

BADANIE CYTOTOKSYCZNOŚCI I ODPOWIEDZI TKANKOWEJ NOWYCH ELASTOMEROWYCH TERPOLI(ESTRO-ETERO-ESTRÓW) (TEEE)

PIOTR PROWANS¹, MIROSLAWA EL FRAY^{2*}, PAULINA ZDEBIAK², PAWEŁ JAKSZUK³, MAREK MASIUK⁴

¹ POMORSKA AKADEMIA MEDYCZNA, KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I CHIRURGII RĘKI, UL. UNII LUBELSKIEJ 1, 71-252 SZCZECIN

² POLITECHNIKA SZCZECIŃSKA, INSTYTUT POLIMERÓW, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, UL. PUŁASKIEGO 10, 70-322 SZCZECIN

³ SPECJALISTYCZNY SZPITAL KLINICZNY IM. A. SOKOŁOWSKIEGO, III ODDZIAŁ ORTOPEDII URAZOWEJ, UL. SOKOŁOWSKIEGO 11, 70-891 SZCZECIN-ZDUNOWO

⁴ POMORSKA AKADEMIA MEDYCZNA, ZAKŁAD PATOMORFOLOGII, POMORSKA AKADEMIA MEDYCZNA, UL. UNII LUBELSKIEJ 1, 71-252 SZCZECIN

* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań cytotoksyczności i odpowiedzi tkankowej nowych elastomerów poli(estrowo-eterowo-estrowych) (TEEE). Materiały te były dodatkowo modyfikowane hydroksyapatytem (HAP). Stwierdzono, że polimery zawierające hydroksyapatyt spiekany (HAP III) wykazują lepszą biogodność komórkową, wpływają na mniejszy odsetek komórek apoptycznych oraz powodują lepszą odbudowę kości w porównaniu do polimeru zawierającego hydroksyapatyt niekalcynowany (HAP I).

[Inżynieria Biomateriałów, 76, (2008), 2-5]

Wprowadzenie

Poszukiwanie nowych materiałów do rekonstrukcji tkanek miękkich i twardych prowadzi do opracowywania materiałów hybrydowych, polimerowo-ceramicznych, łączących zalety poszczególnych komponentów: elastyczność i wytrzymałość polimerów oraz wysoką biogodność ceramiki, które w zależności od rodzaju tkanki, wykazują pożądany profil degradacji, elastyczności lub twardości.

Jednym z komercyjnie dostępnych biomateriałów do rekonstrukcji tkanek jest Polyactive®, będący kopolimerem poli(glikolu etylenowego) (PEG) i poli(tereftalanu butylenu) (PBT), o wzorze strukturalnym jak na RYS. 1.

Polyactive® o zawartości 70% wagowych PEG i 30% wagowych PBT jest biogodnym polimerem [1]. Może być zastosowany jako substytut chrząstki, powięzi w postaci siatki, sztucznej skóry [2] lub materiału do rekonstrukcji kości [3]. Materiał ten ulega szybkiej biodegradacji, dlatego stosowany jako szkielet umożliwia jednocześnie wnikanie komórek kostnych do wnętrza porów polimeru podczas jego degradacji [4,5]. W przypadku zastosowania go do rekonstrukcji kości nie powoduje jej przebudowy, a jedynie stymuluje powstawanie tkanki włóknistej [4].

Alternatywą dla szybko degradującego materiału, takiego jak Polyactive®, który nie zawsze spełnia wymogi stabilności mechanicznej stawiane substytutom wymagającym dłuższego czasu degradacji może być nowy terpoli(estro-etero-ester) (TEEE), zawierający oprócz bloków PEG i PBT,

INVESTIGATIONS OF CYTOTOXICITY AND TISSUE RESPONSE TO NEW TERPOLY(ESTER-ETHER-ESTER) ELASTOMERS (TEEE)

PIOTR PROWANS¹, MIROSLAWA EL FRAY^{2*}, PAULINA ZDEBIAK², PAWEŁ JAKSZUK³, MAREK MASIUK⁴

¹ POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, CLINIC OF GENERAL AND HAND SURGERY, 1 UNII LUBELSKIEJ STR., 71-252 SZCZECIN

² SZCZECIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, 10 PUŁASKIEGO STR., 70-322 SZCZECIN

³ CLINIC HOSPITAL, III DIVISION OF CASUALTY DEPARTMENT, 11 SOKOŁOWSKIEGO STR., 70-891 SZCZECIN-ZDUNOWO

⁴ POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, DIVISION OF PATHOMORPHOLOGY, 1 UNII LUBELSKIEJ STR., 71-252 SZCZECIN

* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

Summary

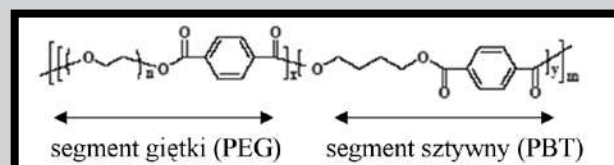
In this work, the results of cytotoxicity and tissue response to new terpoly(ester-ether-ester) (TEEE) elastomers are presented. The materials were additionally modified with hydroxyapatite. It has been found that polymers containing sintered hydroxyapatite (HAP III) showed better cell compatibility and induced lower number of apoptotic cells with simultaneous better bone regeneration as compared to polymers with non-calcined hydroxyapatite (HAP I).

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 2-5]

Introduction

Development of new materials for soft and hard tissue reconstruction leads to preparation of hybrid polymer-ceramic materials, bringing together advantages of single components: elasticity and strength of polymers with excellent biocompatibility of ceramics, and depending from the type of tissue, they show desired profile of degradation, elasticity or hardness.

One of commercially available biomaterials for tissue reconstruction is Polyactive®, a segmented copolymer of poly(ethylene glycol) (PEG) with poly(ethylene terephthalate) (PBT), with a structure as depicted in FIG. 1.



RYS. 1. Wzór strukturalny multiblokowego kopolimeru PEG/PBT.

FIG. 1. Chemical structure of PEG/PBT copolymer.

Polyactive® containing 70wt% PEG and 30wt% PBT shows good biocompatibility [1]. It can be used as cartilage substitute, surgical mesh, artificial skin [2] or material for bone reconstruction [3]. Polyactive® degrades rapidly therefore if used as a scaffold, it enables penetration of bone cells into material's pores during subsequent degradation [4,5].

hydrofobowy blok zbudowany z estru dimeryzowanego kwasu tłuszczowego, zwanego kwasem dlinoleinowym (DLA) [6]. Dodatkowo, modyfikacja TEEE nanometrycznym hydroksyapatytem [7], pozwala otrzymać materiały hybrydowe o doskonałych właściwościach mechanicznych i kontrolowanej biodegradacji.

Celem pracy było zbadanie biogodności komórkowej i odpowiedzi tkankowej nowych terpolimerów i materiałów hybrydowych.

Materialy

Do badań wykorzystano nowe terpoli(estro-etero-estry) o zawartości 45% wagowych segmentów sztywnych PBT, 19% wagowych segmentów giętkich tworzonych przez DLA i 36% wagowych segmentów giętkich tworzonych przez PEG o ciężarze cząsteczkowym 1000 Da [6]. Zsyntezowano polimer bez stabilizatora termicznego (TEEE) oraz zawierający witaminę E jako stabilizator (TEEE/VE). Do polimerów TEEE wprowadzono na drodze polikondensacji *in situ* ceramikę hydroksyapatytową w ilości 0,5% wag. Użyto hydroksyapatyt niekalcynowany (HAP I) oraz hydroksyapatyt spiekany (HAP III) [7]. Z syntezowanych polimerów przygotowano cienkie filmy (o grubości 0.5 mm) metodą prasowania na gorąco, z których następnie wycinano krążki i pałeczki o wymiarach podanych w następnym paragrafie.

Metody

Zawiesinę komórek linii 3T3 mysich fibroblastów naniesiono na krążki polimerowe o średnicy 14 mm umieszczone w 26-dołkowych płytkach hodowlanych. Komórki hodowano przez 5 dni (120 godzin) w medium RPMI-1640 w obecności 10% surowicy płodowej bydłowej, L-glutminy (0.125 mM), streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 IU/ml) (wszystkie odczynniki z Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) w wilgotności 95%, temperaturze 37°C i stężeniu CO₂ wynoszącym 5%. Po inkubacji żywotność komórek oceniono na cytometrze przepływowym stosując prosty test z jodkiem propydydy. Komórki żywe nie ulegają wybarwieniu (usuwiają jodek propydydy z wnętrza), komórki martwe i apoptotyczne barwią się jodkiem propydydy. Proliferyację oceniano licząc komórki na powierzchni polimeru pod mikroskopem odwróconym w 5 dniu trwania doświadczenia. Wynik podawano jako wartość względną w odniesieniu do kontroli w momencie zakładania hodowli (100000 komórek / krążek polimeru / 1 ml pożywki).

Z polimerów wykonano pałeczki o długości 10mm do 12mm, szerokości od 3mm do 5mm oraz grubości od 0,6 mm do 0,8 mm. Próbkę sterylizowano tlenkiem etylenu w sterylizatorze firmy 3M Steri-Vac5. Jako zwierzęta doświadczalne wykorzystano 30 szczurów rasy Wistar płci męskiej o wadze od 200g do 220g. Pierwszej dziesiątce wszczepiono do lewego uda podokostnowo polimer TEEE I. W celu oceny reakcji kości na uraz operacyjny u każdego z tych zwierząt z kości udowej prawej złuszczone okostną bez wszczepiania polimeru. Drugiej dziesiątce wszczepiono do uda lewego polimer TEEE III. Trzeciej dziesiątce szczurów wszczepiono do uda prawego silikon.

Operacje wykonywano wstrzykując domięśniowo preparat ketaminy – Narkamon w dawce 120mg/kg m.c. Po znieczuleniu gołono skórę w okolicy obu ud i nacinano odsłaniając mięśnie, a po ich rozwarstwieniu odsłaniano kość udową. Następnie złuszczone okostną i umieszczano na kości udowej polimer. W celu wszczepienia próbki do mięśni rozwarstwiano na tępo mięsień i wprowadzano do wytworzonej kieszeni pasek polimeru. Ranę zamykano dwoma szwami skórnyimi.

When used in bone tissue engineering, it stimulates formation of fibrous tissue rather than bone remodeling [4].

An alternative to fast-degrading material, such as Polyactive[®], which is not always fulfilling the requirements of higher mechanical stability during longer degradation time, can be a new terpoly(ester-ether-ester) (TEEE), containing PEG and PBT as in Polyactive[®], and additionally hydrophobic unit containing dimer of unsaturated fatty acid (DLA) [6]. Moreover, modification of such system with nanometer hydroxyapatite [7], allows to obtain hybrid materials with excellent mechanical properties and tailored biodegradation.

The aim of this work was to investigate cell biocompatibility and tissue response of TEEE and hybrid materials.

Materials

New terpoly(ester-ether-ester)s containing 45wt% PBT hard segments, 19wt% DLA soft segments and 36wt% PEG soft segments with a molecular weight 1000Da were used [6]. TEEE without thermal stabilizer and terpolymer containing vitamin E (TEEE/VE) were prepared. Hydroxyapatite ceramic was added into TEEE during *in situ* polycondensation in amount of 0.5wt%. Two different hydroxyapatites were used: non-calcined (HAP I) and sintered (HAP III). Thin polymer films (0.5mm thick) were prepared by hot press and then samples in a form of discs and sticks were cut off.

Methods

The suspension of mouse fibroblast 3T3 cell line was poured on polymer discs in 26-well plates. Cells were cultured for 5 days (120 hours) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine (0.125 mM), streptomycin (100 µg/ml) and penicillin (100 IU/ml) (all chemicals from Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) in 95% humidity, 37°C, 5% CO₂. After the incubation, the viability of cells was assessed by simple, propidium iodide exclusion test. Living cells remove propidium iodide while apoptosis and dead cells do not. Proliferation was assessed by counting cells during observation under an inverted microscope on day 5 of experiment. Results were given as a ratio of cell number in day 5 in relation to number of cells in day 0 equal to 100000 cell / polymer disc / 1 ml of medium.

Small polymer sticks 10 to 12 mm long, 3 to 5 mm wide, and 0.6 to 0.8 thick were prepared. Samples were EtO sterilized with 3M Steri-Vac5 apparatus. Polymer rods were implanted into 30 Wistar rats weighing 200-220 g. TEEE I polymer was implanted into left thigh subperiosteally into 10 rats. In order to evaluate bone response to surgical procedure, the periosteum was peel out from the right thigh. TEEE III polymer was implanted into next 10 rats in a similar way. Silicone elastomer was implanted into third group of rats.

Surgical procedure was performed with the use of ketamine (Narkomon) injections at dose of 120 mg/kg of b.w. Animal observations were performed for 180 days, and then sacrificed with sodium pentobarbital in amount 200 mg/kg b.w. The structure of bone and fibrous capsule were analyzed followed the preparation of tissues with implanted polymers.

Tissue samples were fixed in 10% buffered formaldehyde, decalcified and microscopic slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Atrophic changes and osteoblastic reactions were assessed by 12 subsequent measurements of cortical bone. The mean value of bone thickness was calculated. The structure of bone was also analyzed by means of changes of cancellous bone to trabecular bone and callus formation over the implanted polymer sample.

Observacje zwierząt kontynuowano przez 180 dni. Po upływie 180 dni zwierzęta uśmiercano podając domięśniowo pentobarbital sodu w dawce 200mg/kg m.c. i pobrano tkanki do badań.

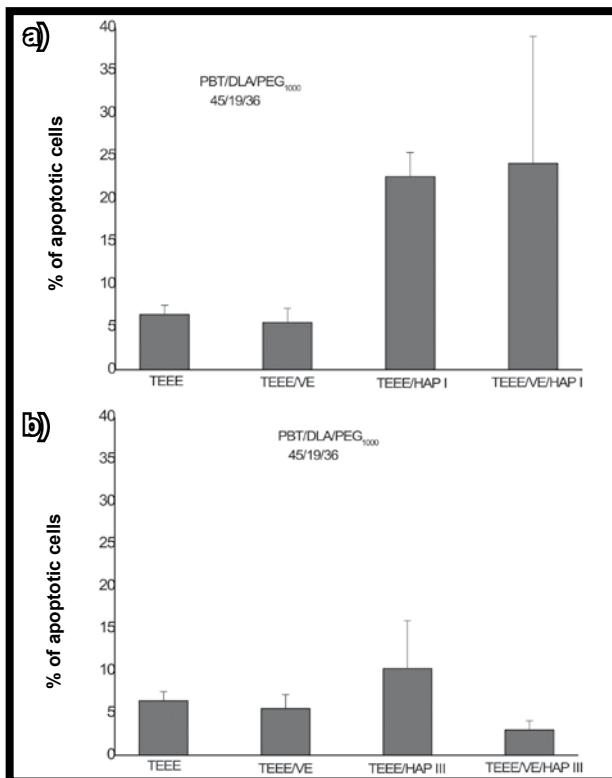
Po wypreparowaniu tkanek razem z wszczepionymi polimerami zbadano wygląd kości poszukując zaników tkanki kostnej. Oceniono wygląd otoczek łącznotkankowych powstałych dookoła wszczepów.

Próbki tkanek z wszczepionymi polimerami utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie, odwapniano a następnie wykonywano z nich preparaty mikroskopowe stosując barwienie hematoksyliną i eozyną (HE). Oceniając tkankę kostną poszukiwano zaników lub pogrubienia kości. Ocenę przeprowadzono wykonując 12 pomiarów grubości kości korowej a następnie obliczano średnią dla danego preparatu. Badano budowę mikroskopową kości zwracając uwagę na powstałe zmiany przejścia kości drobnowłóknistej w kość grubowłóknistą oraz powstałe ogniska kostniny pokrywające wszczep.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań cytotoksyczności nowych polimerów TEEE oraz TEEE zawierających hydroksyapatyt (HAP I i HAP III) przedstawiono na RYS. 2 i 3. Polimer TEEE nie zawierający stabilizatora termicznego wykazał wyższą proliferację komórek w porównaniu do materiału zawierającego VE i dodatkowo zmodyfikowanego HAP I (RYS. 2a). Zastąpienie hydroksyapatytu niekalcynowanego (HAP I) hydroksyapatytem spiekającym (HAP III) spowodowało znaczny wzrost ilości komórek, wskazując na lepszą biogodność komórkową (RYS. 2b).

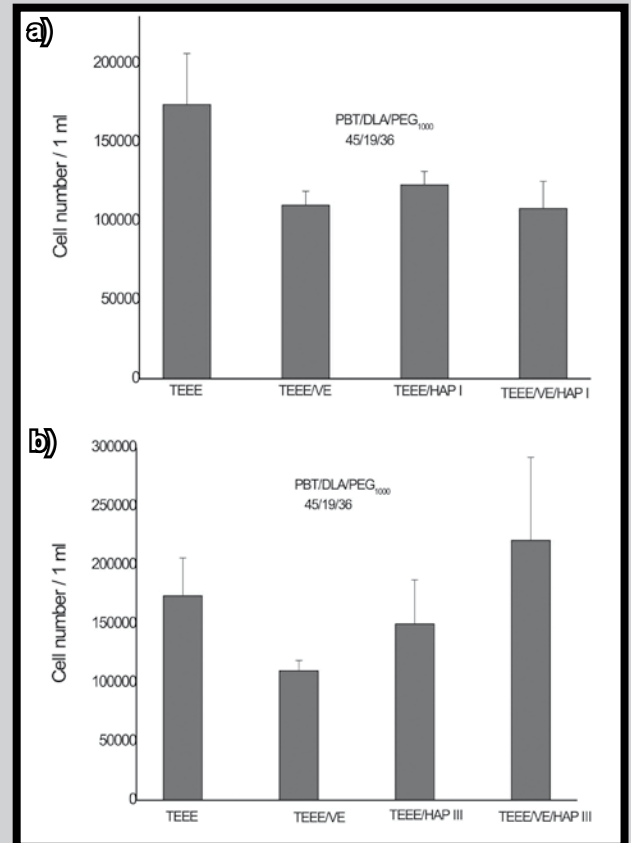
Potwierdzeniem dobrej biogodności polimeru TEEE zawierającego HAP III są również wyniki pomiaru ilości komórek martwych i apoptycznych przedstawione na RYS. 3. Ilość komórek apoptycznych dla tego polimeru nie przekroczyła 5% (RYS. 3b), podczas gdy dla TEEE zawierającego HAP I, ilość komórek martwych i apoptycznych przekroczyła 25% (RYS. 3a).



RYS. 3. Ilość komórek martwych i apoptycznych.
FIG. 3. Number of dead and apoptotic cells.

Results and discussion

The results of cytotoxicity of new TEEE polymers and TEEE modified with hydroxyapatite (HAP I and HAP III) are presented in FIGs. 2 and 3. TEEE polymer synthesized without thermal stabilizer showed higher cell proliferation as compared to TEEE containing VE, and additionally modified with HAP I (FIG. 2a). By changing the type of hydroxyapatite from HAP I to HAP III (sintered HAP), the cell proliferation was significantly higher, thus indicating better cell compatibility (FIG. 2b).

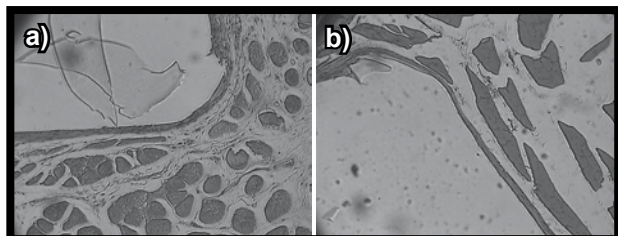


RYS. 2. Wyniki testów cytotoksyczności komórkowej.
FIG. 2. Results of cytotoxicity tests.

Good biocompatibility of TEEE containing HAP III was also confirmed by the results of measurements of dead and apoptotic cells, respectively (FIG. 3). The number of apoptotic cells for this material was not higher as 5% (FIG. 3b), while for TEEE modified with HAP I, the number of dead and apoptotic cells was above 25% (FIG. 3a).

All animals subjected to implantation tests survived well the observation period (no changes in animals' behavior, appearance and activity were noticed). No changes around the soft tissue were detected. Fibrous tissue capsule around implant was thin and weak (FIG. 4). No fluid was detected in a thin a weak capsule.

Thickness of bones and type of changes in its structure was assessed microscopically (TABLE 1). Analysis of the influence of new polymers on thickness and remodeling of bone as well as on amount of fibrous tissue revealed that polymer TEEE III with hydroxyapatite had the best properties.



RYS. 4. Otoczka łącznotkankowa dookoła polimeru zawierającego a) HAP I i b) HAP III (pow. 200x).
FIG. 4. Fibrous capsule around polymer containing: a) HAP I, and b) HAP III (magn. 200x).

Wszystkie zwierzęta poddane testom implantacji przeżyły okres obserwacji. Rany wygoiły się przez rychłozrost. Nie stwierdzono zmian w wyglądzie, zachowaniu i aktywności zwierząt. W ocenie makroskopowej tkanek miękkich nie stwierdzono zmian naciekowych lub zanikowych w otoczeniu wszczepów. Widoczne na przekrojach poprzecznych otoczki łącznotkankowe dookoła polimeru (RYS. 4) były cienkie i wiotkie. Nie stwierdzono obecności płynu w otoczce.

W badaniu mikroskopowym oceniono grubość kości oraz rodzaj zmian zachodzących w jej obrębie (TABELA 1). Porównując wpływ nowych polimerów na pogrubienie i przebudowę kości oraz zawartość tkanki łącznej stwierdzono, że najlepszymi właściwościami charakteryzował się TEEE III zawierający hydroksyapatyt spiekany.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że nowe terpolimery o strukturze segmentowej i hydrofilowo-hydrofobowych właściwościach odznaczają się bardzo dobrą biogodnością w stosunku do komórek fibroblastów. Wprowadzenie do struktury polimerów nanocząstek hydroksyapatytu spiekane (HAP III) dało lepsze wyniki biorąc pod uwagę pogrubienie i przebudowę kości w porównaniu do polimeru zawierającego hydroksyapatyt niekalcynowany (HAP I).

Podziękowania

Autorzy (M. El Fray) dziękują Pani Prof. A. Ślósarczyk (Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica w Krakowie) z próbki hydroksyapatytów.

Piśmiennictwo

- [1] C. Dua, G.J. Meijer, C. van de Valk, R.E. Haan, J.M. Bezemer, S.C. Hesseling, F.Z. Cui, K. de Groota, P. Layrolle: Bone growth in biomimetic apatite coated porous Polyactive 1000 PEGT70PBT30 implants; *Biomaterials* 23 (2002) 4649-4656.
- [2] M. Bezemer, D.W. Grijpma, P.J. Dijkstra, C.A. van Blitterswijk, J. Feijen: A controlled release system for proteins based on poly(ether-ester) block-copolymers: polymer network characterization. *Journal of Controlled Release* 1999, 62, 393-405.
- [3] M. Roessler, A. Wilke, P. Griss, H. Kienapfel: Missing Osteoconductive Effect of a Resorbable PEO/PBT Copolymer in Human Bone Defects: A Clinically Relevant Pilot Study with Contrary Results to Previous Animal Studies; Dept. of Orthopaedic Surgery, Philipps University, 35033 Marburg, Germany.

TABELA 1. Zestawienie wyników pomiaru grubości kości i intensywności wytworzenia tkanki łącznej.
TABLE 1. The results of bone thickness and intensity of bone tissue formation.

Material Material	Grubość kości Bone thickness [mm]	Pogrubienie kości Bone thickening	Przebudowa kości* Bone re-modeling*	Tkanka łączna Connective tissue
Zdrowa okostna Healthy bone	0,665	3+/2++	3+	3+/2++
TEEE I	0,641	1+	-	4+/1++
TEEE III	0,657	2+/1++	2+	6+/1+++
Silikon Silicone	0,665	3+	3+	2+/2++/3+++

* Przebudowa: zmiana struktury z kości uporządkowanej drobnowłóknistej, blaszkowatej na kość nieuporządkowaną, grubowłóknistą, splotową (wygląd jak w świeżym zroście kostnym). Oznaczenia: kolejne cyfry oznaczają ilość stwierdzonych przypadków w grupie 10 badanych zwierząt; znaki + odnoszą się do intensywności zmian: + nieznaczne, ++ średnie, +++ intensywne.
 * Remodeling: change of bone structure from oriented and lamellar thin fiber to non-oriented bone with thick fibers. Notations: consequent numbers correspond to the number of animals from the group of 10 animals where changes were detected; symbol + correspond to the intensity of changes: + discrete, ++ moderate, +++ intense.

Conclusions

As presented in results and discussion, new terpolymers of segmented structure and mixed (two component) hard segments showed very good cell proliferation and low percentage of dead and apoptotic cells. Incorporation of sintered hydroxyapatite (HAP III) into polymer structure gave better results for bone remodeling as compared to polymer containing non-calcined HAP I.

Acknowledges

The Authors (M. El Fray) are grateful to Prof. A. Ślósarczyk (AGH in Kraków) for hydroxyapatite samples.

References

- [4] M. Kellomäki, S. Paasimaa, D.W. Grijpma.: *In vitro* degradation of Polyactive® 1000PEOT70PBT30 devices. *Biomaterials*, 2002, 23, 283-295.
- [5] A.A. Deschamps, A.A. van Apeldoorn, H. Hayen, J.D. de Bruijn, U. Karst, D.W. Grijpma, J. Feijen: *In vivo* and *in vitro* degradation of poly(ether ester) block copolymers based on poly(ethylene glycol) and poly(butylene terephthalate); *Biomaterials* 25 (2004) 247-258.
- [6] Zdebiak P., El Fray M., Nowe kopolimery amfilowe. Otrzymywanie i właściwości, *Przemysł Chemiczny*, 2006, (85/8-9), 986-989.
- [7] El Fray M., Zdebiak P., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Preparation and selected properties of organic/inorganic composites based on poly(ester-ether-ester) terpolymers and nanocrystalline hydroxyapatite, *Inżynieria Biomateriałów*, 2007, 62, 2-7. Mirkin C.A.: *Nature* 451: 553-556, 2008.