

WPLÝW POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) NA EKSPRESJĘ I AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY ALKALICZNEJ W LUDZKICH KOMÓRKACH OSTEOGENNYCH

JOANNA LESZCZYŃSKA¹, JOANNA WÓJTOWICZ¹,
RADOSŁAW OŁKOWSKI¹, JUSTYNA KOMASA², PIOTR ULAŃSKI²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ^{1*}

¹ ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

² MIĘDZYRESORTOWY INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ,
WYDZIAŁ CHEMICZNY, POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

* E-MAIL: MALGORZATA.LEWANDOWSKA-SZUMIEL@WUM.EDU.PL

Streszczenie

Poli(ϵ -kaprolakton) jest materiałem wykorzystywanym jako rusztowanie dla komórek w inżynierii tkankowej kości. Na podstawie danych z literatury oraz naszych własnych badań nad reakcją komórek osteogennych na bezpośredni kontakt z poli(ϵ -kaprolaktonem) można przypuszczać, iż materiał ten może wpływać na poziom markerów różnicowania komórek w kierunku osteoblastów. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu poli(ϵ -kaprolaktonu) na ekspresję oraz aktywność wczesnego markera procesu różnicowania komórek osteogennych, jakim jest fosfataza zasadowa. Przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR) analizowano ekspresję genu fosfatazy zasadowej natomiast aktywność enzymu oznaczono kolorymetrycznym testem firmy Sigma. Otrzymane wyniki wskazują, iż kontakt ludzkich osteoblastów z powierzchnią poli(ϵ -kaprolaktonu) powoduje podwyższoną ekspresję genu fosfatazy zasadowej oraz podwyższoną aktywność tego enzymu. Fosfataza zasadowa nie jest specyficznym markerem osteoblastów, jednakże jej podwyższony poziom towarzyszy wczesnym etapom różnicowania w kierunku fenotypu komórek osteogennych. Uzyskane wyniki uzasadniają podjęcie dalszych badań nad możliwym wpływem poli(ϵ -kaprolaktonu) na różnicowanie osteoblastów.

Słowa kluczowe: poli(ϵ -kaprolakton), osteoblasty, fosfataza zasadowa, różnicowanie

[*Inżynieria Biomateriałów*, 103, (2011), 13-16]

Wprowadzenie

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest biodegradowalnym polimerem należącym do grupy poliestrów alifatycznych. Materiał ten ze względu na swoje właściwości stanowi obiecujące rusztowanie dla komórek w dziedzinie inżynierii tkankowej (TEP ang. Tissue Engineering Product). W ostatnich latach PCL stał się przedmiotem wielu badań mających na celu wykorzystanie go jako potencjalnego materiału w regeneracji kości [1-4]. W dziedzinie tej dąży się do otrzymania materiału, którego funkcja nie powinna ograniczać się tylko do tworzenia substytutu tkanki kostnej, ale który również posiadałby zdolności osteoindukcyjne.

THE EFFECT OF POLY (ϵ -CAPROLACTONE) ON THE EXPRESSION AND ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN HUMAN OSTEOGENIC CELLS

JOANNA LESZCZYŃSKA¹, JOANNA WÓJTOWICZ¹,
RADOSŁAW OŁKOWSKI¹, JUSTYNA KOMASA², PIOTR ULAŃSKI²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ^{1*}

¹ DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004, WARSAW, POLAND

² INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY,
FACULTY OF CHEMISTRY, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 LODZ, POLAND

* E-MAIL: MALGORZATA.LEWANDOWSKA-SZUMIEL@WUM.EDU.PL

Summary

Poly(ϵ -caprolactone) is a material used as a scaffold for cells in bone tissue engineering. On the basis of data from literature as well as own research it was concluded that this material can influence the levels of markers of cell differentiation towards osteoblasts. The aim of this paper was to investigate the effect of poly(ϵ -caprolactone) on the expression and the activity of the early marker of the cell osteogenic differentiation process – alkaline phosphatase (ALP). Using the quantitative real time polymerase chain reaction (real-time PCR) gene expression of the alkaline phosphatase was analyzed; however, the activity of the enzyme was determined with colorimetric assay from the Sigma company. The obtained results indicated that the contact of human osteoblasts with the surface of poly(ϵ -caprolactone) causes an increased gene expression of alkaline phosphatase and an increased activity of this enzyme. Although a high level of ALP does not prove the PCL influence on the osteogenic differentiation of cells into mature osteoblasts, because this enzyme is a non-specific marker of the differentiation process. The obtained results justify undertaking further studies on the possible impact of poly(ϵ -caprolactone) on osteoblast differentiation.

Keywords: poly(ϵ -caprolactone), osteoblasts, alkaline phosphatase, differentiation

[*Engineering of Biomaterials*, 103, (2011), 13-16]

Introduction

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biodegradability aliphatic polyester. Due to its properties, this material is a promising scaffold for cells in the field of tissue engineering (TEP – Tissue Engineering Product). In recent years, PCL has become the subject of many studies aimed at using it as potential material in bone regeneration [1-4]. In this field it is aspired to receive a material whose function would not be limited to creating a substitute of the bone tissue, but which would also have osteoinduction ability. The possibility of stimulating human mesenchymal cells, obtained from fat tissue, toward osteoblasts, on the surface of poli(ϵ -caprolactone) was demonstrated by Reed et al. [5].

Możliwość stymulowania ludzkich komórek mezenchymalnych otrzymywanych z tkanki tłuszczowej w kierunku osteoblastów, na powierzchni poli(ϵ -kapolaktonu) wykazał Reed i wsp. [5]. Także wcześniejsze dotychczas nieopublikowane wyniki badań naszego zespołu, przeprowadzone z użyciem PCL, którego powierzchnię w różny sposób zmodyfikowano sugerują, iż materiał ten wpływa na podwyższenie aktywności wczesnego markera różnicowania komórek osteogennych, fosfatazy zasadowej (ALP) w hodowli ludzkich osteoblastów. Wskazują one między innymi, iż w przypadku komórek będących w bezpośrednim kontakcie z poli(ϵ -kapolaktonem), którego powierzchnię trawiono wodorotlenkiem sodu, odnotowano aż 4-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do wartości otrzymanych na powierzchni standardowego naczynia hodowlanego. Dlatego też w niniejszej pracy postawiono sobie za cel ocenę wpływu poli(ϵ -kapolaktonu) na ekspresję oraz aktywność fosfatazy zasadowej w ludzkich prawidłowych komórkach kościotwórczych, które z powodzeniem wykorzystywane są w inżynierii tkankowej kości [6-7].

Materiały i metody

Do doświadczeń użyto krążków wykonanych z poli(ϵ -kapolaktonu) o średnicy 15 mm i wysokości 2 mm. Poli(ϵ -kapolakton) (Aldrich, nominalna wartość $M_n = 80$ kDa, $M_w/M_n < 2$) oczyszczono przez rozpuszczenie w acetonie (6% w/v, 40°C, 24 h), wytrącenie przy intensywnym mieszaniu w wodzie destylowanej o temperaturze pokojowej, płukanie z ciągłym mieszaniem w wodzie destylowanej przez 48 h stosując częstą wymianę wody i suszenie próżniowe.

Krążki z PCL otrzymano za pomocą następującej procedury. Oczyszczony PCL zamrożono w ciekłym azocie i zmielono w młynku laboratoryjnym. Naważki polimeru (0,41 g) wsypano do cylindrycznych studzienek (średnica 15 mm, głębokość 2 mm) w teflonowej formie. Formę umieszczono w suszarce próżniowej, usunięto powietrze, po czym podniesiono temperaturę do 80°C (tj. około 20 stopni powyżej temperatury topnienia PCL) na czas niezbędny do stopienia polimeru i równomiernego wypełnienia studzienek. Po schłodzeniu formę rozebrano, krążki wyjęto z formy, zapakowano próżniowo i wysterylizowano promieniowaniem gamma (25 kGy).

W badaniach wykorzystywano ludzkie prawidłowe komórki osteogenne (HBDC z ang. Human Bone Derived Cells) izolowane z fragmentów kości pozyskiwanych podczas zabiegów chirurgicznych (Zakład posiada zgodę Komisji Etycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego) zgodnie z procedurą opisaną przez Gallaghery [8] i zmodyfikowaną przez Kudelską-Mazur [9]. Komórki hodowano przez 21 dni na powierzchni poli(ϵ -kapolaktonu) oraz standardowego naczynia hodowlanego (szalki 24-dołkowe (Nunc)), służącego jako materiał kontrolny. Pożywkę hodowlaną stanowił Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS) (Gibco), 1% L-glutamin (Gibco), 1% mieszaniny antybiotyków (Gibco) i 100 μ M witaminy C (Sigma), wzbogacony czynnikami różnicującymi: 10 nM deksametazonem (Sigma), witaminą D3 oraz 10 mM beta-glicerofosforanem (Sigma). Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, przy kontrolowanej wilgotności względnej i 5-procentowej zawartości CO₂.

W wybranych punktach czasowych, tj.: 1, 7, 14 i 21 dnia oznaczano ilość kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), ekspresję oraz aktywność fosfatazy zasadowej w hodowli komórek osteogennych. Do pomiaru ilości DNA, pozwalającej uzyskać informacje o liczbie komórek, a tym samym o ich przeżywalności, posłużył test PicoGreen (Invitrogen), polegający na fluorescencyjnym barwieniu DNA.

Also, earlier findings of our team (unpublished data) carried out with use of PCL, with different surface modifications, suggested that this material influences the increase of the activity of the early marker of osteogenic cell differentiation – alkaline phosphatase (ALP) in the culture of the osteoblastic cellular line MG-63. These findings demonstrated that in the case of cells being in direct contact with poly(ϵ -caprolactone), whose surface was etched with sodium hydroxide, the activity of ALP was as much as 4 times higher in relation to the value received on the surface of the standard tissue culture dishes. Therefore, the present work aims to assessing the impact of poly(ϵ -caprolactone) on the expression and activity of alkaline phosphatase in human bone derived cells that have successfully been used in bone tissue engineering [6,7].

Materials and methods

The poly(ϵ -caprolactone) (Aldrich, nominal $M_n = 80$ kDa, $M_w/M_n < 2$) was purified by dissolving in acetone (6% w/v, 40°C, 24 h), precipitation in distilled water at R.T. upon intensive stirring, rinsing in distilled water at constant stirring for 48 h with frequent water exchange followed by vacuum drying.

PCL discs were prepared by the following procedure. The purified PCL was frozen in liquid nitrogen and ground in a laboratory mill. Pre-weighed amounts (0.41 g) of the polymer were poured into cylindrical wells (15 mm diameter, 2 mm depth) of a Teflon mould. The mould was placed in a vacuum oven, air was removed and the temperature was subsequently increased to 80°C (i.e. ca. 20 degrees above the melting point of PCL) for a short time necessary for the polymer to melt and fill the wells uniformly. After cooling, the mould was disassembled, the solidified PCL discs were removed from the mould, vacuum-packed and sterilized by gamma rays (25 kGy).

Human bone derived cells (HBDCs) isolated from the postsurgery trabecular bone chips which would otherwise be discarded were used in the study. All procedures were approved by the Local Ethics Committee of the Warsaw Medical University. The isolation procedure was based on the protocols described by Gallagher [8], with modification [9]. The cells were cultured for 21 days on the poly(ϵ -caprolactone) surface and standard tissue culture (24-well plate (Nunc)) surface to serve as a control material. The culture medium consisted of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco), 1% antibiotic-antimycotic mixture (Gibco), 100 μ M L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma) and differentiation factors, such as 10 nM dexamethazone (Sigma), vitamin D3 and 10 mM beta-glycerophosphate (Sigma). The cells were maintained in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

The amount of deoxyribonucleic acid (DNA), expression and the activity of alkaline phosphatase in the osteogenic cells were determined at selected time points: on 1, 7, 14 and 21 day of culture. For the measurement of the DNA content, which indicates the cell number and their survivability, PicoGreen assay (Invitrogen) was used, where DNA is subject to fluorescent staining.

Gene expression of alkaline phosphatase was analyzed using quantitative real time polymerase chain reaction (Real-time PCR). For this purpose, total RNA was isolated using the RNasy Micro Kit (Qiagen) and reverse transcribed into cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Gene amplification and detection was performed with Step One 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using FAM labeled primers for the qRT-PCR (Applied Biosystems). The internal control for the target RNA alkaline phosphatase (ALP; Hs01029144_m1) was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Hs99999905_m1).

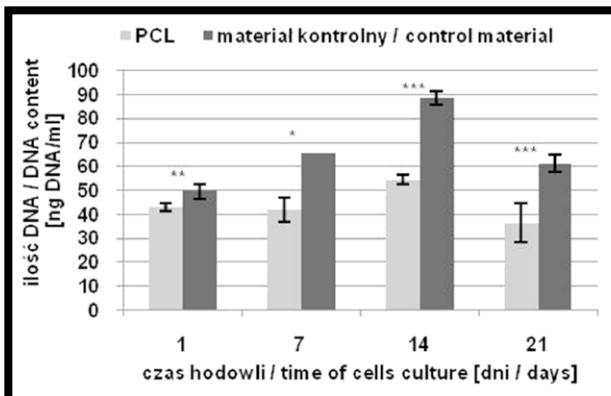
Ekspresję genu fosfatazy zasadowej analizowano z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR). W tym celu przy użyciu kitu RNasy Micro Kit (Qiagen) wyizolowano całkowite RNA, które następnie zostało przepisane na cDNA za pomocą High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją. Amplifikacja i detekcja genu została przeprowadzona w trakcie jednej reakcji z wykorzystaniem systemu Step One 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystem), zawierającego wyznakowane fluorescencyjnie (FAM) startery. Kontrolę endogenną dla ekspresji fosfatazy zasadowej (ALP; Hs01029144_m1) stanowiła dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH; Hs99999905_m1). W celu wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanego genu zastosowano metodę komparatywną ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Aktywność ALP oznaczano w lizatach, metodą kolorymetryczną, w której wykrywany jest barwny produkt reakcji, przy użyciu kitu Alkaline Phosphatase Activity assay (Sigma). Aktywność fosfatazy zasadowej została znormalizowana do ilości DNA w komórkach.

Wszystkie oznaczenia przeprowadzono niezależnie na komórkach pozyskanych od dwóch różnych dawców.

Wyniki i dyskusja

Zarówno na materiale testowanym – poli(ϵ -kaprolakton), jak i kontrolnym do 14 dnia następował przyrost ilości DNA, świadczący o wzroście liczby komórek, natomiast 21 dnia obserwowano spadek ilości DNA w hodowli (RYS. 1), co może świadczyć o zahamowaniu wzrostu liczby komórek związanym z ich przejściem w fazę różnicowania w kierunku dojrzających osteoblastów. Faza ta charakteryzuje się zahamowaniem proliferacji komórek i wzrostem ekspresji markerów typowych dla fenotypu komórek będących w trakcie różnicowania, takich jak fosfataza zasadowa, kolagen typu I, osteopontyna czy osteokalcyna [10]. Na powierzchni PCL przeżywalność komórek była niższa w stosunku do wartości otrzymanych dla standardowego naczynia hodowlanego. Może to wynikać z faktu, iż mniejsza liczba komórek bezpośrednio po wysianiu zaadherowała do powierzchni poli(ϵ -kaprolaktonu) w porównaniu z podłożem kontrolnym.



RYS. 1. Ilość DNA w hodowli komórek osteogenicznych. Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

FIG. 1. DNA content in bone derived cells culture. The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

Changes in the relative expression of the target gene were calculated using $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

ALP activity was determined in cell lysates, using a colorimetric method that detected the color reaction product using the Alkaline Phosphatase Activity assay (Sigma). Alkaline phosphatase activity was normalized to the amount of DNA in the cells.

All assays were carried out independently on cells obtained from two different donors.

Results and Discussion

Both on the tested material – poly(ϵ -caprolactone) – and on the control material up to 14th day took place an increase in the DNA content, which indicates an increase in the cell number, however, on 21st day a decrease in the amount of DNA was observed in the cell culture (FIG. 1), suggesting a setback of the growth of the cell number associated with the *transition phase* from proliferation to *differentiation into mature osteoblasts*. The differentiation phase is characterized by an inhibition of cell proliferation and an increase of the expression of markers which are typical for the phenotype of cells that are in the process of differentiation, including alkaline phosphatase, type I collagen osteopontin and osteocalcin [10]. On the surface of PCL the survivability of cells was lower compared to the values obtained for the standard tissue culture dishes. It may have resulted from the fact that a lower number of cells adhered directly after seeding to the surface of the poly(ϵ -caprolactone) in comparison with the control material.

The ALP mRNA expression was higher in the cell culture on poly(ϵ -caprolactone) compared to the control material and reached the highest value on day 7 of culture (FIG. 2). In a similar way to the gene expression, the phosphatase activity in cells cultured on the surface of PCL was higher than the values received for the control material. In the case of cells cultured in direct contact with the poly(ϵ -caprolactone), there was observed an up to 10-fold increase in the ALP activity on day 14, compared to day 1, while on the tissue culture dish surface only a 5-fold increase in the enzyme activity was noted (FIG. 3). The increased expression and the activity of this early marker of osteogenic differentiation, the alkaline phosphatase, may attest to the fact that the cells entered the path of differentiation [11]. However, the ALP is a non-specific marker of differentiation [12] and only on the basis of its elevated level it cannot be clearly inferred about cell differentiation towards osteoblasts.

Conclusions

The contact of human osteoblasts with the surface of poly(ϵ -caprolactone) causes an increased gene expression of alkaline phosphatase and an increased alkaline phosphatase activity. The high level of ALP, both on the RNA level as well as on the protein, does not prove the impact of the PCL on the differentiation process of osteogenic cells into mature osteoblasts, because this enzyme is a non-specific marker of the differentiation process. However the obtained results justify undertaking further studies on the possible impact of poly(ϵ -caprolactone) on osteoblast differentiation.

Acknowledgments

This study was supported by a research grant No. WB1/2010 financed by the Medical University of Warsaw and by a grant No 3 T08A 001 30 financed by the Polish Ministry of Science and Higher Education.

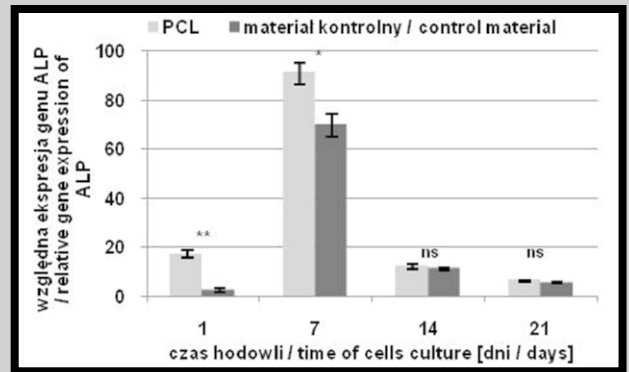
Ekspresja mRNA ALP była wyższa w hodowli na poli(ϵ -kaprolaktonie) w stosunku do podłoża kontrolnego i największą wartość osiągnęła 7 dnia hodowli (RYS. 2). Analogicznie do ekspresji genu, aktywność fosfatazy dla komórek hodowanych na powierzchni PCL przewyższała wartości otrzymane dla kontroli. W przypadku komórek hodowanych w bezpośrednim kontakcie z poli(ϵ -kaprolaktonem) 14 dnia obserwowano aż 10-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do dnia 1, zaś na podłożu standardowym odnotowano tylko 5-krotny wzrost aktywności enzymu (RYS. 3). Podwyższona ekspresja oraz aktywność tego wczesnego markera różnicowania osteogennego jakim jest fosfataza zasadowa mogą świadczyć o tym, iż komórki weszły na drogę różnicowania [11]. ALP nie jest jednak specyficznym markerem różnicowania [12] i tylko na podstawie jej podwyższonego poziomu nie można jednoznacznie wnioskować o różnicowaniu komórek w osteoblasty.

Wnioski

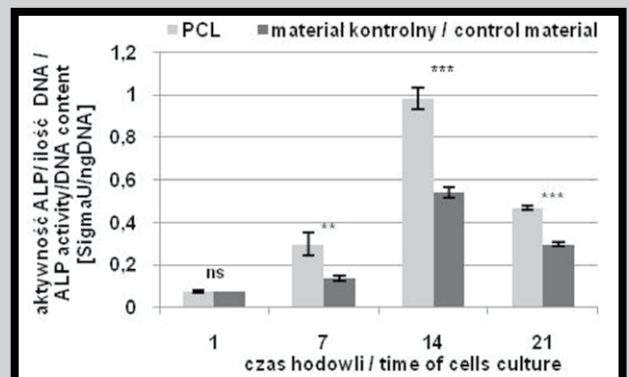
Kontakt ludzkich komórek izolowanych z tkanki kostnej z powierzchnią poli(ϵ -kaprolaktanu) powoduje podwyższoną ekspresję genu fosfatazy zasadowej oraz podwyższoną aktywność tego enzymu. Fosfataza zasadowa nie jest specyficznym markerem osteoblastów, jednakże jej podwyższony poziom towarzyszy wczesnym etapom różnicowania w kierunku fenotypu komórek osteogennych. Uzyskane wyniki uzasadniają podjęcie dalszych badań nad możliwym wpływem poli(ϵ -kaprolaktanu) na różnicowanie osteoblastów.

Podziękowania

Praca zrealizowana w ramach projektu WB1/2010 finansowanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny oraz badawczego projektu własnego MNiSzW Nr 3 T08A 001 30.



RYS. 2. Ekspresja genu fosfatazy zasadowej (ALP). Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; * $p < 0.0005$). FIG. 2. Gene expression of alkaline phosphatase (ALP). The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).**



RYS. 3. Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP). Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; * $p < 0.0005$). FIG. 3. Alkaline phosphatase activity (ALP). The results were statistically analyzed with Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).**

Piśmiennictwo

- [1] Roosa S.M., Kempainen J.M., Moffitt E.N., Krebsbach P.H., Hollister S.J.: The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *Journal of Biomedical Materials Research* 92 (2010) 359-68.
- [2] Schuckert K.H., Jopp S., Teoh S.H.: Mandibular Defect Reconstruction Using Three-Dimensional Polycaprolactone Scaffold in Combination with Platelet-Rich Plasma and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: De Novo Synthesis of Bone in a Single Case. *Tissue Engineering* 15 (2009) 493-499.
- [3] Aronin C.E., Cooper J.A., Sefcik L.S., Tholpady S.S., Ogle R.C., Botchwey E.A.: Osteogenic differentiation of dura mater stem cells cultured in vitro on three-dimensional porous scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) fabricated via co-extrusion and gas foaming. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1187-1197.
- [4] Zreiqat H., Ramaswamy Y., Wu C., Paschalidis A., Lu Z., James B., Birke O., McDonald M., Little D., Dunstan C.R.: The incorporation of strontium and zinc into a calcium-silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31 (2010) 3175-3184.
- [5] Reed C.R., Han L., Andrady A., Caballero M., Jack M.C., Collins J.B., Saba S.C., Lobo E.G., Cairns B.A., Aalst J.A.: Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds. *Annals of Plastic Surgery* 62 (2009) 505-512.
- [6] Woźniak P., Bil M., Ryszkowska J., Wychowański P., Wróbel E., Ratajska A., Hoser G., Przybylski J., Kurzydowski K.J., Lewandowska-Szumieł M.: Candidate bone-tissue-engineered product based on human-bone-derived cells and polyurethane scaffold. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2484-2493.

References

- [7] Causa F., Netti P.A., Ambrosio L., Ciapetti G., Baldini N., Pagani S., Martini D., Giunti A.: Poly- ϵ -caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *Journal of Biomedical Materials Research* 76A (2006) 151-162.
- [8] Gallagher J.A., Gundle R., Beresford J.N.: Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblasts) from human bone. *Methods in Molecular Medicine* 2 (1996) 233-62.
- [9] Kudelska-Mazur D., Lewandowska-Szumieł M., Mazur M., Komender J.: Osteogenic cell contact with biomaterials influences phenotype expression. *Cell and Tissue Banking* 6 (2005) 55-64.
- [10] Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S, Lian J.B., Stein G.S.: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology* 143 (1990) 420-430.
- [11] Quarles L.D., Yohay D.A., Lever L.W., Caton R., Wenstrup R.J.: Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research* 7 (1992) 683-692.
- [12] Whited B.M., Whitney J.R., Hofmann M.C., Xu Y., Rylander M.N.: Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. *Biomaterials* 32 (2011) 2294-2304.