

WŁÓKNISTE PODŁOŻA DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ KOŚCI: HODOWLE KOMÓREK MG 63 W WARUNKACH STATYCZNYCH I DYNAMICZNYCH

JOANNA BUCZYŃSKA¹, ELŻBIETA PAMUŁA¹,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ¹, LUCIE BACAKOVA², MARTIN PARIZEK²,
JAROSLAV CHLUPAC², TERESA MIKOŁAJCZYK³, MACIEJ BOGUŃ³,
PIOTR DOBRZYŃSKI⁴

¹ AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

² AKADEMIA NAUK REPUBLIKI CZESKIEJ, INSTYTUT FIZJOLOGII,
VIDENSKA 1083, 142-20 PRAGA, REPUBLIKA CZESKA

³ POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MARKETINGU I TEKSTYLÓW,
KATEDRA WŁÓKNIEN SZTUCZNYCH,
UL. ŻEROMSKIEGO 116, 90-543 ŁÓDŹ, POLAND

⁴ POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34/20, 41-819 ZABRZE, POLAND

Streszczenie

Resorbowalne włókna z kopolimeru L-laktydu z glikolidem (PLG) i PLG z hydroksyapatytem rozproszonym w ich objętości (PLG-HAP) zostały otrzymane metodą formowania z roztworu. Włókna zostały przetworzone w trójwymiarowe podłoża za pomocą metody łączenia włókien. Mikrostrukturę otrzymanych podłoży scharakteryzowano za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Wykazano, że podłoża miały różną porowatość, wielkość i orientację pojedynczych włókien.

Oddziaływanie włóknistych podłoży z komórkami kostnymi MG 63 było badane *in vitro* w warunkach statycznych i dynamicznych. Liczba komórek i ich morfologia były oceniane po 3 i 7 dniach od założenia hodowli. Badania wykazały, że liczba komórek na materiałach włóknistych rosła wraz z czasem prowadzenia hodowli, chociaż była znacznie niższa niż na płaskiej powierzchni kontrolnej (polistyren do celów kultur komórkowych). W dynamicznych warunkach hodowli obserwowano różną proliferację komórek w zależności od rodzaju użytego podłoża: na PLG występował spadek, zaś na PLG-HAP istotny wzrost liczby komórek. Wyniki sugerują, że obecność cząstek hydroksyapatytu rozproszonych w objętości włókien polimerowych poprawia adhezję i proliferację osteoblastów.

[Inżynieria Biomateriałów, 65-66, (2007), 1-6]

Wprowadzenie

Polimery resorbowalne są często używane do wytwarzania porowatych podłoży dla inżynierii tkankowej. Polilaktydy (PLLA, PDLA oraz PDLLA), poliglikolid (PGA) i ich kopolimery (PGLA) są materiałami biogodnymi, mają dobre właściwości mechaniczne i mogą być stosunkowo łatwo przetwarzane w trójwymiarowe struktury [1-4].

FIBROUS SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING: STATIC AND DYNAMIC IN VITRO STUDIES WITH MG 63 CELLS

JOANNA BUCZYŃSKA¹, ELŻBIETA PAMUŁA¹,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ¹, LUCIE BACAKOVA², MARTIN PARIZEK²,
JAROSLAV CHLUPAC², TERESA MIKOŁAJCZYK³, MACIEJ BOGUŃ³,
PIOTR DOBRZYŃSKI⁴

¹ AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

² INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,
ACADEMY OF SCIENCE OF CZECH REPUBLIC,
VIDENSKA 1083, 142-20 PRAGUE, CZECH REPUBLIC

³ TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
FACULTY OF TEXTILE ENGINEERING AND MARKETING,
DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES,
ZEROMSKIEGO 116 STR, 90-543 ŁÓDŹ, POLAND

⁴ CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34/20, 41-819 ZABRZE, POLAND

Abstract

Resorbable poly(L-lactide-co-glycolide) fibres (PLG) and poly(L-lactide-co-glycolide) fibres containing hydroxyapatite nanoparticles in volume of PLG fibres (PLG-HAP) were manufactured by solution spinning process. The resultant fibres were processed into three-dimensional scaffolds using fibre bounding method. The microstructure of resorbable scaffolds was characterized by stereomicroscope. The results show that the scaffolds have different fibrous architecture including porosity, size and arrangement of individual fibres.

The interaction of fibrous scaffolds with osteoblast-like MG 63 cells was tested *in vitro* in static and dynamic cell culture conditions. The number of adhering cells and their morphology were evaluated on days 3 and 7 after seeding. It was found that cell number increased with the cultivation time, although it was significantly lower than on control polystyrene dish (TCPS). During dynamic cultivation the number of cells decreased on PLG scaffolds, whereas on PLG-HAP scaffolds it increased. These results suggest that presence of hydroxyapatite distributed within the whole volume of resorbable polymer fibres promoted adhesion and proliferation of osteoblasts.

[Engineering of Biomaterials, 65-66, (2007), 1-6]

Introduction

In order to fabricate porous scaffolds for tissue engineering, synthetic biodegradable polymers are often used. Poly lactides (PLLA, PDLA and PDLLA), polyglycolide (PGA) and their copolymers (PLG) are biocompatible materials. Moreover, they have good mechanical properties and can be easily processed into three-dimensional structures [1-4].

Do otrzymywania trójwymiarowych materiałów podłożowych z tych polimerów stosuje się następujące metody: wyplukiwanie soli, separację faz, liofilizację oraz spienianie gazem [5-7]. Materiały otrzymane powyższymi metodami cechuje izotropowość budowy i właściwości, co niestety odróżnia je od naturalnej tkanki kostnej [8]. Nowym podejściem w projektowaniu materiałów dla inżynierii tkankowej jest otrzymywanie porowatych struktur zbudowanych z włókien resorbowlanych, które lepiej mogłyby odwzorować formę kolagenu, naturalnego składnika matrycy zewnątrzkomórkowej, który występuje w niemalże wszystkich tkankach, np. kościach, skórze, ścięgnach itd. Włóknista struktura kolagenu odgrywa istotną rolę w adhezji, namnażaniu i różnicowaniu się komórek [9]. Dlatego opracowywanie materiałów, które naśladują kolagen, może przyczynić się do odtwarzania tkanek zbliżonych do tkanek naturalnych. Włókniste materiały podłożowe można otrzymywać za pomocą następujących metod: elektrospinningu [9,10], formowania ze stopu [11] i formowania z roztworu [12]. Metoda formowania z roztworu pozwala na otrzymanie włókien z polimerów o różnym składzie i o masie cząsteczkowej mieszczącej się w szerokim zakresie. Zaletą tej metody jest to, że nie dochodzi do degradacji polimeru pod wpływem temperatury, która często ma miejsce podczas przędzenia ze stopu [12].

Celem pracy było otrzymanie włóknistych podłoży metodą łączenia włókien, oraz zbadanie zachowania się komórek kostnych MG 63 hodowanych na tych materiałach w warunkach statycznych i dynamicznych.

Materiały i metody

Otrzymywanie materiałów

Kopolimeryzacja glikolidu i L-laktydu była przeprowadzona w stopie w temperaturze 100°C z użyciem inicjatora cyrkonowego - $Zr(acac)_4$ - zgodnie z metodą opisaną poprzednio [13]. Stosunek molowy glikolidu do L-laktydu wynosił 16:84, liczbowo średnia masa cząsteczkowa wynosiła 190 000 D, a współczynnik polidispersji był równy 1,7.

Otrzymano dwa rodzaje włókien: włókna z kopolimeru L-laktydu z glikolidem (PLG) oraz włókna z kopolimeru L-laktydu z glikolidem zawierające 3% wag. hydroksyapatytu (PLG-HAP). Metoda otrzymywania hydroksyapatytu została opisana w pracy [14].

Włókna otrzymano metodą formowania z roztworu na moko zgodnie z metodą opisaną w naszej poprzedniej pracy [15]. Roztwór polimeru (12.5% oraz 15%) był przygotowany przez rozpuszczenie PGLA w N,N-dimetyloformamidzie (DMF). Stosowano przędzarkę wielkolaboratoryjną z dyszą przędzalniczą zawierającą 240 otworów i średnicy otworów 0,08 mm. Proces zestawienia prowadzono w kąpeli wodnej o stężeniu 35% i temperaturze 15°C. Do produkcji włókien PLG-HAP, proces rozciągu przeprowadzono jednoetapowo (kąpiel plastyfikacyjna o stężeniu 35% i temperaturze 45°C). Do produkcji włókien PLG proces rozciągu prowadzono dwuetapowo. Pierwszy etap prowadzony był w kąpeli plastyfikacyjnej o stężeniu 25% i temperaturze 35°C, podczas gdy drugi etap był prowadzony w parze wodnej o temperaturze 98°C. Po odparowaniu rozpuszczalnika włókna były suszone w temperaturze pokojowej.

Podłoża włókniste zostały otrzymane metodą łączenia włókien. Pojedyncze włókna o odpowiedniej masie (5 lub 10mg) zostały umieszczone w stalowej formie o średnicy 16mm i prasowane pod ciśnieniem 10MPa przez 3 sekundy. Otrzymano trzy rodzaje podłoży: pierwsze podłożo zawierało 5mg włókien PLG (PLG_5), drugie 10mg włókien PLG (PLG_10) i trzecie 10 mg włókien PLG-HAP (PLG-HAP_10).

Many methods have been developed to prepare these kinds of porous 3D biodegradable scaffolds, including solvent casting/salt leaching, phase separation, emulsion freeze drying and gas foaming [5-7]. Unfortunately, unlike the natural bone tissue, the scaffolds obtained by these techniques have isotropic properties [8]. A novel approach in scaffolds' designing is to produce porous structures made of resorbable fibres, which can better mimic collagen, a natural extracellular matrix component of nearly every tissue, such as bone, skin, tendon etc. The fibrillar structure of collagen is important for cell attachment, proliferation and differentiation [9]. Thus, mimicking structure of collagen may lead to engineered tissues more closely resembling native tissues. There are several methods to produce fibrous scaffolds, for example electrospinning [9,10] or melting and solution spinning [11,12]. The solution spinning method avoids degradation of the polymer by a high temperature spinning process and permits to produce polymer fibres over a wide range of molecular weights and concentrations [12].

The aim of this study was to produce polymeric fibrous scaffolds by a fibre bounding method, and to investigate the behaviour of osteoblast-like MG63 cells cultivated on these materials in static and dynamic conditions.

Materials and methods

Preparation of the material

Copolymerization of glycolide and L-lactide was performed in bulk with a $Zr(acac)_4$ initiator at 100°C, according to the method described elsewhere [13]. A molar ratio of glycolide to L-lactide was 16:84, number average molecular mass of copolymer was 190 000 D, and polydispersity index was 1.7.

Two different types of fibres were obtained: poly(L-lactide-co-glycolide) fibres (PLG) and poly(L-lactide-co-glycolide) fibres containing 3wt% of hydroxyapatite particles (PLG-HAP). The method of production of hydroxyapatite was described elsewhere [14].

The fibres were spun from the solution by a wet process, according to a method described in our previous paper [15]. Polymer solutions (12.5% and 15%) were prepared by dissolving of PGLA into N,N-dimethyl formamide (DMF). The laboratory spinning machine with spinnerets containing 240 orifices of diameter of 0.08 mm was used. The solidification process was carried out in a bath containing an aqueous solution of the solvent (35%) at 15°C. For production of PLG-HAP fibres, the drawing process was performed in a single stage (plastic bath containing 35% of the solvent at 45°C). To produce PLG fibres, the drawing process was performed in two stages. The first stage was performed in a plastic bath containing 25% of the solvent at 35°C, while the second stage was performed in water vapour at 98°C. Finally, the solvent was rinsed off, and the resultant fibres were dried at room temperature.

The scaffolds were produced by fibre bounding method. Particular weight of the individual fibres (5 or 10mg) was put in a mould with the diameter of 16mm and pressure of 10MPa was applied for 3 seconds. Three types of scaffolds were produced: the first scaffold consisted of 5mg of PLG fibres (PLG_5), and the second one of 10mg of PLG fibres (PLG_10), and the third one of 10mg of PLG-HAP fibres (PLG-HAP_10).

Evaluation of the material properties

The microstructure of scaffolds was studied by stereoscopy microscope SteREO Discovery.V8 (Zeiss, Germany) at magnification of 15 times.

Ocena właściwości materiałów

Obserwacji mikrostruktury materiałów dokonano za pomocą mikroskopu stereoskopowego Stereo Discovery V8 (Zeiss, Niemcy) przy powiększeniu 15 razy.

Hodowle komórkowe i ocena zachowania się komórek

Hodowle komórkowe były prowadzone w warunkach statycznych i dynamicznych. Pierwszą grupą materiałów (cztery próbki z każdego rodzaju materiałów) umieszczono w 12-dołkowych płytkach hodowlanych (Nunclon, średnica dołków 22mm), wysterylizowano w 70% etanolu przez 1 godzinę i przemyto roztworem soli fizjologicznej (PBS). Ludzkie komórki kostne z linii komórkowej MG 63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) zostały wysiane na materiałach przy początkowej gęstości 20 000 komórek/cm² (80 000 komórek/dołek) w 4 ml medium hodowlanego DMEM, zawierającym 10% surowicy cielęcej płodowej i 40 µg/ml gentamycyny. Jako materiał kontrolny stosowano dołek hodowlany (polistyren do celów kultur komórkowych - TCPS). Hodowlę prowadzono przez 3 i 7 dni w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ w powietrzu.

Do badań w warunkach dynamicznych, włókniste podłoża (po dwie próbki z każdego rodzaju) umieszczono w płytkach hodowlanych i hodowano na nich komórki przez 4 dni, zgodnie z metodą opisaną powyżej. Następnie materiały wraz z przylegającymi komórkami przeniesiono komory perfuzyjnej (PCS 3C Provitro GmbH, Berlin, Niemcy), podłączonej do pompy (Ismatec IPC, Provitro GmbH, Berlin, Niemcy) wymuszającej stały przepływ medium hodowlanego (1 ml/min). Hodowlę w warunkach dynamicznych prowadzono przez 2 następne dni.

W celu oceny morfologii komórek, próbki były płukane w PBS, utrwalane w 70% etanolu i wybarwiane za pomocą następujących odczynników: Texas Red C2-maleimide (10 ng/ml; Molecular Probes, Invitrogen) i Hoechst #33342 (5 µg/ml; Sigma-Aldrich). Następnie prowadzono obserwacje komórek za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX 51 (obiektyw 10x), wyposażonego w kamerę cyfrową DP 70. Po dwóch dniach hodowli w warunkach dynamicznych (6 dni po posianiu komórek) morfologia komórek na podłożach była oceniana za pomocą mikroskopu konfokalnego (DM 2500, Leica, Niemcy).

W celu określenia liczby komórek, komórki odczepiano od materiałów za pomocą roztworu trypsyny-EDTA (Sigma) i zliczano za pomocą analizatora Vi-Cell XR (Beckman Coulter, U.S.A.), stosując 50 pomiarów dla każdej próbki.

Cell culture conditions and evaluation of cell behavior

Cell culture was conducted in static and dynamic conditions. The first group of scaffolds (four samples per group) was placed into Nuclon Multidishes (12 wells with diameter of 22mm) and sterilized in 70% ethanol for 1 hour, followed by rinsing with phosphate buffered saline (PBS). Human osteoblast-like cells of cell line MG 63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were seeded on the scaffolds at the initial density of 20 000 cells/cm² (80 000 cells per well) in 4ml of Dulbecco-modified Eagle Minimum Essential Medium with 10% of fetal bovine serum and 40µg/ml gentamicin. As control material tissue culture polystyrene (TCPS) was used. The cells were cultured at 37°C in humidified air atmosphere containing 5% of CO₂ for 3 and 7 days.

For dynamic studies the scaffolds (two samples per group) were placed into Nuclon 12-well Multidishes and cultured for four days under the conditions described above. Then the samples were transferred to a perfusion chamber system (PCS 3C, Provitro GmbH, Berlin, Germany). High precision tubing pump with planetary drive (Ismatec IPC, Provitro GmbH, Berlin, Germany) was used with a flow of the medium of 1ml/min. Subsequently, the cells on fibrous scaffolds were cultured in these dynamic conditions for two days.

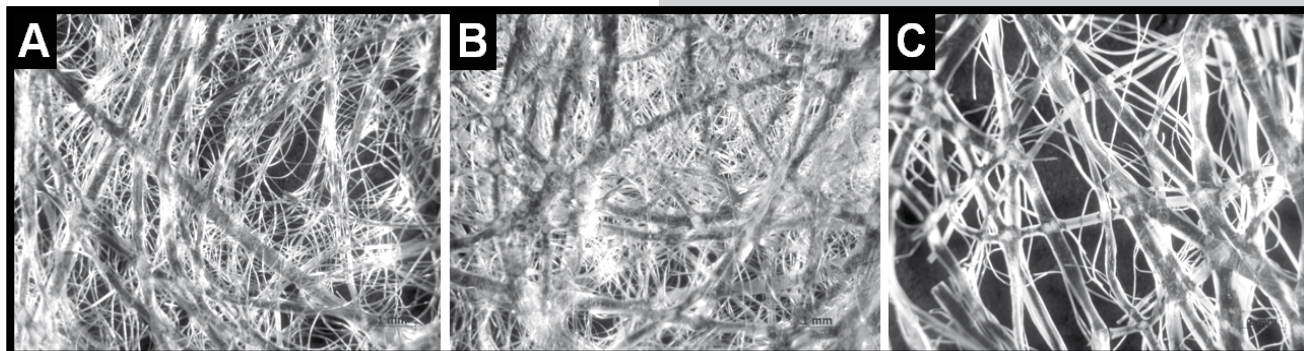
In order to evaluate morphology of cells, the samples were rinsed with PBS, fixed in 70% ethanol, stained with Texas Red C2-maleimide (10 ng/ml; Molecular Probes, Invitrogen) and Hoechst #33342 (5 µg/ml; Sigma-Aldrich) and then observed under an inverted microscope Olympus IX 51 (objective 10x) equipped with a digital camera DP 70. After 2 days of cultivation in the dynamic system (i.e., 6 days after seeding) the morphology of cells on scaffolds was observed using a confocal microscope Leica DM 2500 (Leica, Germany).

In order to measure the number of cells, the cells were detached from the scaffolds by trypsin-EDTA solution (Sigma) and counted in Vi-Cell XR Cell viability analyzer (Beckman Coulter, U.S.A.) using 50 measurements for each sample.

Result and discussion

Physical properties of the scaffolds

Three different kinds of scaffolds were obtained using fibre bounding method. The scaffolds were in the form of circles (diameter of 16 mm and thickness of 250-300µm). FIG.1 shows microstructure of the scaffolds observed under stereomicroscope. In PLG_5 and PLG_10 scaffolds the majority of fibres had the diameter of 30µm, as previously measured by optical microscopy (Lanamet) [15].



RYS.1. Mikrostruktura włóknistych podłoży: A) PLG_5, B) PLG_10, C) PLG-HAP_10, (mikroskop stereoskopowy, powiększenie 15x, skala=1 mm).

FIG.1. Microstructure of fibrous scaffolds: A) PLG_5, B) PLG_10, C) PLG-HAP_10, (stereomicroscope, original magnification 15x).

Właściwości materiałów

Stosując metodę łączenia włókien otrzymano trzy rodzaje podłoży o średnicy 16 mm i grubość 250-300 μ m. Na RYS.1 przedstawiono obrazy włóknistych podłoży obserwowane za pomocą mikroskopu stereoskopowego. W podłożach PLG_5 i PLG_10 większość włókien miała średnicę 30 μ m, zbliżoną do wartości zmierzonej za pomocą mikroskopu optycznego Lanometr [15]. Widoczne były również grubsze włókna (powstałe z połączenia kilku pojedynczych włókien) o średnicy około 200-300 μ m (RYS.1A,B). Podłoże PLG_10 miało mniejszą porowatość niż podłoże PLG_5, ponieważ zawierało dwa razy większą masę włókien (odpowiednio 10mg i 5mg). Podłoże PLG-HAP_10 składało się z włókien znacznie grubszych o średnicy 300-500 μ m, jakkolwiek cienkie włókna o średnicy około 30 μ m były również widoczne (RYS.1C). Podłoże PLG-HAP_10 charakteryzowało się najwyższą porowatością spośród badanych materiałów.

Hodowle komórkowe na podłożach PGLA

Na RYS 2 i 3 przedstawiono morfologię komórek MG 63 na badanych materiałach po 3 i 7 dniach hodowli w warunkach statycznych. Komórki przylegały do wszystkich materiałów, jednakże na płaskim materiale kontrolnym (TCPS) były one rozmieszczone bardziej jednorodnie i znacznie lepiej rozplaszczane. Po 7 dniach hodowli liczba komórek była znacznie wyższa na podłożach mających mniejszą porowatość, tj. PLG_10 i PLG-HAP_10, niż na podłożu PLG_5 o większej porowatości.

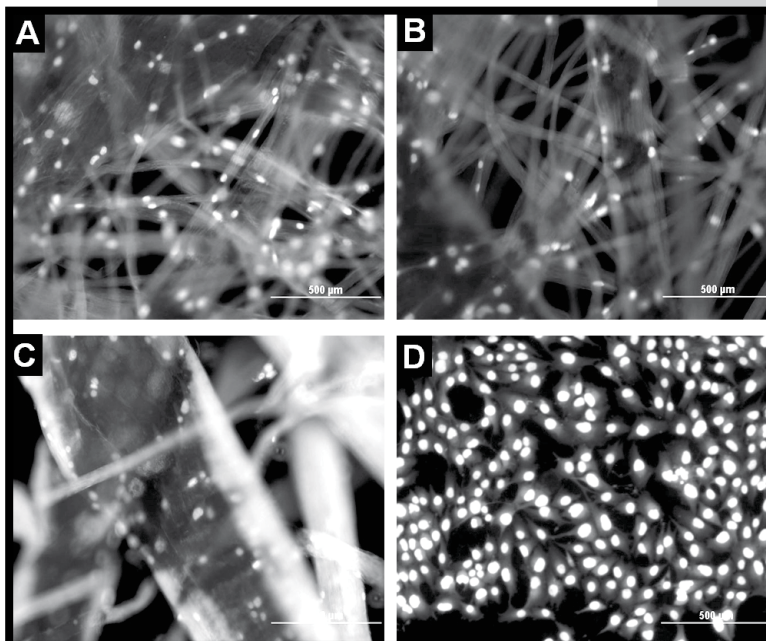
Inna grupa podłoży została użyta do hodowli komórek MG 63 w warunkach statycznych i dynamicznych. Po czterech dniach hodowli w warunkach statycznych zmierzono całkowitą liczbę komórek i liczbę żywych komórek przylegających do materiałów. Liczba komórek na podłożach PLG_10 i PLG-HAP_10 (o mniejszej porowatości) była znacznie wyższa niż na PLG_5 (RYS.4A). Liczba żywych komórek na podłożach była nieznacznie niższa niż całkowita liczba komórek, co świadczy o tym, że wszystkie materiały nie są cytotoksyczne, a różnice w zachowaniu się komórek wynikały z mikrostruktury podłoży, tj. obecności cienkich włókien mniej odpowiednich dla rozplaszczania komórek. Następnie podłoża z osadzonymi komórkami zostały przeniesione do komory perfuzyjnej i hodowane przez kolejne dwa dni. Liczba komórek na podłożach PLG_5 i PLG_10 spadła znacząco, co było spowodowane raczej

Thicker fibres (being the aggregates of several individual fibres) with the diameter of about 200-300 μ m were also visible (FIG.1A,B). Due to twice a higher mass of fibres (10 and 5mg, respectively), used to prepare individual scaffolds the PLG_10 scaffolds had a lower porosity than those of PLG_5. PLG-HAP_10 scaffolds consisted of relatively thicker fibres, about 300-500 μ m in diameter, however some individual thin fibres, about 30 μ m in diameter were also seen (FIG.1C). PLG-HAP_10 scaffolds had the highest porosity among studied materials.

Cell growth on fibrous scaffolds

The morphology of MG 63 cells adhering on studied materials on 3 and 7 days after seeding in static cell culture conditions is shown in FIGS.2 and 3, respectively. On days 3 and 7, the cells adhered to the fibres, although the cells on flat control TCPS were distributed more homogeneously on the material surface and were better spread. On day 7, the number of cells was relatively higher on PLG_10 and PLG-HAP_10, e.g. on the scaffolds with lower porosity, than on PLG_5, having a higher porosity.

Another set of fibrous scaffolds was used to cultivate MG 63 cells in static and dynamic condition. Four days after seeding, the total number of cells and number of viable cells were measured. Cell number on PLG_10 and PLG-HAP_10, e.g. on the scaffolds with lower porosity, was much higher than on PLG_5 (FIG.4A). The number of viable cells on scaffolds was only slightly and non-significantly lower than the total cell number. This suggests that all materials are non-cytotoxic, and the differences in cell behaviour result from the scaffold microstructure, i.e. its composition of relatively narrow fibres less appropriate for cell spreading. Afterwards, the scaffolds with adhering cells were transferred to perfusion dynamic system and cultivated for another two days. Interestingly, cell number on PLG_5 and PLG_10 decreased considerably, indicating rather poor adhesion of cells on pure PLG fibres (FIG.4B). In contrast, cell number on PLG+HAP_10 scaffolds increased. It suggests that presence of hydroxyapatite in bulk of resorbable fibres supports the adhesion of osteoblasts. The number of cells and their morphology was also evaluated under confocal microscopy (FIG.5). It is apparent that after 2 days of dynamic culture (total cultivation time 6 days) the highest number of cells was detected on PLG-HAP_10 (FIG.5C), lower on PLG_10 (FIG.5B) and the lowest on PLG_5 (FIG. 5A).



RYS.2. Morfologia komórek kostnych MG 63 na podłożach po 3 dniach hodowli:

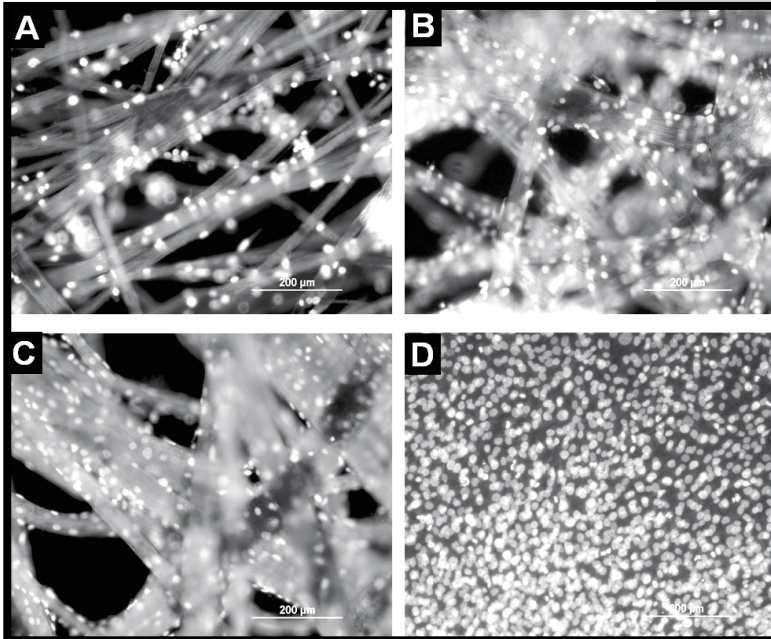
- A) PLG_5,
- B) PLG_10,
- C) PLG+HAP_10,
- D) TCPS.

Mikroskop fluorescencyjny Olympus IX 50, obiektyw 10x, skala=500 μ m.

FIG.2. Morphology of MG 63 cells on fibrous scaffolds on day 3 after seeding

- A) PLG_5,
- B) PLG_10,
- C) PLG-HAP_10,
- D) TCPS.

Fluorescence microscope Olympus IX 50, objective 10, bar=500 μ m.



RYS.3. Morfologia komórek kostnych MG63 na włóknistych podłożach po 7 dniach hodowli:

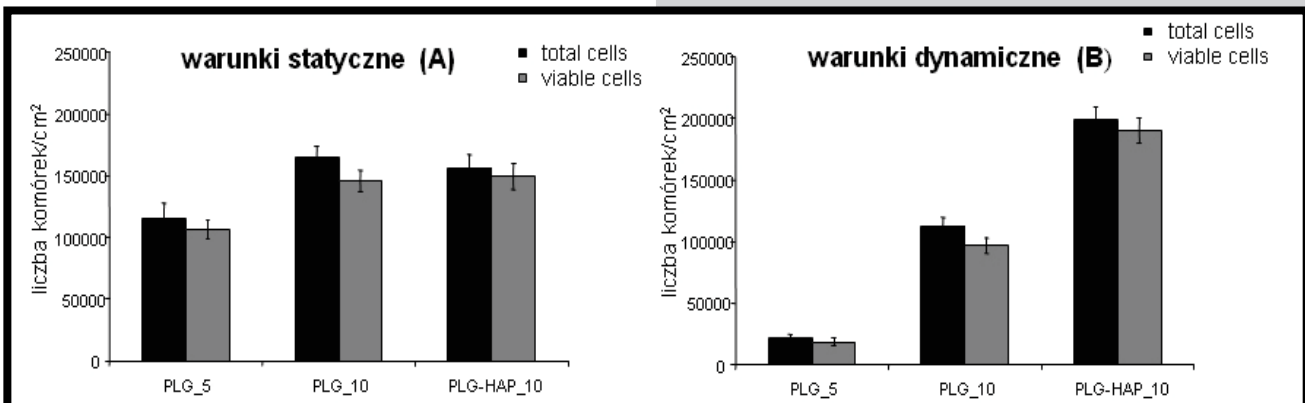
- A) PLG_5,
B) PLG_10,
C) PLG+HAP_10,
D) TCPS.

Mikroskop fluorescencyjny Olympus IX 50, obiektyw 10x, skala=500µm.

FIG.3. Morphology of MG 63 cells on fibrous scaffolds on day 7 after seeding:

- A) PLG_5,
B) PLG_10,
C) PLG+HAP_10,
D) TCPS.,

Fluorescence microscope Olympus IX 50, objective 10, bar=500µm.



RYS.4. Liczba komórek MG 63 po 4 dniach hodowli w warunkach statycznych (A) i po 2 dniach w warunkach dynamicznych (B).

FIG.4. Number of MG 63 cells after four days in static cell culture conditions (A) and additional two days in dynamic conditions (B).

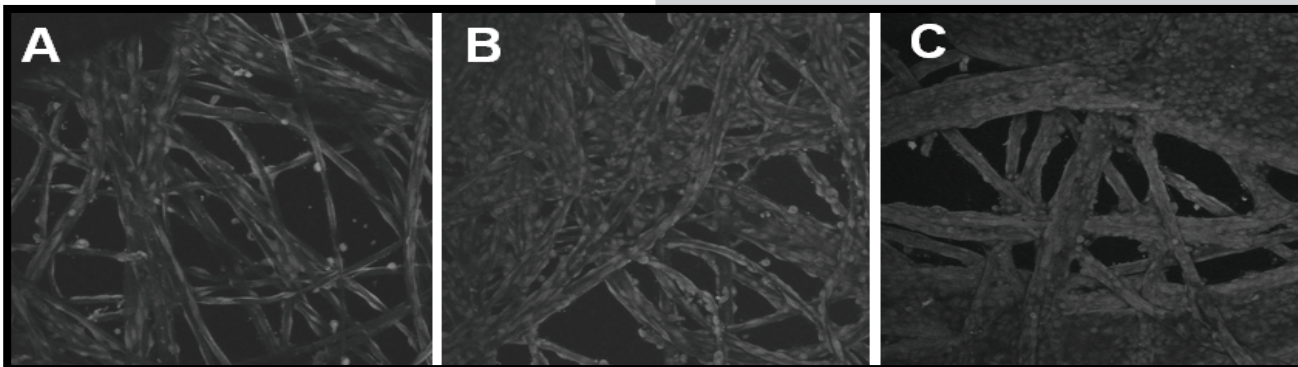
słabą adhezją komórek do czystych włókien z PLG (RYS. 4B). Natomiast liczba komórek na podłożu PLG-HAP_10 istotnie wzrosła. Sugeruje to, że obecność cząstek hydroksyapatytu rozproszonych w objętości resorbowalnych włókien sprzyjała adhezji osteoblastów. Liczba komórek i ich morfologia były również oceniane za pomocą mikroskopu konfokalnego (RYS.5). Badania wykazały, że po 2 dniach hodowli w warunkach dynamicznych (całkowity czas hodowli 6 dni) najwięcej komórek było na podłożu PLG-HAP_10 (RYS.5C), mniej na PLG_10 (RYS.5B) i najmniej na PLG_5 (RYS.5A).

Nasze wyniki są zgodne z wcześniejszymi badaniami Ma i wsp., prowadzonymi w warunkach statycznych, że na podłożu z kompozytu PLLA/HAP osteoblasty wykazywały lepszą przeżywalność, bardziej jednorodny wzrost i rozkład komórek a także przyspieszały tworzenie składników substancji międzykomórkowej w porównaniu z podłożem z PLLA [16]. Inne badania były przeprowadzone przez Xu i wsp., którzy badali zachowanie komórek mięśni gładkich na nanowłóknistych materiałach z kompozytu PLLA/CL (75:25). Ich wyniki pokazały, że adhezja i proliferacja komórek były znacznie lepsze na materiale o powierzchni zawierającej nanowłókna niż na gładkiej powierzchni folii polimerowej otrzymanej metodą odlewania z roztworu [17]. Li i wsp., stwierdzili że nanowłókniste podłoża PGLA otrzymane metodą elektroprzędzenia dostarczały trójwymiarowej struktury

Our results are consistent with previous experiments of Ma et. al., who found that on PLLA/HAP composite scaffolds, a higher osteoblasts survival rate, with uniform cell distribution and growth were observed in static cell culture system [16]. Moreover, an improved tissue formation in comparison with pure PLLA scaffolds were detected [16]. Other experiments were performed by Xu et. al., who evaluated smooth muscle cell behaviour on PLLA/CL (75:25) composite nanofibrous scaffolds. Their results showed that cell adhesion and proliferation were significantly improved on nanofibrous polymer in comparison with a solvent cast polymer film having a homogenous plane surface [17]. The electrospun nanofibrous PGLA scaffolds provided a three-dimensional structure for cell attachment, growth and migration [18]. Li et. al. found that fibroblasts adhered onto the fibrous scaffold and formed a three-dimensional cellular network [18]. Therefore, it can be concluded that fibrous structures are suitable scaffolds for cell culturing.

Conclusion

A new method of manufacturing of fibrous scaffolds by fibre bounding has been proposed in this study. The results of osteoblast culturing in static condition showed that the number of adhering cells and their proliferation depend on the microstructure of the scaffold, e.g. its porosity and size



RYS.5. Morfologia komórek MG63 na włóknistych podłożach po 4 dniach hodowli w warunkach statycznych i po kolejnych 2 dniach hodowli w przepływie medium: A) PLG_5, B) PLG_10, C) PLG+HAP_10, (mikroskop konfokalny, obiektyw 10x).

FIG.5. Morphology of MG 63 cells on fibrous scaffolds after 4 days in static culture followed by 2 days in dynamic culture conditions: A) PLG_5, B) PLG_10, C) PLG+HAP_10, (confocal microscope, objective 10x).

potrzebnej do wzrostu i migracji komórek [18]. Fibroblasty hodowane na takich podłożach dobrze przylegały do materiałów włóknistych i tworzyły przestrzenną sieć komórek [18]. Dlatego materiały włókniste wydają się być odpowiednimi materiałami do hodowli komórek.

Podsumowanie

Włókniste podłoża zostały wytworzone nową metodą łączenia włókien. Badania komórkowe w warunkach statycznych pokazały, że liczba komórek i ich proliferacja zależą od mikrostruktury podłoża, jego porowatości i wielkości pojedynczych włókien. Badania dynamiczne wykazały, że obecność cząstek hydroksyapatytu rozproszonych w objętości włókien poprawia adhezję komórek i odporność na naprężenia ścinające wywoływane przez przepływające medium hodowlane. W wyniku tego, namnażanie komórek na włóknach PLG zawierających hydroksyapatyt było najlepsze. Wyniki potwierdzają, że PLG-HAP_10 jest materiałem o najkorzystniejszych właściwościach do hodowli osteoblastów in vitro.

Podziękowania

Mgr inż Maciej Boguń jest stypendystą Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Autorzy dziękują Panu Prof. K. Haberko za dostarczenie proszku hydroksyapatytu. Praca finansowana z projektu badawczego Nr 3 T08D 023 30.

of individual fibres. The results of dynamic studies showed that dispersion of hydroxyapatite particles in volume of PLG fibres considerably improves adhesion of cells and resistance to shear stress caused by flow of culture medium. As a result, the proliferation of cells was the best on PLG fibres containing hydroxyapatite. The results also confirm that PLG-HAP_10 is the most optimal material for in vitro osteoblast cultivation.

Acknowledgements

This research work was sponsored by the Foundation for Polish Science whose grand holder is Maciej Boguń M.Sc., Eng.

The authors thank Prof. K. Haberko for providing hydroxyapatite powder. This study was financed from research project No 3T08D 023 30

Piśmiennictwo

- [1] P. X. Ma; *Materials Today* 7, 2004, 30-40
- [2] X. Liu, P. X. Ma; *Annals of Biomedical Engineering* 32, 2004, 477-486
- [3] D. W. Huttmacher; *Biomaterials* 21, 2000, 2529-2543
- [4] L. Singh, V. Kumar, B. D. Ratner; *Biomaterials* 25, 2004, 2611-2617
- [5] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi; *Biomaterials* 22, 2001, 2563-2567
- [6] A. G. Mikos, J. S. Temenoff; *Biotechnology of Human Disorders* 3, 2000, 1-8
- [7] Y. S. Nam, T. G. Park; *Biomaterials* 20, 1999, 1783-1790
- [8] W. L. Murphy, M. C. Peters, D. H. Kohn, D. J. Mooney; *Biomaterials* 21, 2000, 2521-2527
- [9] L. A. Smith, P. X. Ma; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39, 2004, 125-131.
- [10] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna; *Biomaterials* 26, 2005, 2603-2610

References

- [11] L. Fambri, A. Pegoretti, M. Mazzurana, C. Migliaresi; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5, 1994, 679-683
- [12] S. Gogolewski, A. J. Pennings; *Journal of Applied Polymer Science* 28, 1983, 1045-1061
- [13] P. Dobrzyński, J. Kasperczak, H. Janeczek, M. Bero; *Macromolecules* 34, 2001, 5090-5098
- [14] K. Haberko, M.M. Bućko, J. Brzezińska-Miecznik, M. Haberko, W. Mozgawa, T. Panz, A. Pyda, J. Zarębski, *Journal European Ceramic Society* 26, 2006, 537-542
- [15] J. Buczyńska, E. Pamuła, S. Błażewicz, T. Mikołajczyk, M. Boguń, P. Dobrzyński, K. Haberko, *Engineering of Biomaterials* 58-60, 2006, 85-89
- [16] P. X. Ma, R. Zhang, G. Ciao, R. Franceschi; *Journal of Biomedical Materials Research* 54, 2001, 284-293
- [17] C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Biomaterials* 25, 2004, 877-886
- [18] W.-J. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, F. K. Ko, *Journal of Biomedical Materials Research* 60, 2002, 613-621.