

WZROST I RÓŻNICOWANIE KOMÓREK KOSTNYCH NA MODYFIKOWANYCH PODŁOŻACH POLIMEROWYCH

B. POLAK*, W. FABIANOWSKI*, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ**

*WYDZIAŁ CHEMICZNY, POLITECHNIKA WARSZAWSKA, NOAKOWSKIEGO 3; 00 664 WARSZAWA

**ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA, AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE, CHAŁUBIŃSKIEGO 5; 02 004 WARSZAWA

Wstęp

Przyleganie i adhezja komórek do biomateriałów odpowiadają za właściwy wzrost, proliferacja i różnicowanie komórek. Ze względu na istotną rolę mechanizmów warunkujących odpowiednie zachowanie się komórek na różnych podłożach (np. implanty polimerowe do zastosowań w inżynierii tkankowej) prowadzone są liczne badania w zakresie zrozumienia i wpływania na proces adhezji komórek [1-5]. Ważną rolę odgrywają tu zatem modyfikacje powierzchniowe biomateriałów, mające za zadanie polepszenie adhezji, co z kolei zapewniłoby lepszy wzrost i różnicowanie komórek osteogenicznych.

W niniejszej pracy przeprowadzono serię doświadczeń, których celem było sprawdzenie odpowiedzi komórkowej na podłoża modyfikowane za pomocą wybranych substancji.

Materiały i metody

Do przeprowadzonych modyfikacji zostały użyte związki o charakterze hydrofobowym (związki polisiloksanowe) oraz hydrofilowym (poli(kwas akrylowy) (PAA), poli(tlenek etylenu), poli(ϵ -kapolakton), poli(metakrylan-2-hydroksyetylowy), poli(N-izopropylakrylamid), kopolimery poliuretanowo-polisiloksanowe, modyfikowane poliuretany, dekstran i jego modyfikacje poli(kwasem akrylowym) oraz solami wapnia oraz lekami) a także za pomocą warstw z protein (kolagen, albumina ludzka i bydłęca, fibronektyna), fosfolipidów (lecytyna i lizolecytyna) oraz naprzemiennie ułożonych multwarstw hybrydowych PAA-bentonit, PAA-bemite lub PAA-hydroksyapatyt. Sprawdzono również wpływ zastosowanych rozpuszczalników (woda, heksan, metanol, chlorek metylenu) na osteoblasty ludzkie w hodowli.

Wszystkie modyfikacje przeprowadzono w standardowych 96-studzienkowych płytkach polistyrenowych do hodowli komórkowej. Tak przygotowane płytki PS zostały poddane sterylizacji radiacyjnej (Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, dawka 25 kGy). Na każdej płytce pozostawiono jedną niemodyfikowaną kolumnę odniesienia i jedną naświetloną promieniowaniem UV ($\lambda=365\text{nm}$) jako kolumnę kontrolną, co pozwoliło na porównanie otrzymanych wyników. Każdą modyfikację powtórzono sześciokrotnie. Zostały przeprowadzone pomiary wartości kąta zwilżania modyfikowanych powierzchni za pomocą dwóch cieczy zwilżających: wody i roztworu DMEM (Dulbecco's Modified

GROWTH AND DIFFERENTIATION OF BONE CELLS ON MODIFIED POLYMERIC SURFACES

B. POLAK*, W. FABIANOWSKI*, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ**

*Department of Chemistry, Warsaw University of Technology, Noakowskiego 3; 00 664 Warsaw

**Department of Biophysics and Human Physiology, Medical University of Warsaw, Chałubińskiego 5; 02 004 Warsaw

Introduction

Both adherence and adhesion of cells to the biomaterials are responsible for proper growth, proliferation and differentiation of cells. Considering an essential role of mechanisms required for suitable cell behaviour at the interfaces of the different biomaterials (e.g. polymeric implants for tissue engineering applications) there are numerous works dedicated to understanding and promoting the cells adhesion process. Surface modifications play an important role here as a possibility for improvement of cells adhesion, which would assure better growth and differentiation of osteogenic cells.

We have performed several sets of experiments which main aim was to check the cells answer cultured on the modified polymeric surfaces.

Materials and methods

We used for modifications hydrophobic substances (polisiloxanes); hydrophilic (poly(acrylic acid), poly(ethylene oxide), poly(ϵ -caprolactone), poly(2-hydroxyethyl methacrylate), poly(N-isopropylacrylamide)); modified polyurethanes with carbonate bones; dextran and modified dextran with poly(acrylic acid) (PAA), calcium salt and drugs; films of proteins (collagen, human and bovine albumin, fibronectin); phospholipids (lecithin and lysolecithin) and multilayer polyelectrolyte films made from poly(acrylic acid)/bentonite, poly(acrylic acid)/hydroxyapatite and poly(acrylic acid)/bemite sublayers. An influence of used solvents (water, hexane, methanol, methylene chloride) on human osteoblast cells in culture was also examined.

All modifications were prepared in standard polystyrene, 96-wells plates for cell culture. Next all PS plates were sterilized (Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warsaw, dose 25kGy). In every plate there was one column left untreated - as a reference - and also one only UV treated ($\lambda=365\text{nm}$, distance 5cm) - as a control - in each PS plate. This enabled us to make comparisons between obtained results. Each modification was repeated six times. There were measured values of contact angle (CA) using two wetting liquids: water and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). CA values were measured before and after sterilization. Human bone cells were seeded on modified surfaces (Medical University of Warsaw) in standard conditions (37°C, 5% CO₂, in humidified 96% RH air environment). DMEM modified with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2mM), antibiotic (1%) was used as a culture medium.

Eagle Medium). Wartości kąta zwilżania zostały zmierzone zarówno przed jak i po procesie sterylizacji radiacyjnej. Następnie na modyfikowanych podłożach założono hodowlę komórkową (Akademia Medyczna w Warszawie). Wykorzystano w tym celu wyizolowane z tkanki kostnej osteoblasty ludzkie. Komórki hodowane były w inkubatorze zapewniającym stałą temperaturę (37°C), wysoką wilgotność (96%), atmosferę 5% CO₂. Jako pożywkę hodowlaną użyto roztwór DMEM, modyfikowany dodatkowo 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), L-glutaminą (2mM) i antybiotykiem (1%).

Zostały przeprowadzone obserwacje mikroskopowe morfologii komórek (mikroskop Nikon TS 100). Komórki wybarwiono fioletem krystalicznym i zmierzono gęstość optyczną (spektrofotometr Multiscan RC, $\lambda=540\text{nm}$). Przeprowadzono również dwa testy: test XTT oceniający żywotność komórek w hodowli oraz test ALP oceniający aktywność fosfatazy alkalicznej (spektrofotometr Multiscan RC, czytnik ELISA, $\lambda=405\text{nm}$). Na tej podstawie oszacowano średnie wielkości populacji komórek w hodowli (za 100% przyjęto wielkość populacji komórek hodowanych na niemodyfikowanych podłożach). Oceniono również jakość modyfikowanych powierzchni pod kątem przylegania do nich osteoblastów a także ich wzrostu i różnicowania na różnych podłożach. Wytypowano również modyfikacje do badań porowatych nośników komórek kostnych do zastosowań w inżynierii tkankowej.

Wyniki

Na hydrofilowych powierzchniach modyfikowanych za pomocą dekstranu z dodatkiem poli(kwasu akrylowego) uzyskano następujące wyniki: 89% w teście XTT i 163% w teście ALP; na podłożach modyfikowanych dekstranem z dodatkiem poli(kwasu akrylowego) i jonów wapnia otrzymano: 104% w teście XTT i 148% w teście ALP; na podłożach modyfikowanych samym poli(kwasem akrylowym) uzyskano - 126% w teście XTT oraz 107% w teście ALP; równie wysokie wyniki otrzymano na skutek modyfikacji przy użyciu warstw polielektrolitowych takich jak: PAA/hydroksyapatyt - 99% (XTT), 166% (ALP); PAA/bentonit - 103% (XTT), 119% (ALP); PAA/bentonit/poli(kwas akrylowy) - 113% (XTT), 141 (141%), PAA/bemite - 103% (XTT), 126% ALP. Najniższe wyniki po hodowli komórkowej otrzymano w przypadku podłoży poliuretanowych (rzędu ok. 20% komórek hodowanych na podłożach kontrolnych), co może być związane z warunkami prowadzenia syntezy (np. toksyczny wpływ na komórki zastosowanego rozpuszczalnika). Również niskie wyniki ilościowe po testach XTT i ALP otrzymano na hydrofobowych podłożach polisiloksanowych (oktadecylotrchlorosilan, polidimetylosiloksan, trimetoksywinylosilan).

Dyskusja

Komórki kostne wykazują dużą wrażliwość na podłoże, na którym mają wzrastać i różnicować się. Wysokie wyniki w teście XTT (wyższe niż w kontroli) świadczą o dobrej przeżywalności komórek kostnych w hodowli na powierzchniach modyfikowanych za pomocą omawianych powyżej związków hydrofilowych, szczególnie na bazie dekstranu. Z kolei wysokie wyniki testu ALP świadczą o obecności dużej ilości komórek osteogennych na tych samych powierzchniach.

Wnioski

Omawiane w niniejszej pracy powierzchnie o charakterze hydrofobowym nie mogą zostać wykorzystane do modyfikacji powierzchniowych mających na celu polepszenie pro-

Cells morphology was observed on microscope (Nikon TS 100). We also measured an optical density after cells staining with crystal violet (Multiscan RC spectrophotometer, $\lambda=540\text{ nm}$). Two tests: XTT test which determines viability of cells in culture and ALP test that specifies activity of alkaline phosphatase were carried out (Multiscan RC spectrophotometer, in ELISA reader, $\lambda=540\text{ nm}$). We estimated the average cells population on modified surfaces assuming as 100% the average osteoblast cells population from unmodified wells. The quality of cells cultures developed on modified surfaces was also evaluated. Some modifications were selected for further investigation as porous scaffolds - cell carriers in the tissue engineering applications.

Results

After treatment of PS surfaces with hydrophilic polymers: dextran modified with PAA we obtained following results: 89% in XTT test and 163% in ALP test; dextran modified with PAA and calcium ions - 104% in XTT test and 148% in ALP test; PAA - 126% (XTT), 107% (ALP); multilayer polyelectrolyte films from PAA/hydroxyapatite - 99% (XTT), 166% (ALP), PAA/bentonite - 103% (XTT), 119% (ALP), PAA/bentonite/poly(acrylic acid) - 113% (XTT), 141% (ALP), PAA/bemite - 103% (XTT), 126% (ALP). The lowest results of XTT test (about 20%) obtained for surfaces modified with polyurethanes. This can be caused by the unfavourable synthesis conditions (e.g. toxicity of used solvents). The results received for hydrophobic surfaces modified with polysiloxanes (octadecyltrichlorosilane, polydimethylsiloxane, vinyltrimethylsiloxane) were also low in the XTT and ALP tests.

Discussion

Bone cells are highly sensitive to the polymeric support on which they should growth and differentiate. High results of XTT tests (higher than control) prove good bone cells viability on discussed hydrophilic dextran modified surfaces. The high values of ALP test confirmed that there are numerous osteogenic cells on examined surfaces.

Conclusions

Hydrophobic surfaces discussed in this work cannot be applied as surface modifications which aim is an improvement the bone cells adhesion process on different supports. However, polysiloxane modifications can be applied in control deposition of cells as a protection preventing cells growth. A significant improvement of bone cells adherence was observed on examined hydrophilic surfaces, which might be taken as base surface modifications for bone cells carriers.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Agnieszka Jurkowska (WAM) for assistance with cell cultures and microscopy measurements.

This work was supported by KBN grant 4 TO8E 01824.

cesu adhezji komórek kostnych do podłoża. Jednakże modyfikacje polisiloksanowe mogą znaleźć zastosowanie w kontrolowanym osadzaniu komórek w celu zabezpieczenia przed ich adhezją do podłoża. Z kolei przedstawione modyfikacje o charakterze hydrofilowym, które znacznie poprawiają adhezję osteoblastów mogą być wzięte pod uwagę jako modyfikatory powierzchniowe nośników komórek kostnych.

Podziękowania

Serdecznie dziękujemy Pani Agnieszce Jurkowskiej za pomoc przy hodowlach komórkowych i pomiarach mikroskopowych.

Niniejsza praca została zrealizowana z grantu KBN 4 TO8E 01824.

TYPY WSPÓŁCZEŚNIE UŻYWANYCH PROTEZ STAWÓW SKRONIOWO-ŻUCHWOWYCH

MAREK ADWENT, TADEUSZ CIEŚLIK

I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ WYDZIAŁU LEKARSKIEGO W ZABRZU
ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W KATOWICACH,
UL. BUCHENWALDCZYKÓW 19, 41-800 ZABRZE.

Protezy stawów skroniowo-żuchwowych są stosowane w klinice człowieka od czwartej dekady XX wieku. Jednakże w odróżnieniu od protez stawów biodrowego, łokciowego czy kolanowego nie są one powszechne. Wynika to z wielu czynników, które odróżniają staw skroniowo-żuchwowy od pozostałych stawów. Brak jest ogólnie przyjętych światowych standardów, które określałyby jakie warunki powinny zostać spełnione aby implantacja protezy stawu skroniowo-żuchwowego zakończyła się powodzeniem [2]. Staw skroniowo-żuchwowy ma skomplikowaną budowę anatomiczną, a co za tym idzie złożoną funkcję. Jest dwupiętrowym stawem parzystym, w którym odbywają się ruchy rotacyjne i saneczkowe. Sąsiedztwo ważnych struktur anatomicznych jak naczynia krwionośne, nerwy, narząd słuchu, mózg oraz stosunkowo delikatna budowa kości panewki stawowej i niewielki rozmiar stawu sprawiają, że chirurgiczne leczenie schorzeń stawu skroniowo-żuchwowego za pomocą endoprotez jest niezwykle skomplikowane.

Całkowite protezy stawu skroniowo-żuchwowego składają się z protezy panewki stawowej i protezy wyrostka kłykciowego. Proteza wyrostka kłykciowego jest mocowana do zewnętrznej powierzchni gałęzi żuchwy za pomocą kilku śrub, po wcześniejszym odcięciu wyrostka kłykciowego. Stosowane są w przypadkach, w których konieczna jest częściowa resekcja żuchwy obejmująca jej gałąź wraz z wyrostkiem kłykciowym. Tyczy się to zazwyczaj schorzeń o podłożu nowotworowym. Zastosowanie częściowej protezy stawu skroniowo-żuchwowego jest nieco ograniczone. Siły jakimi proteza głowy stawowej oddziałuje na kość panewki stawowej są tak duże, że mogą doprowadzić do jej pęknięcia, na skutek braku amortyzacji, jaką zapewnia krążek stawowy.

Piśmiennictwo

References

- [1] L.G. Griffith, *Acta materialia*, 48 (2000) 263.
- [2] B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch, *Materials Science and Engineering*, R34 (2001) 147.
- [3] K. Burg, S. Porter, J. Kellam, *Biomaterials*, 21 (2000) 2347.
- [4] K. T. Nguyen, J. L. West, *Biomaterials*, 23 (2002) 4307.
- [5] D. Castner, B. Ratner, *Surface Science*, 500 (2002) 28.
- [6] J. Morgan, *Intern. Biotechn. Lab.*, June (2003) 12.
- [7] X. Yang, K. Zhao, G. Chen, *Biomaterials*, 23 (2002) 1391.
- [8] YB. Polak*, W. Fabianowski*, M. Lewandowska-Szumieł**, An, S. Woolf, R. Friedman, *Biomaterials*, 21 (2000) 2635.
- [9] K. Anselme, *Biomaterials*, 21 (2000) 667.
- [10] M. Hasenbein, T. Andersen, R. Bizios, *Biomaterials*, 23 (2002) 3937.
- [11] B. Polak, MSc Thesis, Department of Chemistry, Warsaw University of Technology (2003).

THE TYPES OF TEMPOROMANDIBULAR JOINT PROSTHESIS USED IN TREATMENT

MAREK ADWENT, TADEUSZ CIEŚLIK

I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ WYDZIAŁU LEKARSKIEGO W ZABRZU
ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W KATOWICACH,
UL. BUCHENWALDCZYKÓW 19, 41-800 ZABRZE.

The temporomandibular joint (TMJ) prosthesis are being used since 4th decade of XX-th century. However despite of for example hip joint or knee joint endoprosthesis are not very common. This situation results from some factors that differ the TMJ from other human joints. There are no general standards which would define the conditions that are necessary to make the TMJ implantation successful [2]. The TMJ is complicated anatomical and functional structure. It is double compartment even joint in which sliding and rotating movements take place. Proximity of important anatomical structures such as blood vessels, nerves, brain as well as gentle structure of bone and small size of joint are the reasons that cause surgical treatment of TMJ very difficult.

Total TMJ prosthesis consist of fossa eminence prosthesis (FEP) and condylar prosthesis (CP). The condylar prosthesis is attach to the lateral surface of mandible ramus with screws after resection of condylar process. This device is usually used in cases where resection of mandible ramus with condylar process is necessary, because of tumor presence. The usage of condylar prosthesis is limited. It is because of poor amortization and high forces which can damage the scull basis bone.

The solution to this problem was introduction of fossa eminence prosthesis which protect scull basis from damage. The total TMJ prosthesis have been used since forties and for years different solutions were proposed by scientist, what was connected with mentioned difficulties.

The main problem is exact fitting of FEP to the bone. The close fitting provides better fixation of prosthesis. The prosthesis contacts to the bone in three points. In normal