

OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI I IN VITRO NANOKOMPOZYTU PCL/ HAp JAKO RUSZTOWANIA DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ

KATARZYNA KLIMEK¹, MAŁGORZATA ŚWIĘTEK²,
MARTA BŁĄŻEWICZ², GRAŻYNA GINALSKA¹

¹UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, KATEDRA BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII, W. CHODZKI 1, 20-093 LUBLIN, POLSKA

²AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, A. MICKIEWICZA 30, 30-059, KRAKÓW

[*Inżynieria Biomateriałów, 128-129, (2014), 50-53*]

Wstęp

Inżynieria tkankowa (BTE) stała się jednym z najbardziej obiecujących obszarów badań, zajmujących się wykorzystaniem tworzyw bioceramicznych oraz polimerów w celu stworzenia idealnych biomateriałów syntetycznych [1]. Hydroksyapatyt (HAp) jest tworzywem bioceramicznym, który ze względu na wysoką biokompatybilność i właściwości osteoindukcyjne używany jest jako substytut kostny [2]. W inżynierii tkankowej wykorzystywane są także polimery, takie jak poli(ε-kaprolakton) (PCL), które wykazują dobre właściwości mechaniczne lecz niewielką aktywność biologiczną. Z tego powodu, jednym z rozwiązań jest tworzenie scaffoldów kompozytowych, które łączą w sobie zalety obu typów biomateriałów [3]. Obecne prace coraz częściej dotyczą kompozytów na bazie PCL, ze względu na ich unikatowe właściwości. Liczne badania potwierdzają, że kompozyty na bazie PCL wykazują większą zdolność do pobudzania procesów zasiedlania, proliferacji oraz różnicowania komórek niż sam PCL [2,4,5].

Celem pracy było stworzenie scaffoldu nanokompozytowego PCL/HAp zmodyfikowaną metodą odlewania z roztworu/wypłukiwania soli oraz ocena właściwości biologicznych otrzymanego materiału w stosunku do ludzkich płodowych osteoblastów (h-FOB 1.19).

Materiały i metody

Przygotowanie scaffoldów.

Poli(ε-kaprolakton) (M_n 45000) oraz hydroksyapatyt (<200 nm) został zakupiony w Sigma-Aldrich. Zastosowanym rozpuszczalnikiem był dichlorometan pozyskany z Avantor Performance Materials Poland S.A. Jako porogen wykorzystano chlorek sodu o dwóch wielkościach ziaren: 300 μm i 200 μm. Do rozdzielania porogenu na frakcje zastosowano wytrząsarkę ultradźwiękową. Do wytworzenia gąbek zastosowano metodę odlewania z roztworu/wymywania porogenu (solvent casting/porogen leaching). Przygotowano 20% (wt/wt) roztwór poli(ε-kaprolaktonu) w dichlorometanie, który następnie homogenizowano przez 24 godziny na mieszadle magnetycznym. Osobno przygotowano mieszaninę cząstek stałych: zawierającą: 20 g chlorku sodu o rozmiarze ziaren 300 μm, 10 g chlorku sodu o rozmiarze ziaren 200 μm oraz hydroksyapatytu. Roztwór polimeru zmieszano z mieszaniną porogenu i hydroksyapatytu, umieszczono w formie i pozostawiono na 7 dni w celu powolnego odparowania rozpuszczalnika. Następnie wymyto cząstki porogenu poprzez powolne wypłukiwanie w wodzie destylowanej, aż do osiągnięcia przewodnictwa wody destylowanej. Następnie gąbki suszono przez 24 godziny w suszarce, w temp. 40°C.

IN VITRO CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF PCL/HAp NANOCOMPOSITE SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING

KATARZYNA KLIMEK¹, MAŁGORZATA ŚWIĘTEK²,
MARTA BŁĄŻEWICZ², GRAŻYNA GINALSKA¹

¹MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,
1 CHODZKI STREET, 20-093 LUBLIN, POLAND

²AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
30 A. MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

[*Engineering of Biomaterials, 128-129, (2014), 50-53*]

Introduction

Bone tissue engineering (BTE) became one of the most promising areas of research, focusing on bioceramics and polymers to reach ideal synthetic biomaterials [1]. The hydroxyapatite (HAp) is a bioceramics that has been investigated as a biocompatible and osteoinductive biomaterial for use as bone substitute [2]. On the other hand, the polymers used in BTE such as poly(ε-caprolactone) (PCL), exhibit good mechanical properties, but low intrinsic bioactivity. For this reason, one of the main strategies are designing of composite scaffold which combine the advantages of two biomaterials classes [3]. The present studies focus on development of PCL composites, because of their unique properties. It is known that the PCL composites show higher seeding efficiency, proliferation rates and differentiation effect than PCL alone [2,4,5].

The aim of this study was to fabricate a novel PCL/HAp nanocomposite scaffold by solvent casting/salt leaching modified method, and to assess biological properties of this composite using human fetal osteoblasts (h-FOB 1.19).

Materials and methods

Preparation of scaffold.

Poly(ε-caprolactone) (M_n 45000) and hydroxyapatite (<200nm particle size) were purchased from Sigma Aldrich Co. The solvent used to prepare polymer solution was dichloromethane obtained from Avantor Performance Materials Poland S.A. As a porogen two grain size fractions 200 μm and 300 μm of sodium chloride were used. To obtain individual fractions of porogen an ultrasonic sieving processor was applied. For fabrication PCL/HAp scaffold solvent casting/salt leaching method was applied. Poly(ε-caprolactone) was dissolved in dichloromethane in order to prepare 20% (wt/wt) solution of polymer which was later homogenized continuously on magnetic stirrer for 24 hours. Separately the mixture of solid particles was prepared. It contained: 20 g of 300 μm grain fraction of porogen, 10 g of 200 μm grain fraction of porogen and hydroxyapatite. The solution of polymer was mixed with compound of sodium chloride and nanoaddition. The mixture was put into template and left for 7 days to allow the slow evaporation of dissolvent. Afterwards, porogen particles were removing by dissolving in distillate water and leaching until the conductivity of the distillate water was achieved. At the end, composite scaffolds were dried in 40°C for 24 hours.

Obrazowanie mikrostruktury

W celu zobrazowania i optymalizacji morfologii włókien nanokompozytu PCL/HAP, wykorzystano elektronowy mikroskop skaningowy (SEM). Bezpośrednio przez obserwację próbki zostały napyłone warstwą węgla.

Badania z wykorzystaniem hodowli komórkowych

W badaniach *in vitro* wykorzystano ludzkie, prawidłowe preosteoblasty linii h-FOB 1.19, pochodzące z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC). Hodowlę prowadzono w temperaturze 34°C i atmosferze 5% CO₂. Bezpośrednio przez eksperymentami, krążki nanokompozytu zostały wysterylizowane w 75% roztworze etanolu przez 4 godziny. Po tym czasie, materiały dodatkowo sterylizowano promieniowaniem ultrafioletowym przez 2 godziny. W celu wypłukania resztek etanolu, wysterylizowane materiały inkubowano przez 24 godziny w roztworze PBS.

Ocena aktywności cytotoksycznej w teście pośrednim

W badaniu aktywności cytotoksycznej kompozytu PCL/HAP wykorzystano metodę pośrednią z wykorzystaniem ekstraktu z badanego materiału, zgodnie z normą ISO 10993-5. Stosunek masy materiału do objętości płynu hodowlanego wynosił 0,1 g/ml. Kontrolę negatywną stanowiło podłoże hodowlane bez dodatku kompozytu, natomiast kontrolę pozytywną stanowił 10% DMSO. Na początku zawiesinę komórek h-FOB 1.19 w pełnym podłożu hodowlanym doprowadzono do gęstości 1,5x10⁵ kom./ml i rozlewano po 100 µl do dołków płytki 96-dołkowej. Po całonocnej inkubacji w temperaturze 34°C, ściągano płyn hodowlany i dodawano po 100 µl/dołek odpowiednich ekstraktów. Po 24- i 48-godzinnej inkubacji w standardowych warunkach, żywotność komórek została oznaczona metodami MTT oraz NRU. W celu wykonania testu MTT, do dołków dodawano po 25 µl roztworu MTT w PBS o stężeniu 5mg/ml, inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 34°C, a następnie dodawano po 100 µl na dołek roztworu SDS-HCL. Po 12-godzinnej inkubacji mierzono absorbancję roztworu przy długości fali 570 nm za pomocą automatycznego czytnika płytek (Biotek ELx50). W celu wykonania testu NRU, komórki przemyto roztworem PBS i dodawano 100µl roztworu NRU (50 µl/ml DMEM/F12). Po 3 godzinnej inkubacji w 34°C komórki przemywano roztworem PBS i dodawano po 100µl/dołek roztworu rozpuszczalnika (1% lodowaty kwas octowy/ 49% woda destylowana/ 50% etanol). Następnie płytkę wytrząsano przez 20 min i mierzono absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą automatycznego czytnika płytek (Biotek ELx50).

Badania wpływu biomateriału na proliferację komórek

W badaniu stopnia proliferacji komórek użyto test z Sulforodaminą B (SRB). Zawiesinę komórek h-FOB 1.19 w pełnym podłożu doprowadzono do gęstości 3x10⁴ kom./ml i rozlewano po 700µl bezpośrednio na materiał umieszczony w płytce 24-dołkowej. Jako kontrolę użyto nietoksycznych krążków polistyrenowych (13 mm średnicy). Po 96-godzinnej inkubacji w temperaturze 34°C, usunięto podłoże hodowlane, a krążki przeniesiono do sąsiadujących dołków w nowej płytce 24-dołkowej. Następnie dodano 700 µl pełnego podłoża hodowlanego, komórki utrwalone 175 µl 50% kwasu trójchlorooctowego (TCA) i umieszczono przez godzinę w temperaturze 4°C. Po zakończeniu inkubacji, krążki przemyto wodą i pozostawiono do wyschnięcia. Po tym czasie, komórki barwiono przez 20 min dodając 700 µl 0,4% SRB rozpuszczonej w 1% kwasie octowym, a następnie przemywano 5 razy 1% kwasem octowym w celu wypłukania niezwiązanych cząstek. W celu uwolnienia związanych białek komórkowych dodawano po 700 µl 10mM roztworu Tris i wytrząsano płytkę przez 20 min.

Microstructure visualization

Scanning Electron Microscopy (SEM) (Zeiss ULTRA plus) was used for determining and optimizing the fiber morphology of PCL/HAP nanocomposite scaffold. The samples were sputtered with carbon before observation.

Cell culture

The *in vitro* assessment was carried out using human fetal osteoblasts (h-FOB 1.19) purchased from American Type Culture Collection (ATCC). The cells were cultured at 34°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. For cell culture studies the biomaterial was cut into small circular discs (3 mm thick, 13mm diameter) and sterilized with 75% (v/v) ethanol solution for 4 hours. The samples were additionally sterilized with ultrafiolet light for 2 hours. The sterilized pieces were preincubated in PBS solution for 24 hours to replace the ethanol remaining in the samples.

Cytotoxicity evaluation by indirect test.

The cytotoxic activity of PCL/HAP nanocomposite scaffold was evaluated by indirect test using extracts prepared according to ISO 10993-5. The ratio between biomaterial weight and the volume of culture medium was 0.1 g/ml. Culture medium without sample and 10% DMSO was served as a negative control and positive control, respectively. Firstly, the h-FOB 1.19 cells were seeded in 96-well plates in 100 µl of complete medium at concentration of 1.5x10⁵ cells/ml. After overnight incubation at 34°C, the culture medium was removed and 100 µl of extracts or 10% DMSO were added. After 24- and 48-hour incubation, in order to evaluate cell viability, the MTT and NRU assays were performed. For the MTT assay, 25 µl of the MTT solution (5mg/ml in the PBS) per well were added and the plate was incubated at 34°C for 3 hours. Next, 100 µl of SDS-HCL solution per well was added. After 12-hour incubation the absorbance was measured with a microplate reader (Biotek ELx50) at 570 nm. For the NRU assay, cells were rinsed with the PSB and 100 µl of NRU solution (50 µl/ml DMEM/F12) in culture medium per well were added and the plate was incubated at 34°C for 3 hours. After incubation, the cells were rinsed with PBS, and 100 µl of solvent (1% glacial acetic acid, 49% distilled water, 50% ethanol) per well was added. Then, the plate was agitated for 20 minutes and the absorbance was measured at 540nm using microplate reader (Biotek ELx50).

Cell proliferation assessment.

To evaluate cell proliferation, the Sulforhodamine B (SRB) In Vitro Toxicology Assay was used. The h-FOB 1.19 cells were seeded directly on the nanocomposite discs in 24-well plates in 700 µl of complete medium at concentration of 3x10⁴ cells/disc. As a control, non-toxic polystyrene discs (13 mm diameter) were used. After 96 hours incubation at 34°C, the culture medium was removed and discs were transferred to the corresponding wells in a new 24-well plate. Next, 700 µl of complete medium were added and the cells were fixed with 175 µl of 50% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 1 hour. After incubation, the discs were washed with tap water and the plate was air-dried. After that time, the cells were stained for 20 minutes with 700 µl of 0.4% SRB dissolved in 1% acetic acid and washed five times with 1% acetic acid to remove unbound stain. Then, the bound protein stain was solubilised with 700 µl of 10mM Tris base. The plate was agitated for 20 minutes. The absorbance was measured at 492 nm and subtracting the background was measured at 620 nm using a microplate reader (Biotek Synergy H4). Since the discs absorb some SRB, additional controls containing discs and cell-free medium were run.

Absorbancję mierzono przy długości fali 492 nm za pomocą automatycznego czytnika płytek (Biotek Synergy H4). Absorbancję tła mierzono przy długości fali 650 nm i odejmowano od pierwotnego pomiaru. Ponieważ biomateriał chłonie SRB, dodatkowo wykonano kontrolę zawierającą same biomateriały oraz kontrolę z podłożem hodowlanym.

Ocena zdolności adhezyjnej komórek do biomateriału.

Zdolność adhezyjną komórek h-FOB 1.19 do kompozytu PCL/HAp oceniano metodą bezpośrednią z wykorzystaniem fioletu krystalicznego (CV). W celu oznaczenia stopnia adhezji komórek do biomateriału, zawieszę komórek h-FOB 1.19 w pełnym podłożu doprowadzono do gęstości 5×10^4 kom./ml i rozlewano po 700 μ l bezpośrednio na materiał umieszczony w płytce 24-dółkowej. Jako kontrolę użyto nietoksycznych krążków polistyrenowych (13mm średnicy). Po 3-godzinnej inkubacji w temperaturze 34°C, usunięto podłoże hodowlane, a krążki przeniesiono do sąsiadujących dołków w nowej płytce 24-dółkowej. Następnie, komórki utrwalono dodając 700 μ l 2% paraformaldehydu (pH 7.4) przez godzinę. Po tym czasie zano paraformaldehyd, a komórki wybarwiono przez 5 min 0,5% roztworem fioletu krystalicznego w 20% etanolu. Następnie krążki 5-cio krotnie przemyto wodą i pozostawiono do wyschnięcia. Po wyschnięciu, zaabsorbowany barwnik wyekstrahowano dodając 1000 μ l 96% etanolu. Płytkę wytrząsano przez 15 minut i mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm za pomocą automatycznego czytnika płytek (Biotek Synergy H4). Ponieważ biomateriał chłonie fiolet krystaliczny, dodatkowo wykonano kontrolę zawierającą same biomateriały oraz kontrolę z podłożem hodowlanym.

Wyniki

Obserwacje przeprowadzone za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej wykazały kompleksową porowatość wytworzonego nanokompozytu. Obecne są pory o zróżnicowanych rozmiarach i kształtach. Kształty dużych porów (300, 200 μ m) odzwierciedlają kształty ziaren porogenu. Hydroksyapatyt obecny jest w postaci małych, charakterystycznych granulek (analiza EDX potwierdziła zarówno obecność fosforu jak i wapnia). Hydroksyapatyt prawdopodobnie zlokalizowany jest zarówno przy powierzchni porów jak i w głębi kompozytowej gąbki. Obecność pików węgla i tlenu w analizie EDX pochodzą od polimeru.

W celu oceny aktywności cytotoksycznej nanokompozytu PCL/HAp w stosunku do linii komórkowej h-FOB 1.19, wykonano testy MTT i NRU. W obu przeprowadzonych testach nie otrzymaliśmy wyników istotnych statystycznie. Po 24-godzinnej inkubacji, w teście MTT wykazano, że aktywność metaboliczna komórek traktowanych ekstraktem z PCL/HAp spadła do 90,3% w porównaniu do kontroli. Wydłużenie czasu inkubacji (48 godz.) spowodowało dalszy spadek żywotności do 85,3% w porównaniu z kontrolą. Warto podkreślić, że wyniki testu MTT zostały częściowo potwierdzone w teście NRU. Zarówno po 24- jak i 48-godzinnej inkubacji, ilość pochłoniętej przez komórki czerwieni obojętnej była stosunkowo wysoka, a żywotność komórek nieznacznie spadła do odpowiednio 93,7% oraz 92,3%, w porównaniu do kontroli.

Dodatkowo, oceniano zdolność komórek do adhezji i proliferacji. Główną rolę w procesach adhezji i proliferacji komórek odgrywają wzajemne interakcje między komórkami a biomateriałem. W naszych badaniach ocenialiśmy stopień proliferacji osteoblastów za pomocą testu z sulforodaminą B.

Cell adherence assessment.

The ability of the h-FOB 1.19 cells to adhere to PCL/HAp nanocomposite scaffold was evaluated by direct test using crystal violet assay (CV). In order to determine the cells adherence, the h-FOB 1.19 cells were seeded directly on the composite discs in 24-well plates in 700 μ l of complete medium at concentration of 5×10^4 cells/disc. As a control, non-toxic polystyrene discs (13 mm diameter) were used. After 3- hour incubation at 34°C, the culture medium was removed and discs were transferred to corresponding wells in a new 24-well plate. Next, the cells adhered to the discs were fixed with 700 μ l of 2% paraformaldehyde (pH 7.4) for 1 hour. Then, paraformaldehyde was removed and the cells on the discs were stained with 0,5% crystal violet in 20% ethanol for 5 minutes. After that, the discs were washed five times with water and the plate was air-dried. After drying, the absorbed dye was solubilised with 1000 μ l of 96% ethanol. The plate were agitated for 15 minutes. The absorbance was measured with a microplate reader (Biotek Synergy H4) at 570 nm. Since the discs absorb some CV, additional controls containing discs and cell-free medium were run.

Results

Studies carried out using scanning electron microscope demonstrated the complex porosity of fabricated nanocomposites. Pores with different shapes and sizes were present. The shapes of huge pores (300, 200 μ m) reflected the shape of particle. Hydroxyapatite is observed in the form of granules (EDX analysis confirmed the presence of phosphorus and calcium). Hydroxyapatite was probably localized both on the surface and inside the nanocomposite scaffold. Peaks of carbon and oxygen in EDX analysis were associated with polymer.

In our study, MTT and NRU assays were performed in order to determine the cytotoxic activity of PCL/HAp nanocomposite scaffold on h-FOB 1.19 cell line. We observed that both MTT and NRU assays did not give statistically significant results. After 24-hour incubation, the MTT test showed that h-FOB cells metabolic activity exposed to the PCL/HAp nanocomposite extract were decreased to 90.3%, compared to the control. In addition, we observed that cell metabolic activity was slightly reduced in time-dependent manner. After 48-hour exposure, the cell metabolic activity was decreased to 85.3%, compared to the control. Furthermore, it was noted that the NRU test partially confirmed the MTT test results. After both 24- and 48- hour incubation, the amount of incorporated neutral red was relatively high, and the cell viability was slightly decreased to 93.7% and 92.3%, respectively, compared to the control.

Moreover, the cell adhesion and proliferation were also tested. The interactions between the cells and the biomaterial scaffolds play main role in cell adhesion and proliferation. In our study, we evaluated the osteoblasts proliferation rates, using Sulforhodamine B assay. After 96-hour incubation, the cell numbers on the PCL/HAp nanocomposite scaffolds were increased remarkably. The study demonstrated, that the amount of incorporated Sulforhodamine B increased approximately three-fold, compared to the control. Furthermore, in order to determine cell adherence ability, the CV test was performed. The CV test results clearly confirmed the Sulforhodamine test results. After 3-hour incubation, we observed greater cell adhesion to the PCL/HAp nanocomposite scaffold than to the polystyrene (control).

Po 96-godzinnej inkubacji, liczba komórek na nanokompozycie PCL/HAp znacząco wzrosła. Ilość związanej przez komórki sulforodaminy B wzrosła prawie 3-krotnie w porównaniu z kontrolą. Ponadto, w celu określenia zdolności adhezyjnej komórek do biomateriału, wykonano CV test. Otrzymane w teście CV wyniki potwierdzają wyniki otrzymane w teście z sulforodaminą B. Po 3-godzinnej inkubacji, obserwowano większą adhezję komórek do nanokompozytu PCL/HAp niż do polistyrenu (kontrola).

Wnioski

W naszej pracy badaliśmy strukturę i biokompatybilność skafoldu nanokompozytowego PCL/HAp otrzymanego zmodyfikowaną metodą odlewania z roztworu/wypłukiwania soli. Warto podkreślić, że skafold nanokompozytowy PCL/HAp jest wysoce porowaty, nie toksyczny i pobudza komórki do procesów adhezji i proliferacji. Dlatego też, mamy nadzieję, że nasz biomateriał znajdzie w przyszłości zastosowanie w inżynierii tkankowej jako substytut kostny.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane w ramach projektu DS2 (Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska). Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego projekcie realizowanym zgodnie z umową nr PORPW.01.03.00-06-010/09-00 w ramach Projektu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi Priorytetowej I, Nowoczesna Gospodarka, Działanie 1.3 Wspieranie Innowacji.

Conclusion

In this work, we studied the morphologies and biocompatibility of the PCL/HAp nanocomposite scaffold fabricated by solvent casting/salt leaching modified method. It was noted that PCL/HAp nanocomposite scaffold was high porous, non-toxic and induced cell adhesion and proliferation. Therefore, we hope that our biomaterial will find some application as bone substitute for bone tissue engineering.

Acknowledgments

This study was supported by a DS2 grant (Medical University in Lublin, Poland). The paper was developed using the equipment purchased within agreement No. PORPW.01.03.00-06-010/09-00 Operational Program Development of Eastern Poland 2007-2013, Priority Axis I, Modern Economy, Operations 1.3. Innovations Promotion.

Piśmiennictwo

References

- [1] Stevens M.M.: Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today* 11 (2008) 18-25.
- [2] Park S.A., Lee S.H., Kim W.D.: Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34 (2011) 505-513.
- [3] Zhao J., Guo L.Y., Yang X.B., Weng J.: Preparation of bioactive porous HA/PCL composite scaffolds. *Appl. Surface Sci.* 255 (2008) 2942-2946.
- [4] Rodenas-Rochina J., Luis Gomez Ribelles J., Lebourg M.: Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 24 (2013) 1293-1308.
- [5] Mei N., Chen G., Zhou P., Chen X., Shao Z.-Z.: Biocompatibility of Poly(ϵ -caprolactone) Scaffold Modified by Chitosan-The Fibroblasts Proliferation in vitro. *J. Biomater. Appl.* 19 (2005) 323-329.