

WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) NA ADHERENCJĘ OSTEObLASTÓW W HODOWLI

RADOSŁAW M. OLKOWSKI*, KATARZYNA FILIPCZAK**, PIOTR ULAŃSKI**, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*

*ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA, AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE, UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA
**INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA, UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),175-177]

Wstęp

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest polimerem, który ze względu na biogodność, nietoksyczność i powolny czas bioreabsorpcji uważany jest za materiał obiecujący jako rusztowanie do transplantacji komórek kostnych [1]. Właściwości powierzchniowe PCL, zwłaszcza niska energia powierzchniowa, utrudniają jednak adhezję komórek kostnych [2]. Adsorpcja hydroksyapatytu na powierzchni PCL mogłaby ułatwić kontakt osteoblastów z tym polimerem, dzięki stworzeniu kompozytu przypominającego naturalną budowę kości ludzkiej [3]. Wykazano, że apatyt o budowie zbliżonej do hydroksyapatytu naturalnego osadza się na powierzchni PCL pod wpływem traktowania roztworami NaOH i SBF (Simulated Body Fluid) [4]. Celem pracy jest ocena wpływu, jaki inkubacja w obecności NaOH i SBF wywiera na biogodność poli(ϵ -kaprolaktonu).

Materiały i metody

Próbki PCL wytworzone zostały w postaci krążków o średnicy 6,2 mm i wysokości 1 mm. Przygotowano dwa rodzaje próbek - część została wykonana przez rozpuszczenie PCL w acetonie i wytrącenie polimeru z mieszaniny woda/aceton (PCL-1), część natomiast przez rozpuszczenie i wytrącenie PCL w tych samych warunkach, dodatkowo ze stopieniem próbek w temp. 80°C (PCL-2). Próbki poddano modyfikacji powierzchni. Próbki moczone były w 10M NaOH przez 48 godzin w temperaturze 50°C. Następnie przemywano je wodą i część z nich suszono, a część inkubowano w roztworze SBF w 37°C przez 24 godziny. Próbki sterylizowano za pomocą promieniowania gamma o dawce 25kGy. Próbki polimerów umieszczono w studzienkach mikropłytki hodowlanej, 96-studzienkowej i przez 12h inkubowano w pełnej pożywce hodowlanej (DMEM + FBS + L-glutamina + antybiotyki/antymikotyki + kwas askorbinowy) w temperaturze 37°C. W doświadczeniu wykorzystano osteoblasty ludzkie z hodowli pierwotnej. Do 96-studzienkowej płytki hodowlanej nanoszono zawiesinę komórek w gęstości 5000 komórek na studzienkę. Po 24 h hodowli usunięto pożywkę, a polimery przepłukano roztworem buforu fosforanowego PBS i utrwalone komórki poddano obserwacji morfologicznej. Morfologię komórek oceniano oglądając powierzchnię próbek w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse TE2000-U, przy powiększeniu 100x. Na każdej próbce (pole powierzchni 30,2 mm²) obserwowano dwa pola widzenia (pole

INFLUENCE OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) SURFACE MODIFICATION ON OSTEObLAST ADHESION IN CULTURE

175
.....

RADOSŁAW M. OLKOWSKI*, KATARZYNA FILIPCZAK**, PIOTR ULAŃSKI**, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*

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

**INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, Wróblewskiego 15, 93-590 Łódź, Poland

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),175-177]

Introduction

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a polymer considered a promising material as a scaffold for bone cells transplantation, because of its biocompatibility, non-toxicity and long time of biodegradation [1]. However, surface properties of PCL, especially low surface energy, disturb the adherence of bone cells [2]. Adsorption of hydroxyapatite on the surface of PCL could facilitate osteoblast contact with this material, because of constituting a composite with a structure similar to natural bone [3]. It was shown, that apatite with a structure similar to natural hydroxyapatite settles on the PCL surface after treating with NaOH and SBF [4]. The aim of the present study is to estimate the influence of incubation with NaOH and SBF on poly(ϵ -caprolactone) biocompatibility.

Materials and methods

Samples of PCL were prepared in the shape of discs, of a diameter of 6.2 mm and height of 1 mm. Two types of samples were examined - some were made by dissolving PCL in acetone and precipitating the polymer from a mixture of acetone/water (PCL-1), and some by dissolving and precipitating PCL in the same conditions, with final melting of the samples at 80°C (PCL-2). The samples were soaked in 10M NaOH at 50°C. After 48h they were rinsed, half was dried and half was incubated in SBF solution at 37°C for 24 h. Samples were sterilized by exposure to a dose of 25 kGy of ionising radiation. Next, the samples of polymer were put in wells of 96-well microplate and incubated for 12h in culture medium (DMEM + FBS + L-glutamine + antibiotic/antimycotic + ascorbic acid) at 37°C. Human osteoblasts from primary culture were used in this experiment. The suspension of cells, with a density of 5000 cells per well was put into 96-well culture microplate. After 24 h the medium was removed, the polymers were rinsed with a phosphate buffer and the fixed cells were observed. Cell morphology was estimated by observation of the surface of the samples under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U). Two visual fields (area 3.5 mm²) were observed on each sample (area 30.2 mm²). The fields did not cover each other nor include sample edges. Their summarised field of observation covers 23% of the sample area. On every visual field cells were counted - spread cells were counted apart from non-spread cells. Compact, spherical or ellipsoidal objects were recognised as non-spread cells. Irregular or spindleform cells were recognised as spread.

powierzchni 3,5 mm²), nie zachodzące na siebie, nie obejmujące brzegów próbki, obejmujące łącznie 23% całej powierzchni. W każdym polu widzenia liczono widoczne komórki - osobno liczono komórki nierozpłaszczone, osobno rozpłaszczone. Za komórki nierozpłaszczone uznawano obiekty zwarte, kształtu kulistego bądź elipsoidalnego, za rozpłaszczone natomiast komórki o kształcie nieregularnym lub wrzecionowatym, z widocznymi wypustkami.

Wyniki

Wyniki przedstawiono w postaci wykresu, jako procent liczby komórek na podłożu kontrolnym, tj. TCPS (RYS.1) oraz jako procent komórek rozpłaszczonych w stosunku do całkowitej liczby osteoblastów na danym podłożu (RYS.2). Skróty oznaczają:

- TCPS - polistyren - standardowe podłoże do hodowli komórek;
- PCL-1 - PCL wytrączony z mieszaniny woda/acetone;
- PCL-2 - PCL wytrączony z mieszaniny woda/acetone i stopiony;
- NaOH - materiał poddany inkubacji w 10 M NaOH;
- SBF - materiał poddany inkubacji w SBF.

Na powierzchni PCL-1 zaobserwowano mniej komórek, niż na podłożu kontrolnym. Od 41% do 52% komórek na PCL-1 uległo rozpłaszczeniu. Do PCL-2 zaadherowała większa liczba komórek, niż do TCPS i PCL-1. Najwięcej komórek zaobserwowano na PCL-2 SBF (197% kontroli). Proporcja komórek rozpłaszczonych do wszystkich komórek nie osiąga na PCL-2 poziomu kontroli (92%), ale jest wyższa, niż na PCL-1 i wynosi od 67% do 82%.

Dyskusja

Rekonstrukcja tkanki metodami inżynierii tkankowej opiera się na hodowli komórek in vitro w bezpośrednim kontakcie z biomateriałem [5]. Osteoblasty w hodowli in vitro wymagają do proliferacji i różnicowania podłoża, do którego mogą przyczepić się i rozpłaszczyć [6], konieczne jest zatem nadanie potencjalnemu rusztowaniu takich właściwości powierzchniowych, które umożliwią adhezję komórek kostnych.

Przedstawione powyżej wyniki doświadczenia wskazują, że inkubacja w NaOH i SBF, jak również w każdym z tych roztworów osobno, powoduje, że do powierzchni PCL rozpuszczonego w acetonie i topionego (PCL-2) adheruje większa liczba komórek niż do próbek niemodyfikowanych. Liczba komórek na PCL-2 traktowanym NaOH i SBF przekracza liczbę komórek w kontroli, natomiast procent komórek rozpłaszczonych jest najwyższy na TCPS. Modyfikacja powierzchni PCL-2 umożliwia większej liczbie osteoblastów adhezję, prawdopodobnie dzięki rozwinięciu powierzchni, stworzeniu lepszych warunków do adsorpcji białek surowicy i pojawieniu się kryształów apatytu. Fakt, że procent komórek rozpłaszczonych zmniejsza się na powierzchniach modyfikowanych wskazuje jednak, że modyfikacja ułatwia jedynie początkowe etapy adhezji - kontakt i przyłgnięcie osteoblastów do biomateriału, natomiast faza rozpłaszczenia ulega opóźnieniu. Ponieważ stosunek komórek rozpłaszczonych do całej populacji osteoblastów zmniejsza się w niewielkim stopniu, wydaje się, że funkcje komórek na modyfikowanym PCL-2 nie ulegną zaburzeniu. Obserwacje wykonano jedynie po 24 h od wysiania komórek na biomateriały, konieczne jest zatem przeprowadzenie badań w późniejszych punktach czasowych, dla sprawdzenia dalszego funkcjonowania osteoblastów na powierzchni PCL-2. Zwraca uwagę duża liczba komórek adherujących do PCL-2 traktowanego jedynie SBF, w porównaniu z próbkami

Results

Results were shown in a diagram, as number of cells on surface of investigated materials as a percentage of control (cells on TCPS) (FIG.1) and as a number of spread cells divided by the total cell number on a sample (in percent) (FIG.2).

- TCPS - tissue culture polystyrene
- PCL-1 - PCL precipitated from acetone/water mixture
- PCL-2 - PCL precipitated from acetone/water mixture and melted
- NaOH - material incubated in 10 M NaOH;
- SBF - material incubated in SBF.

Fewer cells were observed on PCL-1 than on control. 41-52% of cells on PCL-1 were spread. More cells adhered to PCL-2, than to TCPS and PCL-1. Most osteoblasts were observed on PCL-2 SBF-treated (197% of control). The ratio of spread to all cells is higher on TCPS (92%) than on PCL-2 (67-82%).

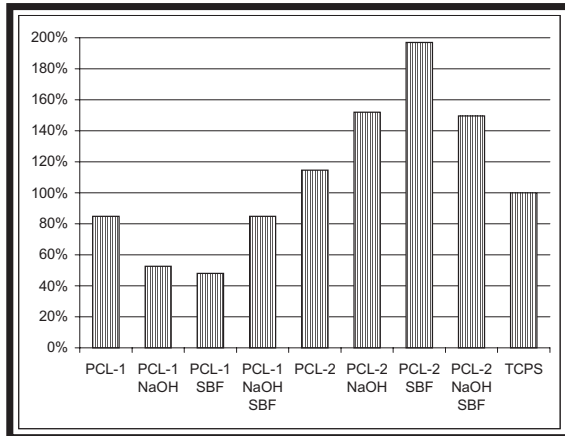
Discussion

Reconstruction of tissue by methods of tissue engineering is based on cell culture in vitro in direct contact with biomaterial [5]. For proliferation and differentiation, osteoblasts in vitro need support to adhere and spread [6], so potential scaffold has to have surface properties that facilitate bone cells adherence.

The results of experiment, presented above indicate that incubation in NaOH and SBF, and in each of these solutions apart, causes that more cells adhere to the surface of PCL dissolved in acetone and melted (PCL-2) than to non-modified samples. The number of cells on PCL-2 exceeds the number on the control. The percent of spread cells is highest on TCPS. PCL-2 surface modification enables adherence of a greater number of osteoblast, probably because of a developed area, creation of better conditions for serum protein adsorption and appearance of apatite crystals. Percent of spread cells decreases on modified surfaces, which indicates that modification facilitates only initial stages of adhesion - the contact and the attachment to the biomaterial. The spreading stage is delayed. It seems that the cell function on modified PCL-2 is not disturbed, because the ratio of spread cells to the whole population decreases only slightly. Observations were performed only 24 h after cell seeding on the biomaterial, so it is necessary to continue investigations at later time points, to confirm the later function of osteoblasts on PCL-2 surface. It should be noticed that the high number of cells was adhered to PCL-2 SBF-treated in comparison to NaOH-SBF-treated samples. The relationships between surface topography, hydroxyapatite adsorption and osteoblast adherence need further explanation.

The reduction of cell adhesion to acetone-precipitated PCL (PCL-1) occurs after an NaOH or SBF treatment (FIG.1). Using both NaOH and SBF causes that attractivity of PCL-1 is similar to non-treated PCL-1. Incubation with NaOH and SBF causes that the percentage of spread cells increases as compared to non-modified PCL-1, however it never reaches the level of PCL-2 and TCPS (FIG.2). The influence of these solutions on two sorts of PCL is different which may be related to the differences in the topography of sample surface.

Preliminary studies have shown that the surface of PCL-1 is more extended than the surface of PCL-2. This, as well as soaking PCL-1 samples in NaOH or SBF, may change the mechanical properties of the support, which could affect cell behaviour.



**RYS. 1. Liczba komórek na powierzchni próbek materiałów jako % kontroli (TCPS).
FIG. 1. Number of cells on surface of materials as percentage of control (TCPS).**

poddanymi działaniu NaOH i SBF. Związek pomiędzy topografią powierzchni i adsorpcją hydroksyapatytu, jak również wpływ tych czynników na adhezję osteoblastów, pozostaje kwestią do wyjaśnienia.

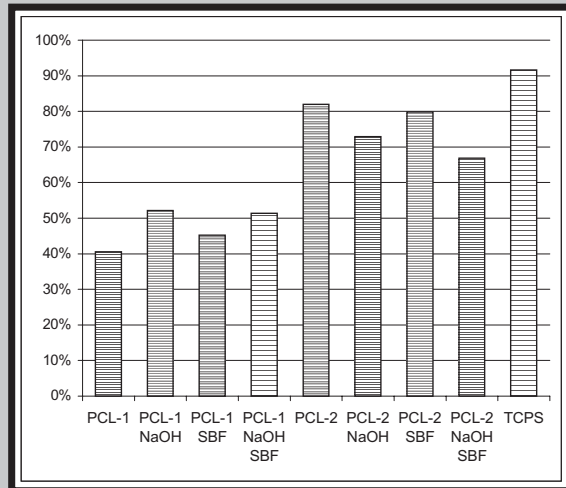
Traktowanie za pomocą NaOH lub SBF PCL wytrącanego z acetonu (PCL-1) powoduje zmniejszenie liczby komórek adhezujących do tego polimeru. Użycie obu tych roztworów powoduje, że atrakcyjność PCL-1 dla osteoblastów jest zbliżona do PCL-1 niemodyfikowanego (RYS.1). Inkubacja z NaOH i SBF powoduje, że procent komórek rozplaszczonych zwiększa się w stosunku do próbek niemodyfikowanych, nie osiągając jednak stopnia rozplaszczania osteoblastów na PCL-2 i TCPS (RYS.2). Odmienne wpływy roztworów na właściwości dwóch typów PCL może być związany z różnicami w topografii powierzchniowej próbek. Wstępne obserwacje wykazały, że PCL-1 ma powierzchnię bardziej rozwiniętą niż PCL-2. To, a także płukanie próbek PCL-1 w NaOH lub SBF może zmieniać właściwości mechaniczne podłoża, co także może mieć wpływ na zachowanie się komórek.

Wnioski

W pracy wykazano, że inkubacja poli(ϵ -kaprolaktonu) wytrącanego z acetonu i topionego, w NaOH i SBF powoduje wzrost liczby osteoblastów adhezujących do tego polimeru. Dalsze badania nad modyfikacją powierzchni PCL mogą przynieść interesujące efekty z punktu widzenia zastosowania tego tworzywa w inżynierii tkankowej kości.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu badawczego zamawianego nr 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06 oraz z grantu Akademii Medycznej NZME/W2.



**RYS. 2. Komórki rozplaszczone jako procent wszystkich komórek na danym materiale.
FIG. 2. Spread cells as percentage of all cells on the material.**

Conclusions

Modification of poly(ϵ -caprolactone) precipitated from acetone and melted by means of its incubation in NaOH and SBF promotes osteoblasts adhesion to this polymer. Further studies on PCL surface modification may bring interesting results which might be applied to PCL scaffolds used in tissue engineering.

Acknowledgements

The present study has been financed by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant No. 05/PBZ-KBN-082/T08/2002) and by the Medical University of Warsaw (grant NZME/W2)

Piśmiennictwo

References

- [1] J. Pachence, J. Kohn, Biodegradable polymers, in: R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (Eds.), Principles of tissue engineering, Academic Press, New York, 2000, pp. 263-283.
- [2] J. Y. Lim, X. Liu, E. A. Vogler, H. J. Donahue, J Biomed Mater Res A 68 (2004) 504-512.
- [3] M. Jarcho, J. F. Kay, K. I. Gumaer, R. H. Doremus, H. P. Drobeck, J Bioeng 1 (1977) 79-92.
- [4] A. Oyane, M. Uchida, C. Choong, J. Triffitt, J. Jones, A. Ito, Biomaterials 26 (2005) 2407-2413.
- [5] R. Langer, J. P. Vacanti, Science 260 (1993) 920-926.
- [6] A. Hunter, C. W. Archer, P. S. Walker, G. W. Blunn, Biomaterials 16 (1995) 287-295.