY GELLAN Z WYTWORZENIEM FOSFORANÓW WAPNIA ORAZ MAGNEZU DLA INŻYNIERII TKANKI KOSTNEJ

TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ KRAWCZYK<sup>2</sup>, ELZBIETA PAMULA<sup>2</sup>, HEIDI A. DECLERCQ<sup>3</sup>, DAVID SCHAUBROECK<sup>4</sup>, MIROSLAW M. BUCKO<sup>2</sup>, LIEVE BALCAEN<sup>5</sup>, PASCAL VAN DER VOORT<sup>6</sup>, FRANK VANHAECKE<sup>5</sup>, RIA CORNELISSEN<sup>3</sup>, PETER DUBRUEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GHENT, BELGIA

<sup>2</sup>KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AGH, AL.MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF BASIC MEDICAL SCIENCE, GHENT UNIVERSITY, DE PINTELAAN 185 (6B3), 9000 GHENT, BELGIA

<sup>4</sup>OŚRODEK INŻYNIERII MIKROSYSTEMÓW (CMST), ELIS, IMEC, TECHNOLOGIEPARK 914A, 9052 GHENT, BELGIA

<sup>5</sup>WYDZIAŁ CHEMII ANALITYCZNEJ, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S12, 9000 GHENT, BELGIA

<sup>6</sup>WYDZIAŁ CHEMII NIEORGANICZNEJ, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S3, 9000 GHENT, BELGIA

\*MAILTO: TIMOTHY.DOUGLAS@UGENT.BE

### Streszczenie

Zastosowanie hydrożeli jako scaffoldów dla inżynierii tkanki kostnej umożliwia integrację substancji bioaktywnej takiej jak enzym fosfataza alkaliczna (ALP), który sprzyja mineralizacji. W niniejszej pracy, hydrożele z gumy gellan (GG) zawierające ALP poddano mineralizacji z wytworzeniem fosforanów wapnia (CaP) i magnezu (MgP) przez inkubację w płynach mineralizujących zawierających glicerofosforan wapniowy (CaGP) i magnezowy (MgGP). Porównano pięć różnych stosunków stężeń CaGP:MgGP, mianowicie 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 and 0:0.1 (mol dm<sup>-3</sup>). Tworzenie CaP i MgP potwierdzono za pomocą FTIR, spektroskopii Ramana, SEM, EDS, ICP-OES, XRD, TGA oraz poprzez wyznaczenie zmian suchej masy. Stwierdzono, że wapń ulega integracji w fazie mineralnej w znacznie większym stopniu niż magnez. Wzrost ilości magnezu spowodował zmiany w morfologii otrzymanej fazy mineralnej. Badania mechaniczne oraz reometryczne wykazały, że moduł Younga oraz składowa rzeczywista modułu reometrycznego hydrożeli ulegających mineralizacji przy stosunków stężeń CaGP:MgGP 0:0.1 były przynajmniej trzy razy większe w porównaniu do wszystkich innych próbek. Obecność MgP w próbkach zmineralizowanych sprzyjała adhezji oraz żywotności komórek osteoblastycznych MC3T3-E1 i nie wpłynęła negatywnie na ich cytozgodność. Wyniki dowodzą, że można indukować mineralizację hydrożeli z gumy gellan za pomocą CaGP oraz MgGP i tym samym wpływać na skład mineralny oraz właściwości mechaniczne kompozytów hydrożelowych-ceramicznych przez zmodyfikowanie stosunków stężeń CaGP:MgGP.

**Słowa kluczowe:** hydrożel, kompozyt, mineralizacja, enzym

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 95-98]

## ENZYMATIC MINERALIZATION OF GELLAN GUM HYDROGELS WITH CALCIUM AND MAGNESIUM PHOSPHATE FOR BONE TISSUE ENGINEERING

TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ KRAWCZYK<sup>2</sup>, ELZBIETA PAMULA<sup>2</sup>, HEIDI A. DECLERCQ<sup>3</sup>, DAVID SCHAUBROECK<sup>4</sup>, MIROSLAW M. BUCKO<sup>2</sup>, LIEVE BALCAEN<sup>5</sup>, PASCAL VAN DER VOORT<sup>6</sup>, FRANK VANHAECKE<sup>5</sup>, RIA CORNELISSEN<sup>3</sup>, PETER DUBRUEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GHENT, BELGIUM

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY, KRAKOW, POLAND

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF BASIC MEDICAL SCIENCE, GHENT UNIVERSITY, DE PINTELAAN 185 (6B3), 9000 GHENT, BELGIUM

<sup>4</sup>CENTER FOR MICROSYSTEMS TECHNOLOGY (CMST), ELIS, IMEC, TECHNOLOGIEPARK 914A, 9052 GHENT, BELGIUM

<sup>5</sup>DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S12, 9000 GHENT, BELGIUM

<sup>6</sup>DEPARTMENT OF INORGANIC CHEMISTRY, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S3, 9000 GHENT, BELGIUM

\*MAILTO: TIMOTHY.DOUGLAS@UGENT.BE

### Abstract

The use of hydrogels as bone tissue engineering (TE) scaffolds enables incorporation of bioactive substances such as the mineralization-promoting enzyme alkaline phosphatase (ALP). In this study, gellan gum (GG) hydrogels containing ALP were mineralized with calcium phosphate (CaP) and magnesium phosphate (MgP) by incubation in mineralization solutions of calcium and magnesium glycerophosphate (CaGP, MgGP). Five different CaGP:MgGP concentration ratios were compared, namely 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 and 0:0.1 (all values mol dm<sup>-3</sup>). CaP and MgP formation was confirmed by FTIR, Raman, SEM, EDS, ICP-OES, XRD, TGA and monitoring dry mass percentage changes. Ca was incorporated into mineral to a greater extent than Mg. Incorporation of increasing amounts of Mg into mineral formed led to changes in mineral deposit morphology. Mechanical and rheometric testing revealed that Young's modulus and storage modulus of hydrogels mineralized at a CaGP:MgGP concentration ratios of 0:0.1 were at least three times higher than those of all other samples. The presence of MgP in mineralized samples promoted attachment and vitality of osteoblastic MC3T3-E1 cells and did not negatively impact cytocompatibility. The results prove the principle of enzymatic mineralization with CaP and MgP and adjusting the composition and mechanical properties of hydrogel-ceramic composites by altering the CaGP:MgGP concentration ratio.

**Keywords:** hydrogel, composite, mineralization, enzyme  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 95-98]

Mineralizacja hydrożeli jest bardzo pożądana w przypadku zastosowań związanych z regeneracją tkanki kostnej, gdyż poprawia ona bioaktywność hydrożeli, tzn. sprzyja tworzeniu się wiązań chemicznych z otaczającą tkanką kostną [1]. Ten cel daje się osiągnąć przez dodanie enzymu fosfatazy alkalicznej (ALP) [2], który indukuje mineralizację hydrożeli z wytworzeniem fosforanów wapnia (CaP) po inkubacji w roztworach zawierających wapń i glicerofosforan wapnia (CaGP) [3]. Mineralizacja enzymatyczna z wytworzeniem fosforanu magnezu (MgP) jest do tej pory mało przebadana, aczkolwiek MgP wykazuje porównywalną cytotogodność oraz zdolność do sprzyjania adhezji oraz zróżnicowania osteoblastów [4]. W niniejszej pracy indukowano mineralizację enzymatyczną hydrożeli z gumy gellan (GG), aby w przyszłości zastosować je jako hydrożelowe szkielety dla inżynierii tkankowej [5]. Mineralizację z wytworzeniem CaP, MgP i kombinacjami CaP i MgP indukowano przez inkubację w roztworach CaGP i glicerofosforanu magnezu (MgGP) o różnych stosunkach stężeń CaGP:MgGP. Zmineralizowane hydrożele poddano analizie fizykochemicznej odnośnie ilości i składu chemicznego wytworzonego minerału, zbadano ich właściwości mechaniczne, oraz scharakteryzowano ich właściwości biologiczne w kontakcie z osteoblastami.

## Metodyka

Hydrożele GG zawierające ALP przygotowano przez ogrzewanie roztworu GG do 90°C i dodanie  $\text{CaCl}_2$  jako środka sieciującego [5]. Po ochłodzeniu do 50°C dodano ALP i roztwór odlewano w temperaturze pokojowej na szalki Petriego i po zżelowaniu wycinano próbki hydrożelowe w kształcie walców za pomocą wykrojnika. Mineralizację żeli indukowaną przez inkubację przez 7 d w płynach mineralizujących o różnych stężeniach CaGP i MgGP. Porównano pięć różnych stosunków stężeń CaGP:MgGP, mianowicie 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 i 0:0.1 M. Płyn mineralizujący wymieniano codziennie. Po zakończeniu mineralizacji, żele przemyto trzykrotnie w wodzie Milli-Q i następnie inkubowano w wodzie MilliQ przez 1 d aby usunąć pozostałości CaGP lub/i MgGP. Suchą masę, to znaczy część żelu nie zawierającą wody, obliczono według następującego wzoru:  $(\text{masa po inkubacji i liofilizacji} / \text{masa po inkubacji przed liofilizacją}) \cdot 100$ . Parametr ten służył jako miara ilości wytworzonej fazy mineralnej. Ilość fazy mineralnej w próbkach zliofilizowanych określono w badaniach TGA. Tworzenie CaP oraz MgP wykazano za pomocą FTIR, spektroskopii Ramana, XRD, SEM oraz ICP-OES. Właściwości mechaniczne zmineralizowanych hydrożeli przebadano w próbie ściskania oraz za pomocą reometrii.

Cytotogodność oceniono przez określenie żywotności ludzkich komórek fibroblastycznych HFF-1 hodując je w ekstrakcie z próbek hydrożelowych za pomocą testu MTT. Adhezję i proliferację oceniono używając komórek linii osteoblastycznej MC3T3-E1 (100000 komórek/próbkę). Liczbę komórek oceniono 1 d i 11 d po zasiedlaniu za pomocą testu MTT. Przyleganie komórek oceniono przez barwienie komórek żywych i martwych (live/dead).

## Wyniki i dyskusja

Tworzenie się fazy mineralnej w hydrożelach w obecności ALP wykazano bezpośrednio przez badania FTIR, spektroskopii Ramana, XRD, SEM, EDS i ICP-OES, oraz pośrednio przez wzrost suchej masy w próbkach zawierających ALP oraz wzrost proporcji masy przypisanej do mi-

## Introduction

In order to promote hydrogels' bioactivity, i.e. the formation of a chemical bond with surrounding bone tissue after implantation [1] mineralization is desirable for bone regeneration applications. This can be achieved by adding the enzyme alkaline phosphatase (ALP) [2], which induces hydrogels' mineralization with calcium phosphate (CaP) after incubation in solutions containing calcium and glycerophosphate (GP) [3]. Enzymatic mineralization with magnesium phosphate (MgP) remains unexplored, although MgP has comparable cytocompatibility and ability to support osteoblast adhesion and differentiation [4]. In this study, enzymatic mineralization of gellan gum (GG) hydrogels, which has been applied in hydrogel form as a tissue engineering (TE) scaffold [5], with CaP, MgP and combinations thereof was induced by incubation in solutions of CaGP and magnesium glycerophosphate (MgGP) and variation of the CaGP:MgGP concentration ratio. Mineralized gels were characterized physicochemically with respect to amount and nature of mineral formed and mechanical properties, as well as cell biologically using osteoblasts.

## Materials and methods

GG hydrogels containing ALP were prepared by heating GG solution to 90°C and addition of  $\text{CaCl}_2$  as crosslinker [5]. After cooling to 50°C ALP was added, the solution was cast at room temperature and cylindrical hydrogels samples were cut out with a hole punch. Gel mineralization was induced by incubation in mineralization medium for 7 d containing different concentrations of CaGP and MgGP. Five different CaGP:MgGP concentration ratios were compared, namely 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 and 0:0.1 M. Mineralization medium was changed every day. After conclusion of mineralization, gels were rinsed three times in Milli-Q water and subsequently incubated in Milli-Q for 1 d with the aim of removing residual CaGP and MgGP. The dry mass percentage, i.e. the gel weight percentage not consisting of water, was calculated as:  $(\text{weight after incubation and subsequent freeze-drying} / \text{weight after incubation but before freeze-drying}) \cdot 100$ . This served as a measure of the extent of mineral formation. Amount of mineral in freeze-dried samples was determined by TGA. Formation of CaP and MgP was demonstrated by FTIR, Raman, XRD, SEM, EDS and ICP-OES. Mechanical properties were investigated by compressive testing and rheometry.

Cytocompatibility was evaluated by determining the viability of human fibroblastic cells HFF-1 after culture in eluate from hydrogel samples using the MTT Assay. Adhesion and proliferation were assessed using cells of the osteoblastic cell line MC3T3-E1 (100000 cells/sample) Cell number was evaluated 1 d and 11 d post-seeding using the MTT Assay. Cell attachment was evaluated using live/dead staining.

## Results and discussions

The formation of mineral in hydrogels in the presence of ALP was demonstrated directly by FTIR, Raman, XRD, SEM, EDS and ICP-OES, and indirectly by the increases in dry mass percentages in samples containing ALP and increases in the mass fraction attributable to mineral measured by TGA, and increased Young's Modulus and rheometric storage modulus.

EDS and ICP-OES measurements, as well as comparison of dry mass percentages and TGA data indicated that more Ca was incorporated into mineral formed than Mg. This was supported by the fact that morphology visualized

nerału jaki stwierdzono w badaniach TGA, oraz podwyższonego modułu Younga i składowej rzeczywistej modułu reometrycznego.

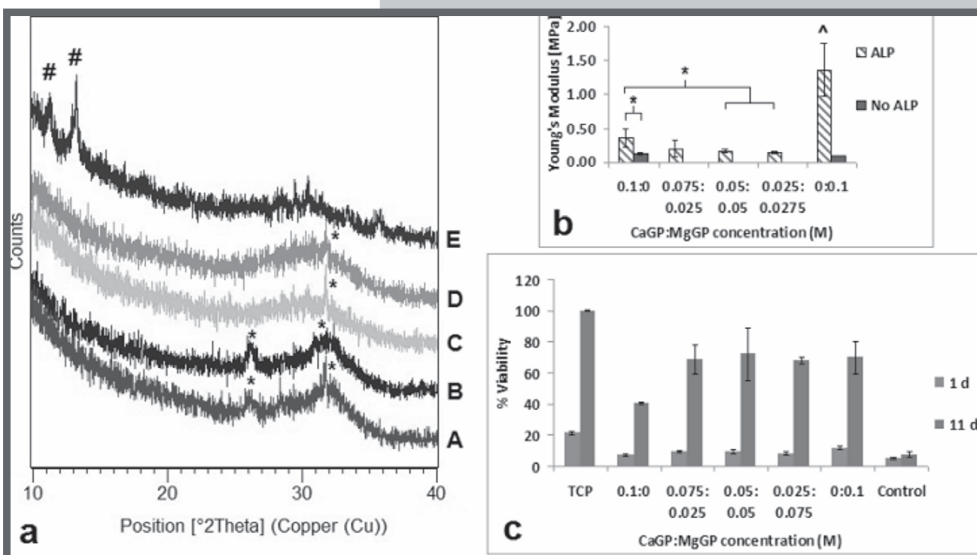
Pomiary EDS i IC-P-OES oraz porównanie suchej masy i wyników TGA wykazały, że w uzyskanej fazie mineralnej zostało zintegrowane więcej wapnia niż magnezu. Poza tym, minerały wytworzone w płynach mineralizujących zawierających CaGP i MgGP były bardziej podobne do CaP niż MgP, co stwierdzono w badaniach SEM wizualizujących morfologię wydzielań oraz w badaniach spektroskopowych (FTIR, Raman) i XRD (RYS.a). W dyfraktogramach XRD zaobserwowano charakterystyczne refleksy dla apatytu przy  $26^\circ$  i  $32^\circ$  w grupach 0.1:0 i 0.075:0.025 (A, B). W grupach 0.05:0.05 i 0.025:0.075 (C, D), zaobserwowano tylko

refleks przy  $32^\circ$ . Dyfraktogram grupy 0:0.1 (E) znacznie się różnił: refleksy charakterystyczne dla bobierytu  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$  zaobserwowano przy  $11^\circ$  i  $13^\circ$ .

Badania właściwości mechanicznych w próbie ściskania hydrożeli zawierających ALP (RYS./b) po 7 d inkubacji w płynie mineralizującym wykazały wzrost modułu Younga. Moduł Younga próbek zawierających ALP zależał od składu płynu: grupy 0.1:0 i 0.075:0.025 były znacznie sztywniejsze niż grupy 0.05:0.05 i 0.025:0.075. Moduł Younga próbek w grupie 0:0.1, inkubowanej w czystym MgGP, był przynajmniej trzy razy większy niż moduły próbek we wszystkich innych grupach. Barwienie live/dead oraz testowanie żywotności wykazały, że mineralizacja GG prowadziła do znacznie poprawzonego przylegania żywych komórek (RYS.c). Obecność fazy mineralnej na powierzchni zmineralizowanego GG umożliwia adsorpcję białek z surowicy a więc sprzyja adhezji komórek. Po 1 d, zaobserwowano najwyższą żywotność na próbkach zmineralizowanych w stosunku stężeń CaGP:MgGP 0:0.1 i najniższą w stosunku 0.1:0. Po 11 d, żywotność była podobna na wszystkich próbkach z wyjątkiem grupy zmineralizowanej w stosunku stężeń CaGP:MgGP 0.1:0. W tej grupie żywotność była znacznie niższa (około 50-60% żywotności w odniesieniu do innych zmineralizowanych grup). Wyższa proliferacja na próbkach zawierających Mg spowodowana była stymulującym działaniem magnezu, co zostało już stwierdzone dla hydroksyapatytu zawierającego małą ilość magnezu [6].

## Wnioski

Tworzenie CaP i MgP w hydrożelach GG indukowano przez wprowadzenie ALP i następnie inkubację w roztwo-



**RYS.** Analiza GG hydrożeli zmineralizowanych w różnych stosunkach stężeń CaGP: MgGP : 0.1:0 (A), 0.075:0.025 (B), 0.05:0.05 (C), 0.025:0.075 (D) i 0:0.1 (E) M. (a) Analiza XRD. Zaznaczono charakterystyczne refleksy dla apatytu (\*) i bobierytu (#). (b) Wartości modułu Younga w próbie ściskania. ^:  $p < 0.001$  w odniesieniu do wszystkich innych grup; \*:  $p < 0.01$ . (c) Żywotność komórek MC3T3-E1 hodowlanych przez 1 i 11 d. GG bez ALP-a służył jako kontrola negatywna zaś polistyren służył jako kontrola pozytywna. **FIG.** Analysis of GG gels mineralized at different CaGP:MgGP concentrations: 0.1:0 (A), 0.075:0.025 (B), 0.05:0.05 (C), 0.025:0.075 (D) and 0:0.1 (E) M. (a) XRD analysis. Characteristic peaks are marked for apatite (\*) and bobierite (#). (b) Determination of Young's Modulus by compressive testing. ^:  $p < 0.001$  relative to all other groups; \*:  $p < 0.01$ . Error bars show standard deviation. (c) Viability of MC3T3-E1 cells cultured for 1 d and 11 d. ALP-free GG served as a control. Tissue culture polystyrene served as a positive control. Error bars show standard deviation.

by SEM and FTIR, Raman and XRD spectra (FIG.a) of mineral formed in samples incubated in mineralization solutions containing CaGP resembled CaP more strongly than MgP. In XRD spectra, the 0.1:0 and 0.075:0.025 groups (A, B), peaks characteristic for apatite were observed at  $26^\circ$  and  $32^\circ$ . In the 0.05:0.05 and 0.025:0.075 groups (C, D), only the peak at  $32^\circ$  was observed. The diffractogram of the 0:0.1 group (E) was markedly different. Peaks characteristic for bobierite  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$  were seen at  $11^\circ$  and  $13^\circ$ .

Compressive testing of hydrogels (FIG.b) after 7 d incubation in mineralization solution revealed an increase in Young's modulus due to ALP incorporation. For samples containing ALP, Young's modulus was dependent on the medium composition. The 0.1:0 and 0.075:0.025 groups were significantly stiffer than the 0.05:0.05 and 0.025:0.075 groups. The Young's modulus of samples in the 0:0.1 group, incubated in pure MgGP, was at least three times higher than that of all other groups.

Enzymatic mineralization of GG led to far superior adhesion of viable cells, as demonstrated by live/dead staining and cell vitality testing (FIG.c). The presence of mineral on the surface of mineralized GG may enable serum protein adsorption and thus aid adhesion. After 1 d, viability was highest on samples mineralized at a CaGP:MgGP concentration ratio of 0:0.1 and lowest for the ratio 0.1:0. After 11 d, viability was similar on all samples except for the group mineralized at a CaGP:MgGP concentration ratio of 0.1:0, which displayed markedly lower viability (approximately 50-60% of viability for other mineralized groups). Higher proliferation on samples containing Mg might be caused by a stimulatory effect of Mg, reported for Mg-doped hydroxyapatite [6].

...  
 rach CaGP i MgGP, przy czym tworzyło się relatywnie więcej fosforanów wapnia niż magnezu. Mineralizacja prowadziła do wzrostu sztywności hydrożeli, a największy jej wzrost stwierdzono w przypadku próbek inkubowanych w czystym roztworze MgGP. Obecność MgP w zmineralizowanych próbkach wpływała korzystnie na przyleganie i proliferację osteoblastów.

### Podziękowania

*Autorzy dziękują Research Foundation Flanders (FWO) oraz Ghent University za sfinansowanie badań i LLP Erasmus program za przyznanie stypendium dla Grzegorza Krawczyka .*

### Conclusions

CaP and MgP mineral formation in GG hydrogels was induced by incorporation of ALP subsequent incubation in solutions of CaGP and MgGP. Formation of CaP was favoured more strongly than MgP. Mineralization led to an increase in stiffness, which was greatest for samples incubated in pure MgGP solution. The presence of MgP in mineralized samples led to enhanced osteoblast attachment and proliferation.

### Acknowledgments

*The authors acknowledge the Research Foundation Flanders (FWO) and Ghent University for support.*

### Piśmiennictwo

- [1] Legeros, R. Z. (1991) Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Basel, Karger.  
 [2] Gkioni, K., (2010) Tissue Eng Part B Rev, 16, 577-85.  
 [3] Douglas, T. E. L., et al. (2012) Macromol Biosci.

### References

- [4] Tamimi, F., et al. (2012) Acta Biomater, 7, 2678-85.  
 [5] Oliveira, J. T., et al. (2010) J Biomed Mater Res A, 93, 852-63.  
 [6] Bracci, B., et al. (2009) J Inorg Biochem, 103, 1666-74.

