

WPŁYW ŚREDNICY WŁÓKIEN WĘGLOWYCH NA ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWĄ

I. RAJZER¹, M. BŁAŻEWICZ², E. MENASZEK³, A. CZARNY⁴,
E. ZACZYŃSKA⁴

¹ AKADEMIA TECHNICZNO-HUMANISTYCZNA W BIELSKO-BIAŁEJ,
WYDZIAŁ NAUK O MATERIAŁACH I ŚRODOWISKU,
INSTYTUT INŻYNIERII TEKSTYLÓW I MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH

² AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, KRAKÓW, POLSKA

³ UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM,
ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII,
KRAKÓW, POLSKA

⁴ PAŃSTWOWA AKADEMIA NAUK, INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ, WROCŁAW, POLSKA

Streszczenie

W ramach pracy otrzymano włókninę zbudowaną z włókien o różnych średnicach i wielkości, której mikrostruktura posiada biomimetyczny charakter, tzn. składa się z włókien o średnicach zbliżonych do średnic włókien występujących w tkankach. Badania biologiczne wykazały, że włókna o niskich średnicach są gorzej tolerowane przez tkanki.

Słowa kluczowe: włóknina węglowa, porowatość, podłoża tkankowe, badania biologiczne.

[*Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 52-56*]

Wstęp

Materiały włókniste znajdują coraz większe zastosowanie w medycynie jako trójwymiarowe podłoża w regeneracji ubytków tkanki chrzęstnej i kostnej. Projektując materiał przeznaczony na podłoże tkankowe należy pamiętać, że powinien on posiadać przestrzenną, porowatą strukturę o rozmiarze porów optymalnym dla wzrostu i proliferacji określonego typu komórek. Materiał taki powinien charakteryzować się zarówno porowatością w skali mikro, sprzyjającą odżywianiu komórek, jak również porowatością w skali nano sprzyjającą adhezji komórek do powierzchni. Porowate lub włókniste podłoża dla hodowli tkanki, oprócz pożądaných własności biologicznych, fizycznych czy mechanicznych powinny posiadać budowę zbliżoną do zastępowanych tkanek [1]. Coraz częściej poszukiwane są tzw. materiały biomimetyczne. Wyzwaniem dla inżynierii tkankowej jest zaprojektowanie idealnego skafoldu, który naśladowałby strukturę i biologiczne funkcje substancji międzykomórkowej. Niemal wszystkie z ludzkich tkanek i organów osadzone są w strukturach włóknistych (włókna kolagenowe stanowią podstawowy składnik tkanki łącznej). Zatem implant w postaci włókniny węglowej o różnej średnicy włókien (naśladowującej włókna kolagenowe) powinien być pomocny przy próbach regeneracji różnych tkanek ludzkich [2-3].

Celem pracy było wytworzenie specyficznego rodzaju trójwymiarowych biomimetycznych rusztowań o porowatości w zakresie mikro- i nanoporów, w których zarówno układ, jak i średnice włókien inspirowane są sposobem ułożenia i średnicami włókien występującymi w żywych tkankach.

THE EFFECT OF THE CARBON FIBRES DIAMETER ON CELL RESPONSE

I. RAJZER¹, M. BŁAŻEWICZ², E. MENASZEK³, A. CZARNY⁴,
E. ZACZYŃSKA⁴

¹ ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,
FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER SCIENCE

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, CRACOW, POLAND

³ JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY,
CRACOW, POLAND

⁴ PAN POLISH ACADEMY OF SCIENCES, INSTITUTE OF IMMUNOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY, WROCŁAW, POLAND

Abstract

A three dimensional fibrous material, made from fibers differing in diameters and porosity, has been designed and prepared. These materials will constitute a 3D scaffold containing fibrous components mimicking the structure of natural tissue.

The biological studies indicate that the fibers with bigger diameter allow for more intense and quick regeneration of surrounding tissue.

Keywords: carbon fabrics, porosity, tissue engineering scaffolds, biological study.

[*Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 52-56*]

Introduction

Among the possible forms of implants, the fibrous matrix is highly promising in medicine for tissue regeneration as a cell supporting scaffold. It is well known that material which could serve as a scaffold should allow for adherence, growth, proliferation and differentiation of cells. The best scaffold should be made of porous materials containing two types of pores: 1) larger than several tenths of micrometers (pores in which cells can grow) and 2) smaller pores enabling cell-adhesion. Scaffolds should exhibit sufficient physical and mechanical properties and promote the formation of tissues. The aim of tissue engineering is to design the ideal scaffold imitating the structure and functions of extra-cellular matrix. Almost all natural tissues and organs are supported by fibrous structures (e.g. collagen fibres are the main component of connective tissues). Therefore, fibrous scaffolds made from fibres differing in diameters, may be used as a promising material in tissue engineering applications due to their biomimetic character and highly porous structure.

The aim of this work was to prepare materials in the form of three dimensional fibrous structure made from fibres differing in diameters and porosity (micro- and nanopores). These materials will constitute a 3D scaffold containing fibrous components imitating the structure existing in natural tissues.

Materiały i metody

Porowaty prekursor poliakrylonitrylowy wytworzono w Katedrze Włókien Sztucznych Wydziału Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej w formie rovingu oraz włókniny. Włóknina zawierała oprócz włókien porowatych również włókna nieporowate o zróżnicowanych średnicach.

Proces karbonizacji włókien poliakrylonitrylowych prowadzono do temperatury 1000°C przy szybkości ogrzewania 5°C/min. w atmosferze ochronnej (argon). Włókna przetrzymywano w maksymalnej temperaturze przez 15 minut. Karbonizacji poddano również włókninę nieporowatą wytworzoną z włókien o jednakowej średnicy.

Po procesie karbonizacji włókniny (WP – włóknina porowata, WN – włóknina nieporowata) i włókna (W/Por) badano przy użyciu mikroskopu skaningowego. Badania średnicy włókien węglowych tworzących włókninę oraz porowatych włókien węglowych (W/Por) występujących w postaci rovingu przeprowadzono na mikroskopie projekcyjnym Lanamet. Przy zastosowaniu metody porozymetrii rtęciowej wyznaczano porowatość włókien oraz włókien tworzących włókninę WP. Dla porównania, badania porowatości przeprowadzono również dla włókniny węglowej WN.

Próbki w kształcie kwadratów o wymiarach 0,5x0,5cm, sterylizowano termicznie w 160°C w czasie 120 minut.

Otrzymane materiały poddano ocenie biologicznej. Badanie cytotoksycznego działania próbek na komórki wykonano w Laboratorium Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej - PAN we Wrocławiu. Próbki węglowe kontaktowano z linią komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc A549 (ATCC CCL 185). Hodowla komórek nabłonkowych ludzkiego raka płuc została założona w 24-dółkowej płytce hodowlanej firmy Constar. Gęstość komórek w hodowli wynosiła 1x10⁶/ml. Komórki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie usunięto pożywkę hodowlaną, a jednowarstwową hodowlę komórek zalano 1ml płynu hodowlanego z dodatkiem 2% surowicy cielęcej.

Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów i inkubowano przez 24 oraz 72 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Zmiany występujące w komórkach, pod wpływem badanych materiałów, oceniano w trzech powtórzeniach po każdym czasie inkubacji, w odwróconym mikroskopie kontrastowofazowym. Wpływ działania cytotoksycznego materiału na hodowlę komórek obejmował ocenę ilościową i jakościową. W celu określenia liczby martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu.

Badania *in vivo* przeprowadzono na szczurach rasy kapturowej, pochodzących ze zwierzętarni eksperymentalno-hodowlanej Wydziału Farmaceutycznego CM UJ. Badania wykonano w Zakładzie Cytobiologii i Histochemii CM UJ. Sterylne próbki materiałów węglowych (sterylizacja termiczna: 160°C/120 minut) wszczepiano do naciętego mięśnia szkieletowego pośladkowego szczurów. Badania wykonano w 5 seriach. Po upływie czasu danej serii (7, 30, 90, 150, 210 dni) zwierzęta zabijano, a wycinki pobrane z miejsc wszczepów zamrażano w ciekłym azocie i następnie skrawano na mikrotomie kriostatowym Pearse – Slee na skrawki o grubości 8µm. Badania obejmowały mikroskopowe obserwacje strefy wgajania implantów.

Wyniki i dyskusja

Zdjęcia z mikroskopu skaningowego włókniny węglowej zawierającej porowate włókna (oznaczonej jako WP) przedstawione są na RYS.1.

Materials and methods

Porous polyacrylonitrile precursor (PAN) was prepared in the form of fabrics and fibres at the Technical University of Łódź in the Department of Man Made Fibres. The fabrics (WP) was comprised of porous fibres (W/Por) and nonporous fibres of different diameters. Carbonization of the polyacrylonitrile fabrics took place at 1000°C for 15 min. at a heating rate of 5°C/min. Carbonization was proceed also for nonporous fabrics (WN) made from fibres of similar diameter.

After the carbonization process, the fabrics' morphology was examined by means of the scanning electron microscope (SEM).

The diameter of the carbon fibres (which constituted the WP fabrics) and the diameter of the porous carbon fibres W/Por (in the form of roving) was measured by means of the Lanamet microscope.

The porosity of the WP fabrics and of the porous fibres W/Por (which were used to produce WP fabrics) was determined by a mercury porosimeter (Carlo – Erba 2000). For reference purposes, similar material prepared from polyacrylonitrile precursors as well, but without the porous fibres was used in this study.

Square pieces of fabrics (0,5x0,5cm) were sterilized in a dry hot air sterilizer (160°C/120 min.) and used in a biological study.

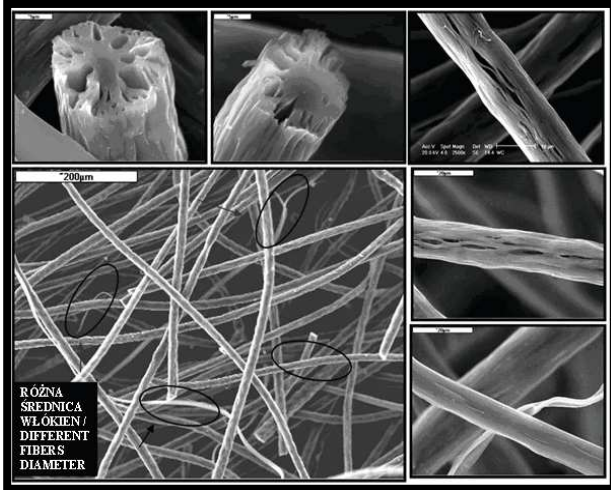
The cytotoxicity tests were performed at the Polish Academy of Sciences, Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław.

The cytotoxicity of the carbon fabrics was determined in the culture of human lung adenocarcinoma cell line A549. For the cytotoxicity test, the A549 cells were seeded in a 24-well plate (Costar). 1x10⁶ cells in 1 ml of the culture medium enriched with 2% calf serum, penicillin and streptomycin were deposited into each well. Samples of the tested materials in the amount of 10mg were added to plate wells, and incubated with cells at 37°C in an air atmosphere containing 5% CO₂. The number of cells and changes of their morphology were estimated after 24 and 72 hours. Each sample was evaluated three times. Trypan blue staining was used for assessment of cells viability.

The *in vivo* studies were carried out using rat soft tissues as a model. The biological tests were performed at the Collegium Medicum of Jagiellonian University, Department of Cytobiology and Histochemistry in Cracow. The *in vivo* study was approved by Bioethics Committee. Sterile pieces of carbon fabrics were implanted into the skeletal muscle of adult Hooded-Oxford rats. After 7, 30, 90, 150 and 210 days from implantation, the animals were sacrificed and tissue blocks containing biomaterials were excised. Samples were frozen in liquid nitrogen and cut in a Pearse – Slee cryostat microtome. The studies involved microscopic observations of the implant healing site, particularly the tissue-implant interface.

Results and discussion

The microstructure of the carbon fabrics (WP) made from porous fibres is shown in FIG.1. The fibres of different diameters and the pores between the fibres are clearly seen. Elongated pores of various sizes are found on the surface of carbonized fibres. The analysis of the fibres cross-section shows that the pores occurred at the outer layer of the fibres and formed irregular channels along the fibre axis. The smooth fibres with lower diameters (even less than 2µm) were also observed.

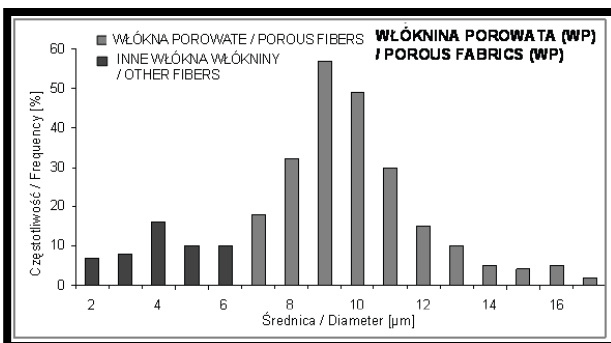


RYS.1. Mikrostruktura włókniny węglowej (WP) i włókien (W/Por).

FIG.1. Microscopic image of carbon fabrics (WP) and fibres (W/Por).

Na zdjęciach widoczne są włókna o różnej średnicy i przypadkowym ułożeniu, pomiędzy którymi znajdują się pory. Również na powierzchni włókien występują podłużne pory o zróżnicowanej wielkości. Analiza przekroju poprzecznego włókna wskazuje, że pory występują przede wszystkim w zewnętrznej warstwie włókna i tworzą nieregularne kanaliki biegnące wzdłuż osi włókien. We włókninie występują również włókna gładkie o mniejszej średnicy, a nawet włóknienka o średnicy poniżej 2µm (RYS.2).

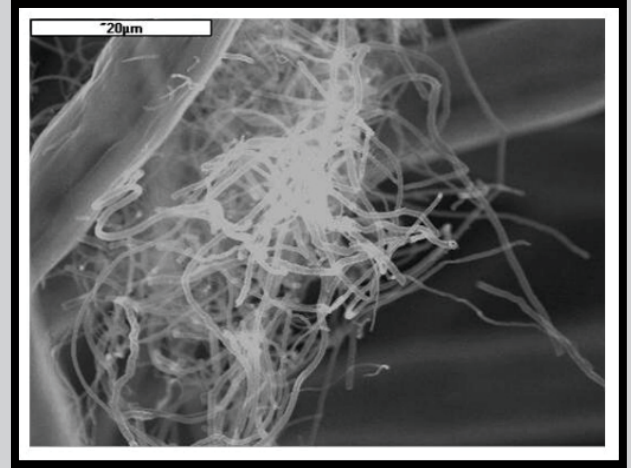
Z pomiarów przeprowadzonych na mikroskopie projekcyjnym Lanametr wynika, że średnica wszystkich włókien węglowych tworzących włókninę (oznaczaną jako WP) waha się w szerokim zakresie (2-17µm). Włóknina ta składa się z porowatych włókien węglowych (W/Por) o średnicy w zakresie 7-17µm oraz gładkich włókien o średnicy 0,5-7µm. Rozkład średnic dla porowatej włókniny węglowej przedstawiono na RYS.3.



RYS.3. Rozkład wielkości średnic dla włókniny węglowej WP.

FIG.3. Diameter distribution for WP fabrics.

Przy zastosowaniu metody porozymetrii rtęciowej wyznaczano porowatość włókniny WP oraz włókien tworzących włókninę. Z badań wynika, że włóknina węglowa (WP) posiada dwa zakresy porowatości (RYS.4). Pierwszy z nich mieszczący się w granicach 20-250µm stanowią wolne przestrzenie pomiędzy włóknami. Drugi zakres porowatości związany jest z pojedynczymi włóknami. Średnice porów we włóknach mieszczą się w granicach 3nm-10µm. Taki rozkład wielkości porów może być korzystny w przypadku materiałów przeznaczonych na podłoża tkankowe. Dla porównania przedstawiono również wyniki badań wykonanych dla nieporowatej włókniny węglowej (RYS.5).

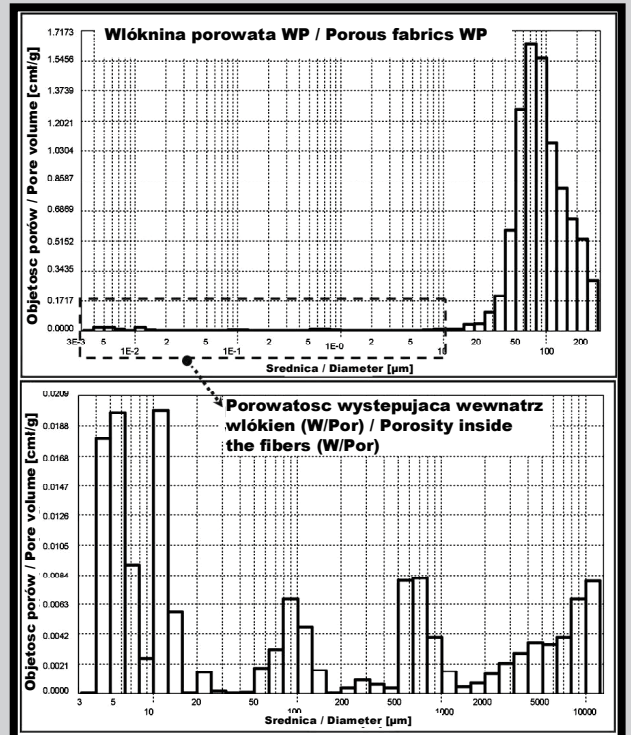


RYS.2. Mikrostruktura włókien tworzących włókninę (SEM). Widoczne włóknienka o średnicy poniżej 2µm.

FIG.2. Microscope image of carbon fabrics (SEM). Fibers with diameter below 2µm.

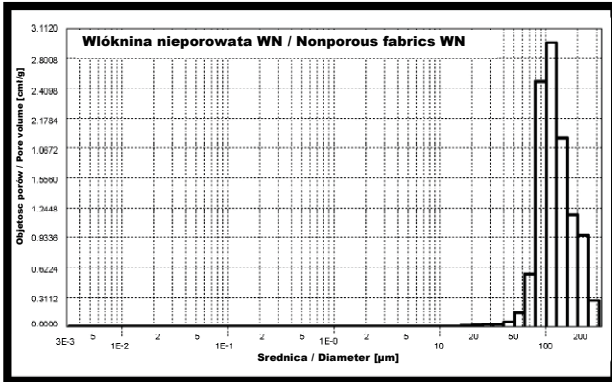
The diameter of the fibres present in the WP fabrics, estimated using a Lanametr microscopy, varied from 2-17µm. This fabric made up mainly of porous carbon fibres with an average diameter 7-17µm was also composed of smooth, nonporous carbon fibres with a diameter 0,5-7µm. The diameter distribution of the WP fabrics is presented in FIG.3.

The porosity of the fabrics and fibres used to produce fabrics was determined by a mercury porosimeter. Our studies have shown that the WP carbon fabrics had two ranges of porosity (FIG.4). The pores of diameter 20-250µm were the result of the space between fibres, and the pores of diameter 3nm-10µm were related to W/Por fibres attributes. This kind of pore distribution may be promising in tissue engineering applications. The porosity results for nonporous carbon fabrics are shown in FIG.5.



RYS.4. Oznaczenie porowatości dla: (a) porowatej włókniny węglowej (WP), (b) włókien tworzących włókninę porowatą (W/Por).

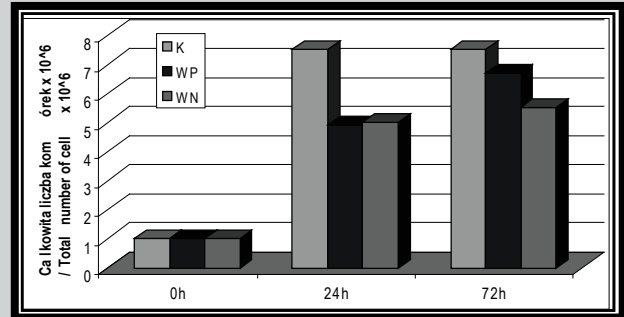
FIG.4. Porosity determination for: (a) WP (b) W/Por.



RYS.5. Oznaczenie porowatości dla włókniny węglowej WN.
FIG.5. Porosity determination for WN fabrics.

Ocena cytotoksyczności włókien węglowych

Po 24 godzinach hodowli w kontakcie z włókninami węglowymi WP i WN stwierdzono, że komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. Liczba martwych komórek stanowiła 5% dla włókniny WP i 10% dla próbki WN. Ilość martwych komórek spadła po 72 godzinach hodowli do 2% w przypadku włókniny WN natomiast dla włókniny WP wynosiła 6%. We wszystkich hodowlach obserwowano dużą liczbę komórek w podziałach i ich prawidłową proliferację. Całkowita liczba komórek po 24 i 72 godzinach wzrosła w porównaniu do wyjściowej liczby komórek (RYS.6). Po 72 godzinowym kontakcie z włókninami również nie stwierdzono zmian morfologicznych (RYS.7), komórki utrzymują wrzecionowate, wydłużone kształty oraz przylegają do podłoża w postaci równomiernej warstwy.

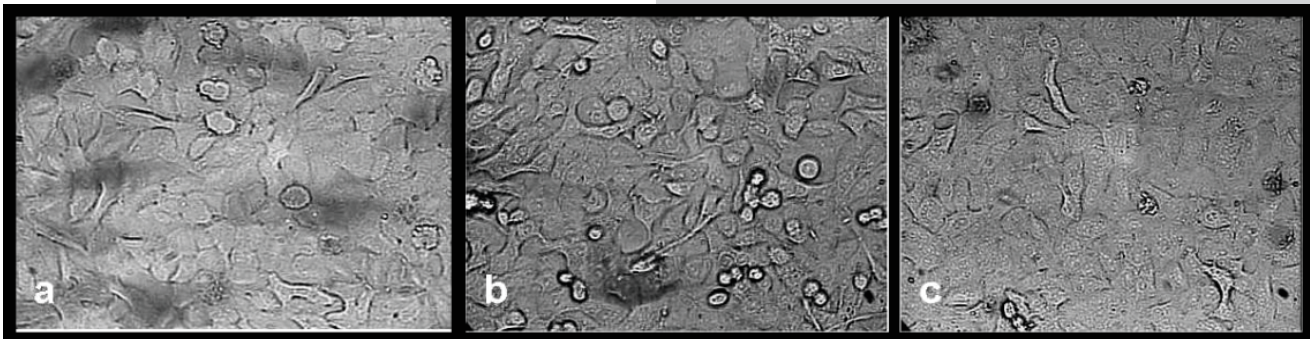


RYS.6. Całkowita liczba komórek A549 po kontakcie z włókninami.
FIG.6. Total number of A549 cell after 24 and 72 hours of contact with WP and WN implants.

The evaluation of cytotoxicity

After 24 hours all the cells that were cultured in contact with WP and WN samples were properly adhered to the bed and had proper morphological character. Dead cell number after 2 hours of contact with WP implants were at the level of 5% whereas in the case of WN the level was 10%. Dead cell number after 72 hours of contact with WN samples were at the level of 2% whereas in case of the WP sample the level was 6%. The proliferation of the cells in the presence of biomaterials was correct. The total number of cells after 24 and 72 hours culture with samples of WP and WN was higher than at the beginning of experiment.

The cytotoxicity test results indicate that direct contact of carbon fabrics with the human lung adenocarcinoma cells line A549 did not show any cytotoxicity effect (FIG.7). The cell culture was not influenced by the biomaterials and cells retained their elongated shape. No morphological cell changes were observed.



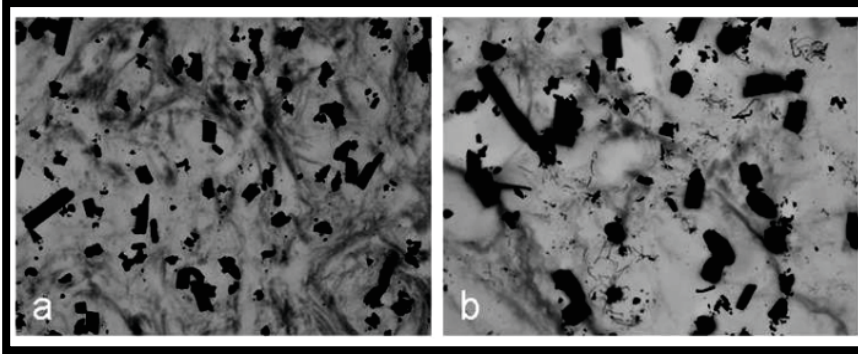
RYS.7. Badanie działania cytotoksycznego włókien na linii komórek A549: (a) kontrola, (b) WP, (c) WN.
FIG.7. The evaluation of the cytotoxicity. (a) control, (b) WP, (c) WN.

Wpływ średnicy włókien na odpowiedź komórkową w warunkach *in vivo*

Porównując wyniki doświadczeń związanych z implantacją do mięśnia szkieletowego szczura włóknin węglowych, różniących się między sobą średnicą włókien stwierdzono, że po 30 dniach od implantacji proces regeneracji tkanki w przypadku obu materiałów przebiega podobnie. Natomiast badania przeprowadzone po 210 dniach trwania doświadczenia wykazały różnice w zachowaniu się tkanki w kontakcie z badanymi próbkami (RYS.8). Zauważono, że włókna kolagenowe wokół włókniny węglowej o różnej średnicy włókien, wykazywały luźniejszy układ niż wokół typowej włókniny WN. Przy włóknach o mniejszej średnicy przez cały czas trwania eksperymentu obecna była torebka z tkanki łącznej. Wokół większych włókien, torebka zmniejszała swoją grubość, aż do całkowitego zaniku, pod koniec

The effect of the fibre diameter on cell response *in vivo*

All animals survived the surgery. No wound healing problems or complications were observed after the surgery and during the whole experiment. The inflammation response was observed around WP and WN implants as well. There were no evident differences between the WP and WN implants after 30 days. Differences in tissue responses to both materials were visible in subsequent series, especially after 210 days from the implantation (FIG.8). The structure of porous carbon fibres (W/Por) promotes tissue regeneration. The fibrous capsule around the smaller fibres was present during the entire experiment. With regard to fibres that were larger in diameter, there were many places where the carbon fibres were in direct contact with the muscle tissue. The results obtained in the *in vivo* study suggest the more



RYS.8. Przekrój poprzeczny przez mięsień szkieletowy szczura w miejscu wszczepu włókien węglowych po 210 dniach: (a) WN, (b) WP. Reakcja histochemiczna Van Giesona na obecność włókien kolagenowych.

FIG. 8. Collagen visualized by van Gieson's method in cross-sections of (a) WN and (b) WP implants after 210 days.

eksperymentu fragmenty włókien węglowych stykały się z tkanką mięśnia szkieletowego szczura. Z badań *in vivo* wynika, że włókna W/Por, dzięki swojej znacznej porowatości pozwalają na szybsze wnikanie elementów komórkowych i przerastanie tkanką łączną. Badania wykazały różny wpływ średnicy włókien węglowych na odpowiedź tkanki miękkiej.

Wnioski

Otrzymano włókninę zbudowaną z włókien o różnych średnicach i długości, której mikrostruktura posiada biometryczny charakter tzn. składa się z włókien o średnicach zbliżonych do średnic włókien występujących w tkankach (kolagen, włókna elastynowe). Włóknina ta posiada dwa zakresy porowatości. Pierwszy z nich stanowią wolne przestrzenie pomiędzy włóknami. Tworzą one układ otwartych porów, umożliwiając penetrację komórek w głąb materiału i odtworzenie tkanki w całej objętości implantu węglowego. Drugi zakres porowatości związany jest z pojedynczymi włóknami. Pory we włóknach powinny sprzyjać adhezji komórek do ich powierzchni, mogą stanowić również miejsca, które w przyszłości wypełnione zostaną substancjami (leki, białka) wpływającymi na metabolizm komórek. Badania *in vitro* wykazały, że otrzymane materiały są biogodne, natomiast w oparciu o badania biologiczne *in vivo* wykazano, że odpowiedź tkanek na węgiel włóknisty zależy od średnicy włókien węglowych. Odpowiedź tkanek na włókna węglowe o średnicach poniżej 1 μm jest różna w porównaniu z reakcją tkanek na włókna o średnicach przekraczających kilka mikrometrów. Analiza histologiczna jak i histochemiczna wykazała, że włókna o niskich średnicach są gorzej tolerowane przez tkanki.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007 - 2010 jako projekt badawczy POL-POSTDOC III NrPBZ/MNiSW/07/2006/53.

intense and quick regeneration of muscle tissue around the fibres with bigger diameter compared to the fibres with diameters below 2 micrometers. The studies prove that the influence on the connective tissues depends on the fibre diameter.

Conclusion

Based on the results of biological studies, a three dimensional fibrous biomaterial made from fibres differing in diameters and porosity, has been designed and prepared. This material will constitute a 3D scaffold containing fibrous components imitating the structure of natural tissues.

The prepared material contains two types of pores: 1) pores between fibres in which cells could penetrate, grow and proliferate to promote the formation of tissue and 2) pores in the fibre microstructure. Porous carbon fibres used as a scaffold for tissue regeneration could simultaneously serve as a support for the delivery of drugs or biologically active agents which would stimulate tissue growth.

The *in vitro* cytotoxicity tests revealed that the direct contact of the human lung adenocarcinoma cell line A549 with porous carbon fibres did not show any cytotoxicity effect. The *in vivo* study revealed that tissue response on carbon fibres strongly depends on their diameter. There is a different tissue reaction in the presence of carbon fibres with a diameter below 1 μm compared to those with a diameter greater than a few micrometers.

Histological and histochemical analysis indicate that fibres with bigger diameters allow for more intense and quick regeneration of surrounding tissues.

Acknowledgements

This work was supported by the Minister of Science and Higher Education, project POL -POSTDOC III no. PBZ/MNiSW/07/2006/53 (2007-2010).

Piśmiennictwo

[1] K.Tuzlakoglu, S.Egri, M.E.Gomes, R.L.Reis "Nano- and Micro-fibre combined Scaffolds: A New Architecture for Bone Tissue Engineering" 19th European Conference on Biomaterials, September 11-15, 2005, Sorrento, Italy.

References

[2] I.Rajzer, E.Menaszek, M.Błażewicz, E.Zaczyńska „Biological evaluation of porous carbon fibres materials” 20th European Conference on Biomaterials, Nantes, 2006.

[3] I.Rajzer „Badania nad włóknistymi materiałami węglowymi przeznaczonymi na podłoża dla inżynierii tkankowej” Praca doktorska AGH 2006.