

EWALUACJA PROCEDURY ALGINANOWO-CHITOSANOWO-ALGINANOWEJ ENKAPSULACJI CHONDROCYTÓW

IGA WASIAK*, TOMASZ CIACH

LABORATORIUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROCESOWEJ

* E-MAIL: I.WASIAK@ICHIP.PW.EDU.PL

Streszczenie

Celem niniejszej pracy była ewaluacja mikroenkapsulek otrzymanych z warstw alginianowo-chitozanowo-alginianowej (ACA) jako matrycy do unieruchamiania chondrocytów. Przygotowanie ACA mikroenkapsulek obejmuje przygotowanie kapsulek z alginianu wapnia, adsorpcji dodatnio naładowanego chitozanu na ich powierzchni, tworząc w ten sposób alginianowo-chitozanową membranę, i ostatecznie wytworzenie wierzchniej alginianowej warstwy. Zbadano własności otrzymanych mikroenkapsulek, między innymi ich właściwości mechaniczne, porowatość i szybkość dyfuzji substancji małącząsteczkowej. Kapsułki alginianowe otrzymano za pomocą elektrostatycznej metody generowania kropli. Technika ta wykorzystuje wytłaczanie roztworu alginianu w połączeniu z siłami elektrostatycznymi, które zakłócają powierzchnię cieczy na końcu kapilary / igły, tworząc strumień małych kropelek. Prowadzi to do produkcji jednolitych kulek o małej średnicy.

Słowa kluczowe: mikroenkapsulacja, alginian, chitozan, chondrocyty

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 167-171*]

Wprowadzenie

Mikroenkapsulacja komórek jest ważnym obszarem w inżynierii tkankowej i nowoczesnych naukach medycznych. Mikroenkapsułki otrzymywane są w celu utrzymania pojedynczych komórek wewnątrz wytworzonego mikrośrodowiska, jednocześnie pozwalając na swobodną dyfuzję składników odżywczych do ich wnętrza i metabolitów komórkowych na zewnątrz. Biokompatybilność mikroenkapsulek i ich komponentów jest czynnikiem decydującym o skuteczności tej technologii. Komórki allogeniczne i ksenogeniczne unieruchomione wewnątrz półprzepuszczalnej membrany są chronione i immunoizolowane od otoczenia. Zapobiega to bezpośredniemu kontaktowi komórek z komórkami układu odpornościowego, cytokinami i immunoglobulinami podczas i zaraz po przeszczepie. Mikroenkapsułkowanie chroni również unieruchomione komórki przed uszkodzeniami podczas transportu.

Alginian jest naturalnie występującym biopolimerem, który znalazł liczne zastosowania jako surowiec do unieruchomienia różnego typu komórek. Polimery alginianowe to rodzina liniowych rozgałęzionych polisacharydów, które zawierają różne ilości reszt kwasu 1,4'-β-D-mannuronowego i α-L-guluronowego. Poszczególne polimery mogą się znacznie różnić w składem reszt kwasów i ich sekwencją, oraz blokowym ułożeniem wzdłuż łańcucha polimeru. Po usieciowaniu kationami dwuwartościowymi, takimi jak Ca²⁺, Sr²⁺ lub Br²⁺, alginian tworzy biodegradowalny żel.

EVALUATION OF ALGINATE-CHITOSAN-ALGINATE CHONDROCYTES ENCAPSULATION PROCEDURE

IGA WASIAK*, TOMASZ CIACH

BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING

* E-MAIL: I.WASIAK@ICHIP.PW.EDU.PL

Abstract

The objective of this paper was to verify microcapsules obtained from alginate-chitosan-alginate (ACA) system as a matrix for chondrocytes immobilization. Preparation of ACA microencapsules includes formation of the calcium alginate beads, adsorption of a positively charged chitosane on their surface, to form alginate – chitosane membrane, and finally coating with alginate. Properties of obtained microcapsules, their mechanical properties, porosity and diffusion rate were investigated. Electrostatic droplet generation method was employed for microbeads production. This technique employs extrusion combined with electrostatic forces to disrupt a liquid surface at the capillary/needle tip, forming a charged stream of small droplets. This leads to the production of uniform small-diameter beads.

Keywords: microencapsulation, alginate, chitosan, chondrocytes

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 167-171*]

Introduction

Cell microencapsulation is an important area in tissue engineering and modern medical sciences. Microencapsules are made to keep single cells in their microenvironment allowing nutrients to diffuse into it and metabolites to diffuse out. The biocompatibility of microencapsules and their biomaterials components is a most important factor for efficacy of this technology. Allogenic or xenogenic cells entrapped within a semi-permeable membrane are protected and immuno-isolated from its surroundings. This prevents the direct contact of the cells with immune cells, cytokines, immunoglobulin when directly used in transplantation. Microencapsulation also protects immobilized cells from damage during handling.

Alginate is a naturally occurring biopolymer which found numerous applications as a raw material for immobilization of various cells type. Alginate polymers are a family of linear unbranched polysaccharides which contain varying amounts of 1,4'-linked β-D-mannuronic acid and α-L-guluronic acid residues. The residues may vary widely in composition and sequence and are arranged in a pattern of blocks along the chain. It forms a biodegradable gel when it is crosslinked with divalent cations such as Ca²⁺, Sr²⁺ or Br²⁺. Unique properties lead to the application of alginate as a matrix for cells entrapment, which are: room temperature encapsulation process, high and controlled gel porosity, aqueous environment within the matrix, dissolution and biodegradation under body conditions. Important application alginate found in cartilage repair systems, due to its similarity to hyaluronic acid and ability to decrease chondrocytes redifferentiation [1-3].

Pokojowa temperatura procesu enkapsulacji, wysoka i kontrolowana porowatość żelu, wodne środowisko matrycy, rozpuszczanie i biodegradacja w warunkach organizmu ludzkiego to unikalne właściwości pozwalające na zastosowanie alginianu jako matrycy do unieruchamiania komórek. Istotnymi zaletami alginianu, pozwalającymi na jego aplikację w systemach regeneracji chrząstki, jest jego podobieństwo do kwasu hialuronowego i zdolności do zmniejszenia redyferencjacji chondrocytów [1-3].

Chitozan jest polisacharydem powstałym z powtarzających się jednostek b-(1-4) 2-amino-2-deoksy-D-glukozy (D-glukozaminy). Otrzymuje się go w wyniku całkowitej lub częściowej deacetylacji chityny. Jest biokompatybilnym, biodegradowalnym i nietoksycznym polimerem, który rozpuszcza się w wodzie o pH poniżej 6.5, takie środowisko pozwala na częściowe protonowanie grup aminowych. Chitozan rozkłada się w organizmie człowieka pod wpływem lizozymu. Stosunek reszt N-acetylo-D-glukozaminy i d-glukozaminy zwartych w polimerze ma ogromny wpływ na szybkość jego biodegradacji. Te właściwości sprawiają, że polimer ten znalazł wiele aplikacji od biomedycyny do rolnictwa [4].

Mikroenkapsułki powstałe z systemu ACA były już wcześniej badane jako alternatywne membrany do enkapsulacji, jednak szczegóły dotyczące jej wykonania enkapsulacji komórki nie zostały dokładnie opisane. W prezentowane badania analizowano możliwość zastosowania i właściwości mikroenkapsulek systemu ACA jako alternatywnej membrany do enkapsulacji chondrocytów i nowego kierunku enkapsulacji komórek.

Metody

W prezentowanych badaniach otrzymano trzy rodzaje alginianowych mikroenkapsulek: mikroenkapsułki, mikrowłókna i cienkie folie. Odważoną ilość alginianu sodu i 0,9 g NaCl rozpuszczono w 80 ml wody destylowanej, a następnie roztwór wysterylizowano w autoklawie. Do tak otrzymanego alginianu dodano 20 ml zawiesiny komórek, otrzymano w ten sposób rozważane stężenie alginianu. Roztwór alginianu wraz z komórkami umieszczono w strzykawce i wykorzystano do formowania mikroenkapsulek według następujących procedur. Mikroenkapsułki otrzymano przy użyciu pompy strzykawkowej i elektrostatycznego generatora kropelek. Alginian wytłaczano przez igły ze stali nierdzewnej o grubości 25, 27 i 30. Kiedy roztwór polimeru zostaje wytłoczony z końca igły przez pompę strzykawkową (25 ml/h), w wyniku działania sił grawitacyjnych i elektrostatycznych są formowane krople regularnym kształcie. Koniec igły umieszczono cztery centymetry nad 0,1 M roztworem żelującym CaCl_2 . Zbadano roztwór polimeru o stężeniu 1,2, 1,5 i 1,8% alginianu sodu. Różnicę wytworzonego w elektrostatycznym generatorze kropelek potencjału kontrolowano za pomocą generatora wysokiego napięcia w zakresie od 0 do 30 kV. Mikrowłókna otrzymywano poprzez wytłaczanie roztworu alginianu przez igłę bezpośrednio do kąpieli żelującej. Średnica powstałego włókna w dużym stopniu zależy od prędkości wytłaczania i średnicy zastosowanej igły. Casting Blade (Elcometer) wykorzystano do wytworzenia alginianowych filmów. Metoda ta pozwala na rozprowadzenie roztworu alginianu cienką warstwą na gładkiej powierzchni. Otrzymane filmy, mikroenkapsułki i mikrowłókna zanurzone w roztworze zawierającym jony wapnia w celu żelowania.

Po 30 min żelowania w roztworze wapnia otrzymano mikroenkapsułki, mikrowłókna i filmy. W następnym etapie badania rodzaje alginianowych mikroenkapsulek zanurzano w roztworze chitozanu w celu wytworzenia drugiej warstwy, po 30 min płukano je w 0,9% (w/v) roztworu NaCl, aby usunąć nadmiar chitozanu. Następnie dodano roztwór 0,12%,

Chitosan is a polysaccharide formed primarily of repeating units of b-(1-4)2-amino-2-deoxy-D-glucose (D-glucosamine). Chitosan is obtained by complete or partial deacetylation of chitin. Chitosan is biocompatible, biodegradable, non-toxic polymer, which dissolves in water only if pH is lowered then 6.5, when a substantial fraction of the amino groups are protonated. It degrades under the influence of lysozyme in human body and the ratio of N-acetyl-D-glucosamine residues to d-glucosamine has a great impact on the biodegradation rate of this polymer. This property makes it an important polymer with range application from biomedical to agricultural domains [4].

ACA microencapsules have been previously studied as an alternate microcapsule membrane; however details regarding its use in cell encapsulation have not been reported. The current research investigates the potential and properties of ACA microcapsules as an alternative membrane for encapsulating chondrocytes and a new direction for cell encapsulation technology.

Methods

Three forms of alginate microencapsules were obtained: microbeads, microfibers and thin film. Weighed amount of sodium alginate and 0.9 g NaCl were dissolved in 80 ml of distilled water and sterilized in an autoclave. 20 ml of chondrocytes suspension was added to obtained desired alginate concentration. Alginate with cells was placed in a syringe and used to form microcapsules by the following procedure. Spherical droplets were formed using a syringe pump and electrostatic droplet generator which extruded the alginate through a 25, 27 and 30 gauge stainless steel needles. As the polymer solution was forced out of the end of the needle by the syringe pump (25 ml/h) the droplets were pulled off by the action of gravitational and electrostatic forces. The needle tip was placed four centimeters above the 0.1 M CaCl_2 gelling solution. Polymer solution contained 1.2, 1.5 and 1.8% of sodium alginate. The potential difference was controlled with a regulated high voltage power supply from 0 to 30 kV. Microfibers have been obtained by the extrusion of the alginate solution through the needle directly to the gelling bath. Fibers diameter strongly depend on the speed of extruded and the needle diameter. Casting Blade (Elcometer Film Applicator) was used to produce films by knife casting technique. This method allows distributing the thin layer of the alginate solution on a smooth surface. The applicator can be set to the required gap. The film is produced by pushing the applicator across the surface. After casting, film and produced microcapsules and microfibers were immersed in the hardening solution containing calcium ions.

After being hardened for 30 min in calcium solution, beads, fibers and films were obtained. In the next step mentioned forms of encapsulation systems were treated with the chitosan solution to form a next membrane layer, which was followed after 5 min by rinsing with 0.9% (w/v) NaCl solution to remove the excess chitosan. Then, 0.12%, 0.15% and 0.18% (accordingly to initial concentration) alginate solution was added to counteract charges on the membranes.

A sample of 20 microbeads was taken from each experiment and diameters of individual microbeads were measured using a microscope. Scanning electronic microscopy was used to study the structure of ACA microbeads. Microscopic observation was made after freeze-drying and gold sputtering (Phenom Fei). Diffusion properties were tested by investigating the permeability of methylene blue. Due to its properties methylene blue can simulate the behavior of small-molecules. Quantity of released substances was determined by spectrophotometer method (Helios Thermo Science), with every

0,15% i 0,18% (odpowiednio do stężenia początkowego alginianu) w celu neutralizacji ładunków na powierzchni membrany.

Średnice powstałych mikroenkapsulek zmierzono za pomocą mikroskopu dla próbki 20 mikroenkapsulek pobranych z każdego doświadczenia. Do badania struktury mikroenkapsulek systemu ACA wykorzystano elektronowy mikroskop skaningowy (Phenom Fei). Obserwacje przeprowadzono po liofilizacji i napyleniu złotem. Własności dyfuzyjne testowano poprzez badanie migracji błękitu metylenowego. Ze względu na swoje właściwości błękit metylenowy może symulować zachowanie związków małowcząsteczkowych. Ilość uwolnionej substancji ustalono metodą spektrofotometryczną (Helios Thermo Science), z wymianą medium co godzinę. Aby ocenić stężenie i żywotność komórek, mikroenkapsułki systemu ACA rozpuszczono w roztworze 55 mmol/l cytrynian sodu. Do oceny żywotności chondrocytów wykorzystano błękit trypanu, do obliczenia stężenia komórek użyto hemocytometru, podczas obserwacji mikroskopowych (Nikon Eclipse 80i).

Wyniki i dyskusja

Uzyskane zdjęcia mikroskopowe mikroenkapsulek przedstawiono na RYS. 1. Proces formowania mikroenkapsulek jest zależny od wielu czynników, takich jak: średnica igły, odległość od roztworu żelującego, przyłożonego napięcia (siła pola elektrostatycznego), geometrii elektrod oraz stężenie i lepkość polimeru. Obniżenie stężenia roztworu alginianu z 1,8% do 1,2% spowodowało spadek średnicy mikroenkapsulek o 10%. Stosując igłę 27 i przyłożony potencjał 6 kV otrzymano mikroenkapsułki o średnicy 300-400 mikrometrów, natomiast dla igły 25 i tego samego potencjału powstałe mikroenkapsułki miały średnicę 500-600 mikrometrów. Średnica mikrowłókien w znaczący sposób zależy od igły, pomimo to szybkość pompowania również wpływa na otrzymywane wyniki. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano mikrowłókna o 500-600 mikrometrów i 800-900 mikrometrów.

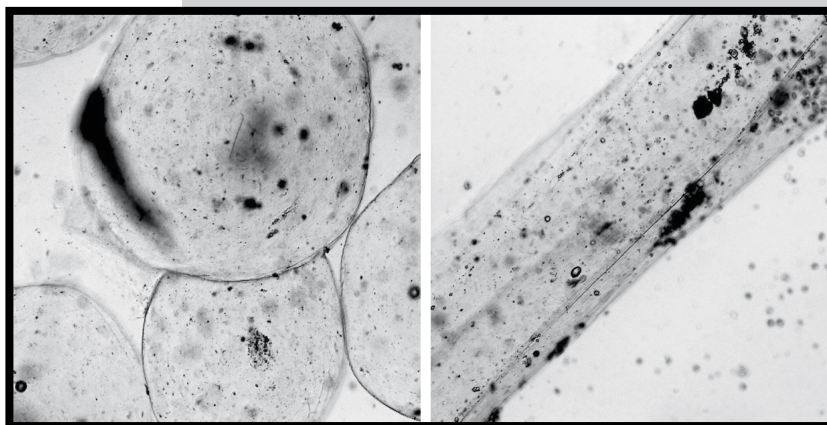
W celu dokonania oceny zmian w porowatości mikroenkapsulek po powlekanii chitozaniem i alginianem wykonano analizę SEM (RYS. 2). Po wytworzeniu zewnętrznych warstw porowatość mikroenkapsulek maleje. Zaobserwowane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe [6,5]. Wyniki wykazały wpływ stężenia alginianu i geometrii uzyskiwanych rodzajów mikroenkapsulek na ilość uwolnionej substancji modelowej. Oba wymienione parametry wpływają na formowanie żelu alginianowego i wynikającą z niego strukturę powstałych porów. Szybkość dyfuzji jest niższa niż dla mikrowłókien niż dla mikroenkapsulek, wynik ten jest spowodowany przez wpływ ich geometrii (RYS. 3). Uzyskane wyniki są zgodne z rozwiązaniami równań dyfuzji dla walca i kuli. Szybkość uwalniania białek do otaczającej pożywki może być ograniczona poprzez wzrost masy cząsteczkowej chitozanu i niejednorodność powstałego alginianowego rdzenia.

Zastosowanie polikationu ma na celu wytworzenie membrany na skutek silnego kompleksowania, która powinna ustabilizować i wzmocnić alginianową matrycę jednocześnie ograniczając i kontrolując stopień przepuszczalności. Zewnętrzną alginianową warstwę wykonano w celu wytworzenia ujemnie naładowanej powierzchni i neutralizacji grup kationowych chitozanu.

hour replacing medium. To evaluated cell concentration and viability ACA microbeads were dissolved in 55 mmol/l sodium citrate. Trypan blue was used for chondrocyte viability and hemacytometr was used for cell concentration calculation while microscopic observation (Nikon Eclipse 80i).

Results and Discussion

Microscopic pictures of obtained microcapsules are shown in FIG. 1. Obtained results clearly demonstrate that microencapsulation forming process depends on many factors, such as: the needle diameter, distance from the collecting solution, applied voltage (strength of electrostatic field), electrode geometry and polymer concentration and viscosity. When alginate concentration was decreased from 1.8% to 1.2% the average bead diameter decreased of up to 10%. Microbeads with diameters 300-400 μm were obtained by used 27 -gauge needle at applied potential 6 kV, and with diameter 500-600 μm when 25 -gauge needle was used at this same potential. Microfibers diameter strongly depends on the needle diameter, however speed of pumping is also important. Microfibers with diameter 500-600 μm and 800-900 μm were used in experiments.

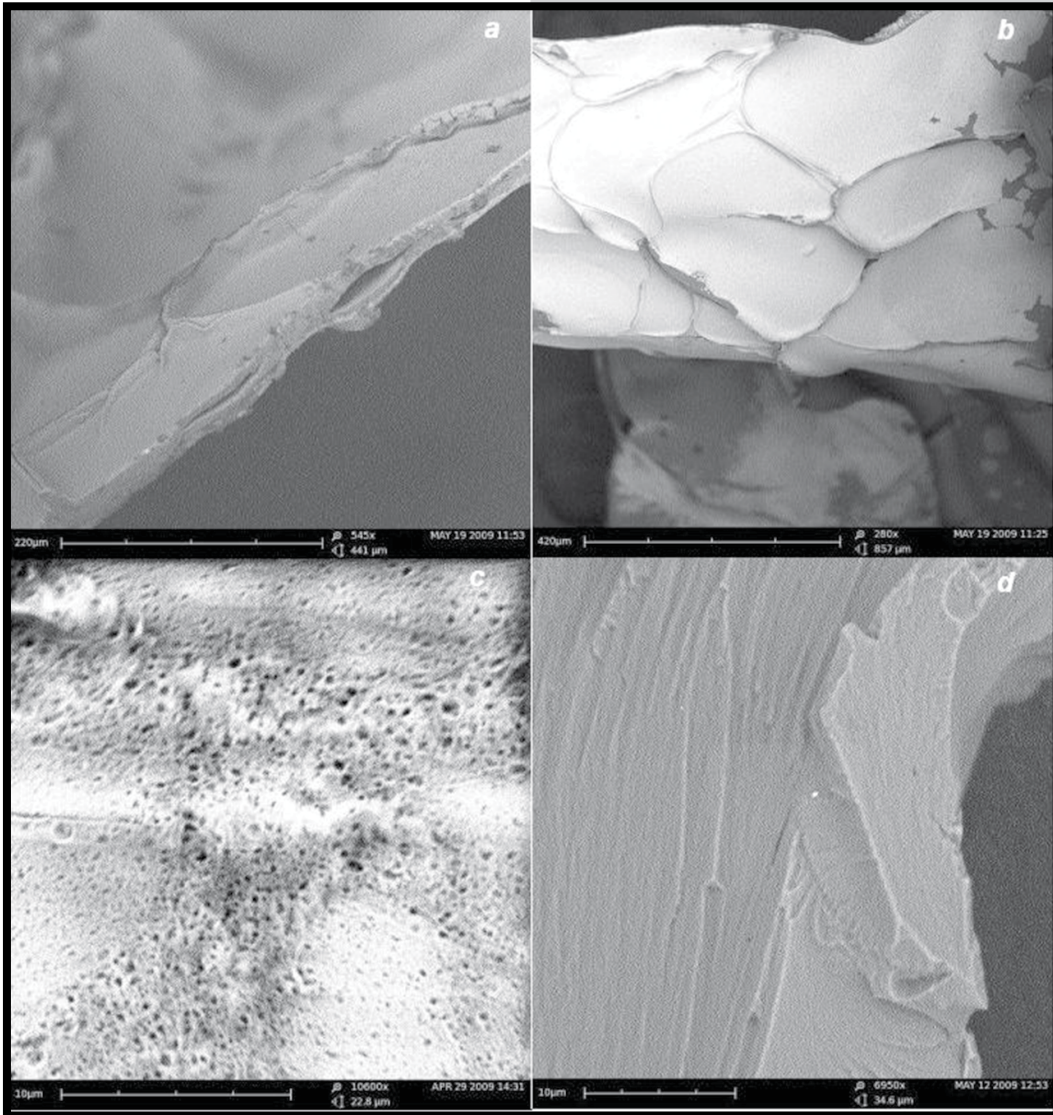


RYS. 1. Uzyskane mikroenkapsułki: mikroenkapsułki (z lewej) mikrowłókna (po prawej).
FIG. 1. Obtained microencapsules: microbeads (left) microfiber (right).

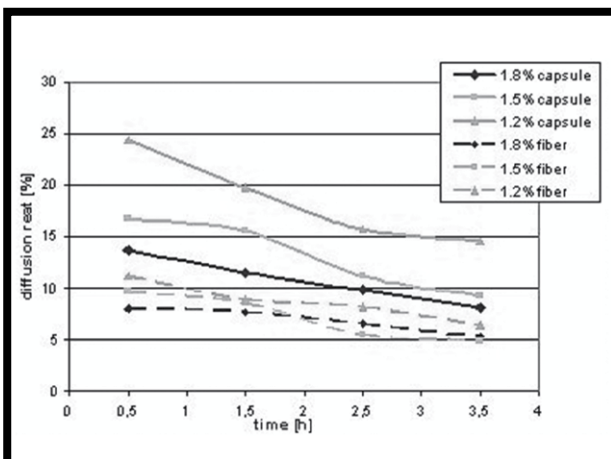
SEM studies were made to evaluate change in the porosity of microcapsules after chitosan and alginate coating (FIG. 2). A decrease in microcapsules porosity was observed after chitosan coating of alginate microencapsules. These results are in accordance with literature reports [5-6].

The results demonstrated the impact of alginate concentration and geometry of obtained forms on the amount of model substances released. Both these parameters affect the resulting alginate gel and the resulting pore structure. The release rate is lower for microfibers than for microbeads which is caused by the influence of their geometry (FIG. 3). The results obtained are in accordance with the solutions of equations of diffusion for the cylinder and sphere. The release rate of proteins into the surrounding medium could be limited by the increasing molecular weight of the chitosan and by making the gel core inhomogeneous.

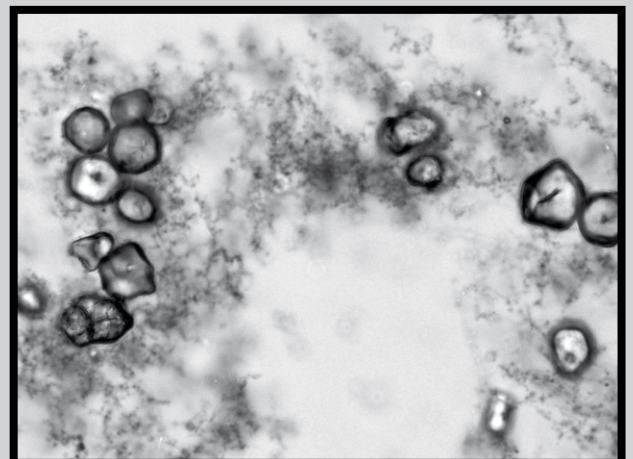
Function of polycation is to form a strong complex membrane which should stabilize and strengthen the alginate matrix at the same time to reduce and to control permeability. Outer coating is made to neutralize non reacted chitosan cationic groups and to generate negatively charged surface.



RYS. 2. Zdjęcia SEM algininowych mikrokapsulek (a) po pokryciu chitozanem oraz alginianem (b). Powierzchnia mikrowłókna: alginianowe (c) i ACA (d).
FIG. 2. SEM image of alginate microbeads (a) after coating with chitosan and alginate (b). Surface of alginate microfibres (c) and ACA (d).



RYS. 3. Szybkość dyfuzji z mikrokapsulek i mikrowłókien.
FIG. 3. Diffusion rate from microbeads and microfibers.



RYS. 4. Chondrocyty po 30 dniach hodowli w mikrokapsułkach sytemu ACA.
FIG. 4. Chondrocytes after 30 day cultured in ACA microbeads.

Geometryczna forma mikroenkapsulek ma wpływ na stężenie komórek. Po 21 dniach hodowli stwierdzono zmniejszenie stężenia chondrocytów w mikrowłóknach z 4,56 do 4,48 10^6 komórek/ml. Tak nagła zmiana w stężeniu komórek prawdopodobnie spowodowana jest degradacją włókien i uwalnianiem komórek do pożywki hodowlanej. Dla mikroenkapsulek o średnicy 300-400 μm końcowe stężenie komórek wzrosło z 4,6 do 4,64 10^6 komórek/ml i było wyższe niż dla mikroenkapsulek o średnicy 500-600 μm . Efekt ten spowodowany jest przez właściwości dyfuzyjne mikroenkapsulek. Zmniejszenie średnicy mikroenkapsułki poprawia transport dyfuzyjny substancji odżywczych i metabolitów. Badania żywotności komórek wykazały 90% żywotność komórek po procesie mikroenkapsulacji. Zaobserwowano niewielki spadek żywotności komórek w czasie, ale po 30 dniach hodowli 62% komórek pozostaje żywe (RYS. 4).

Wnioski

Przeprowadzone badania wykazują, że system ACA może być stosowany do mikroenkapsulacji chondrocytów. Metoda mikroenkapsulacji nie zawiera etapów szkodliwych dla żywotności i wzrostu komórek. Wszystkie etapy opisanej procedury wykonywane są w temperaturze pokojowej, pod normalnym ciśnieniem i bez użycia rozpuszczalników organicznych. Wymienione zalety procesu mikroenkapsulacji pozwalają na szerokie zastosowanie badanej metody w inżynierii tkankowej.

Cell concentration depends on the geometrical form of the encapsulating system. After 21 days of cells cultured in microfibers decreases in cell concentration from 4.56 to 4.48 10^6 cells/ml was observed. This sudden change in cell concentration is probably caused by the degradation of fibers and cell release into the culture medium. For microbead with a diameter of 300-400 μm final concentration of cells increases from 4.6 to 4.64 10^6 cells/ml and it was higher than for the microcapsules with a diameter of 500-600 μm . The effect is caused by diffusion properties of microcapsules. Decrease of microbeads diameter will improve diffusional transport of nutrients and metabolites. Cells viability tests shows that 90% of the cells were alive after the microencapsulation procedure. We have observed a slight decrease in cell viability with time but after 30 days of culturing 62% of cells were still alive (FIG. 4).

Conclusions

Presented results show that the ACA system can be applied for the microencapsulation of chondrotic cells. The microencapsulation method does not contain stages harmful for the cells survival and growth. All steps are carried out in room temperature, under normal pressure and without organic solvents. More over microencapsulation conditions allow for the wide use method in tissue engineering.

Piśmiennictwo

- [1] Anderer, U., Libera, J. "In vitro engineering of human autogenous cartilage" *Journal of Bone and Mineral Research*, 17 .8 (2002): 1420-1429.
- [2] Loty, S., Sautier, J.-M., Loty, C., Boulekbache, H., Kokubo, T., Forest, N. "Cartilage formation by fetal rat chondrocytes cultured in alginate beads: A proposed model for investigating tissue-biomaterial interactions" *Journal of Biomedical Materials Research*, 42. 2 (1998) : 213-222.
- [3] Binette, F., McQuaid, D.P., Haudenschild, D.R., Yaeger, P.C., McPherson, J.M., Tubo, R. "Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro" *Journal of Orthopaedic Research*, 16.2 (1998): 207-216.

References

- [4] Chandra, R., Rustgi, R., "Biodegradable polymers" *Progress in Polymer Science*, 23.7 (1998) : 1273-1335.
- [5] Gombotz, W.R., Wee, S.F. "Protein release from alginate matrices" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31.3 (1998):. 267-285.
- [6] Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P., Skjåk-Bræk, G. "Alginate polycation microcapsules: I. Interaction between alginate and polycation" *Biomaterials*, 17. 10 (1996): 1031-1040.