

# CYTOKOMPATYBILNOŚĆ BIOMATERIAŁÓW ZŁOŻONYCH Z PLGA/PLLA MODYFIKOWANYCH KRZEMIONKĄ PRZEZNACZONYCH DO REGENERACJI TKANKI KOSTNEJ

JOANNA LESZCZYŃSKA<sup>1</sup>, JOANNA WÓJTOWICZ<sup>1</sup>,  
STANISŁAW SŁOMKOWSKI<sup>2</sup>, STANISŁAW SOSNOWSKI<sup>2</sup>,  
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,  
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA

<sup>2</sup> CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH I MAKROMOLEKULARNYCH,  
POLSKA AKADEMIA NAUK,  
UL. SIENKIEWICZA 112, 90-363 ŁÓDŹ, POLSKA

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

## Streszczenie

Zastosowanie rusztowań poliestrowych jako biomateriałów dla regeneracji tkanki kostnej jest szeroko podejmowanym tematem badawczym. Udowodniono, że zastosowanie ceramicznych wypełniaczy wpływa na poprawę cytokompatybilności, wytrzymałości mechanicznej oraz możliwości kontroli degradacji materiałów poliestrowych. W niniejszej pracy poddano obserwacjom *in vitro* kopolimer poli(kwasu-D,L-mlekowego-ko-glikolowego) (PLGA/PLLA) z domieszką poli(L,L-laktydu) (PLLA) modyfikowany krzemionką – jako potencjalny materiał na rusztowania do regeneracji tkanki kostnej. W siódmym dniu hodowli na badanym materiale zaobserwowano wysoką przeżywalność ludzkich komórek osteogennych oraz podwyższoną aktywność fosfatazy zasadowej w stosunku do hodowli kontrolnej, tj. na powierzchni standardowego polistyrenowego naczynia hodowlanego. Prawidłową adhezję i rozplaszczanie komórek na badanym podłożu potwierdzono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. Długotrwała obserwacja *in vitro* została przerwana w trzynastym dniu hodowli ze względu na nagłe uwolnienie kwaśnych produktów końcowych degradacji materiału, które spowodowało śmierć komórek.

Należy zatem brać pod uwagę, że ze względu na specyfikę hydrolizy poliestrów w przypadku litych podłoży może następować nagromadzenie produktów degradacji wewnątrz materiału, a następnie ich erupcja skutkująca gwałtownym zakwaszeniem pożywki. Biorąc pod uwagę możliwość uniknięcia tego efektu przy zastosowaniu odpowiedniej architektury rusztowań z badanego materiału i zadowalające wyniki uzyskane w niniejszej pracy, postulujemy, iż materiał PLGA/ PLLA modyfikowany krzemionką może służyć jako odpowiednie podłoże dla ludzkich komórek osteogennych w warunkach *in vitro*.

**Słowa kluczowe:** poliestry, krzemionka, degradacja, regeneracja tkanki kostnej

[Inżynieria Biomateriałów, 103, (2011), 17-22]

# CYTOCOMPATIBILITY OF SILICA-MODIFIED PLGA/PLLA BIOMATERIALS FOR BONE TISSUE REGENERATION

JOANNA LESZCZYŃSKA<sup>1</sup>, JOANNA WÓJTOWICZ<sup>1</sup>,  
STANISŁAW SŁOMKOWSKI<sup>2</sup>, STANISŁAW SOSNOWSKI<sup>2</sup>,  
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
CHALUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> CENTRE OF MOLECULAR AND MACROMOLECULAR STUDIES,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
SIENKIEWICZA 112, 90-363, ŁODZ, POLAND

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

## Abstract

*Polyester scaffolds are widely investigated as biomaterials for bone tissue regeneration. Several ceramic fillers were proved to improve their cytocompatibility, mechanical strength and the control over their degradation. In this study, poly(L-lactide) mixed with poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA/PLLA), modified with silica filler, was investigated as a candidate material for scaffolds for bone tissue regeneration. Human bone derived cells were observed in a culture on solid disks prepared from the examined material. Cell number and viability was found to be satisfying and alkaline phosphatase activity was even higher comparing to the control (cells cultured on tissue culture polystyrene) after 7 days of culture. Cell adhesion and spreading was confirmed with a scanning electron microscope. The prolonged *in vitro* culture was inhibited on day 13 due to a sudden release of acidic end-products of the material degradation, which was lethal for the cells.*

*It is postulated that silica modified PLGA/PLLA may serve as a satisfactory support for human bone cells *in vitro*. However, if the material is used in bulk form, the accumulation of the degradation products within the material, followed by a rapid acidification of the culture medium, should be taken into account. This phenomenon is harmful for the cells, but it may probably be avoided by using appropriate scaffold architecture.*

**Keywords:** polyesters, silica, degradation, bone tissue regeneration

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 17-22]

## Introduction

Synthetic polyesters, particularly poly(D,L-lactic acid) (PDLLA) and polyglycolic acid (PGA), as well as their copolymer poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid), attracted much attention as bone regeneration biomaterials [1-3]. Some polyester-based materials have already been approved for clinical use and they were assessed as biocompatible and efficient in tissue regeneration [4,5]. The main advantage is their bioresorbability, which means that with time the biomaterials vanish completely, since their degradation end-products – lactic and glycolic acids – enter the physiological metabolic pathways [6]. On the other hand, polyester degradation rate is difficult to be controlled after implantation *in vivo*.

Syntetyczne poliestry, w szczególności poli(kwas-D,L-mlekowy) (PDLLA) i poli(kwas glikolowy) (PGA) oraz ich kopolimer poli(kwas-D,L-mlekowy-ko-kwas glikolowy) są atrakcyjnymi materiałami mogącymi posłużyć jako narzędzie w regeneracji tkanki kostnej [1-3]. Niektóre z poliestrowych biomateriałów zostały już zaakceptowane do użycia klinicznego i ocenione jako materiały biokompatybilne i skuteczne w regeneracji tkanek [4,5]. Główną zaletą tych materiałów jest ich bioresorbowalność, oznaczająca ich całkowity zanik w czasie, dzięki włączeniu ich produktów degradacji, czyli kwasu mlekowego i glikolowego, w fizjologiczne szlaki metaboliczne [6]. Trudne jest jednakże kontrolowanie tempa degradacji poliestrów po implantacji *in vivo*. W konsekwencji ograniczone są możliwości przewidywania stopnia zakwaszenia tkanek w okolicy wszczepu [7-9] oraz zmian właściwości mechanicznych materiału w czasie, co jest szczególnie istotne przy zastosowaniu polimerów do regeneracji tkanki kostnej. Obecnie wiele uwagi poświęca się zastosowaniu dodatków w postaci różnych napełniaczy ceramicznych, mających na celu polepszenie funkcjonalności polilaktydów/poliglikolidów. Na przykład potwierdzono, że dodatek hydroksyapatytu poprawia cytokompatybilność poliestrów [10-13]. Cząsteczki hydroksyapatytu, a także innych trójfosforanów wapnia czy też szkła biologicznego, poprawiały wytrzymałość mechaniczną [14-18]. Także na stopień degradacji poliestrów można wpływać poprzez dodatek buforujących cząstek nieorganicznych, np. trójfosforanów wapnia [19,20] lub, nawet z większą wydajnością, węglanów wapnia [21,22].

Celem niniejszej pracy jest ocena reakcji ludzkich komórek osteogennych na podłoże złożone z mieszaniny PLGA/PLLA z domieszką PLLA, modyfikowanej mikrocząstkami krzemionki. Materiał został poddany wstępnej ocenie cytotoxyczności jako potencjalne rusztowanie dla inżynierii tkankowej kości.

## Materiały i metody

### Otrzymywanie próbek PLGA/PLLA

Kwas poli(L-mlekowy) (PLLA) zsyntetyzowano z L,L-dilaktynu (Boehringer–Ingelheim) na drodze polimeryzacji pseudo-anionowej inicjowanej dietyloetoksyginem, prowadzonej w suchym 1,4-dioksanie. PLLA wytrącono do metanolu i suszono pod próżnią. Surowy polimer rozpuszczono w dichlorometanie i wytrząsano z 0,1 N HCl w celu usunięcia glinu. Po zobojętnieniu 0,1 N roztworem  $\text{NaHCO}_3$  i przemyciu wodą destylowaną polimer wytrącono dwukrotnie do metanolu i suszono w próżni. Ciężar cząsteczkowy scharakteryzowano metodą SEC-MALLS. Otrzymano wartość  $M_n = 25\,400$  i  $M_w/M_n = 1,11$  [23].

Poli[(kwas mlekowy)-ko-(kwas glikolowy)] (PLGA), handlowa nazwa Resomer RG504H, przeznaczony do zastosowań medycznych (Boehringer-Ingelheim, Germany), używano bez obróbki. Resomer GR504H jest statystycznym kopolimerem D,L-dilaktynu i glikolidu o składzie molowym 49:51, odpowiednio. Ciężar cząsteczkowy  $M_n$  wyznaczony metodą SEC-MALS wynosił 12 400, a współczynnik dyspersji  $M_w/M_n = 1,24$ . Przed użyciem PLGA przesiano przez sito 200-mesh.

Napełniacz krzemionkowy o ziarnie 10 mikrometrów z powierzchnią pokrytą kowalencyjnie związanym modyfikatorem otrzymano analogicznie jak nanokrzemionkę [24]. W pierwszym etapie krzemionkę (99,5%, Aldrich) inkubowano przez trzy godziny z 2% (obj./obj.) roztworem 3-glycydoksypropylotrimetoksylanu (GPS) (Aldrich) w toluenie, aby związać z powierzchnią pierścień oksiranowy. Następnie krzemionkę przemycano toluenem i suszono w próżni.

In consequence, accumulated acidic end-products may lead to an inflammatory response [7-9]. Additionally, the mechanical properties of the material are unpredictable in time. The latter is of particular importance for the applications of polyesters in bone tissue regeneration. The addition of various ceramic fillers is currently widely investigated in order to improve the functionality of polylactides/polyglycolides. For example, filling polyesters with hydroxyapatite enhanced their cytocompatibility [10-13]. Hydroxyapatite, other tricalcium phosphates or bioglass particles, enhanced their mechanical strength [14-18]. Also, the degradation rate of polyester can be influenced by adding buffering inorganic particles of e.g. tricalcium phosphates [19,20] or, even more efficiently, calcium carbonates [21,22].

The aim of this study is an examination of human bone derived cells' response toward the PLGA/PLLA modified with silica microparticle filler. The material is intended to be used as candidate scaffold for bone tissue engineering. Particular attention has been paid to the cell response in the culture prolonged to the stage of the advanced degradation of the material.

## Materials and methods

### Polymer disks preparation

The poly(L-lactic acid) (PLLA) was synthesized by pseudoanionic polymerization of L,L-dilactide (Boehringer-Ingelheim, Germany). The polymerization, initiated with diethoxyethyl-aluminum, was carried out in dry 1,4-dioxane. The resulting polymer was precipitated into cold methanol and dried in vacuum. Then, it was dissolved in dichloromethane and the alumina from the initiator was removed by shaking the solution with 0.1 N HCl. After neutralization with a 0.1 N solution of  $\text{NaHCO}_3$  and washing with distilled water, the polymer was precipitated twice into cold methanol and dried under high vacuum. The polymer was characterized by SEC-MALLS, which gave  $M_n = 25\,400$  and  $M_w/M_n = 1.11$ . A more detailed description has been published elsewhere [23].

Poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)] (PLGA), with the commercial name Resomer RG504H, of medical grade (Boehringer-Ingelheim, Germany), was used as received. The polymer was a random copolymer of D,L-dilactide and glycolide with a molar ratio of comonomers equal to 49:51, respectively. Its molecular weight was determined by SEC and gave  $M_n = 12\,400$  and  $M_w/M_n = 1.24$ . Prior to use the copolymer powder was sieved by a 200-mesh grid.

The micron-sized silica filler with a polymer-coated surface was prepared in the same manner as reported for nanosilica [24]. The modification consisted of several steps. First, silicon dioxide particles (99.5%, Aldrich) were incubated for three hours with a 2% (v/v) solution of 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane (GPS) (Aldrich) in toluene in order to bind an oxirane ring with the surface of silica. The modified silica was purified by several centrifugations and redispersions in pure toluene. Then, the dried silica was added to the solution of living polyoxirane in THF, which did react with the oxirane ring attached to the surface. The reaction generated anionic active centers on the silica surface used for subsequent polymerization of L,L-lactide.

10 g portions of each polymer (Resomer RG504H and PLLA) and 4.52 g of the silica particles (20% v/v) were placed in a flask and the flask was rotated horizontally overnight at 2 rev/s in order to mix all components. Portions of 255 mg of the stock mixture were pressed in a stainless steel form (at r.t., 240 MPa, 4 min). The obtained pellets were 1.5 mm thick and 13 mm in diameter to fit the bottom of the 24-well dish.

The materials were sterilized by electron beam (25 kGy) before cell culture.

Zmodyfikowaną krzemionkę dodano do roztworu żyjącego polioksiranu w THF, w wyniku czego polioksiran przyłączył się do pierścienia oksiranowego związanego z powierzchnią, generując anionowe centrum aktywne, użyte następnie do polimeryzacji L,L-laktydu.

Porcje 10 g obu polimerów (Resomer RG504H I PLLA) oraz 4,52 g modyfikowanej krzemionki (20% wag.) mieszano przez noc w kolbie obracającej się horyzontalnie z szybkością 2 obr./s. 255 mg mieszanki umieszczano w stalowej formie i formowano płytki w temp. otoczenia pod ciśnieniem 240 MPa, przez 4 min. Otrzymano płytki o grubości 1,5 mm i średnicy 13 mm, mieszczące się w dołkach 24-studzienkowych płytek hodowlanych.

Próbki sterylizowano radiacyjnie dawką 25 kGy.

#### **Hodowla ludzkich komórek izolowanych z tkanki kostnej**

Do doświadczeń użyto ludzkich komórek izolowanych z fragmentów tkanki kostnej (HBDCs – od ang.: human bone derived cells) przy użyciu metody opisanej przez Gallaghera [25]. Autorzy posiadają zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na wykorzystanie komórek pochodzących z ludzkich tkanek, które po zabiegach operacyjnych przeznaczone są do utylizacji.

Komórki wysiano na powierzchnię kształtek polimerowych, umieszczonych uprzednio w studzienkach 24-dołkowych płytek hodowlanych, w liczbie 250 000 komórek na próbkę materiału do oznaczeń ilościowych oraz 50 000 komórek na próbkę materiału do oceny mikroskopowej. 24 godziny po wysianiu komórek podstawową pożywkę hodowlaną Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (FBS), 1% L-glutaminy, 1% antybiotyku oraz 120 mM 2-fosforanu L-kwasu askorbinowego wzbogacono w czynniki różnicujące, tj.: 10 nM witaminę D3, 10 nM deksametazon oraz 10 nM  $\beta$ -glicerofosforan (Sigma). Zastosowano DMEM zawierający czerwień fenolową dla kontroli zmian pH (kolor czerwony oznaczał pH obojętne, zaś kolor żółty zakwaszenie pożywki).

Pożywkę różnicującą wymieniano w hodowlach co 2 lub 3 dni. Kontrolę w testach ilościowych stanowiły komórki wysiane w liczbie 500 000 na powierzchnię polistyrenowych butelek hodowlanych.

Hodowlę prowadzono przez 2 tygodnie w inkubatorze CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Oznaczenia ilościowe planowano wykonać w 7 i 14 dniu hodowli. Ze względu na nagłe zakwaszenie medium hodowlanego, które wystąpiło w 13 dniu hodowli, odstąpiono od wykonania oznaczeń w dniu 14.

#### **Oznaczenie przeżywalności komórek (test XTT)**

Test XTT służy do oceny efektywności przekształcania żółtego, rozpuszczalnego w wodzie substratu XTT (pochodna tetrazolu) przez mitochondrialne dehydrogenazy do rozpuszczalnego w wodzie formazanu. Ilość kolorowego produktu jest proporcjonalna do liczby komórek oraz ich aktywności metabolicznej [26].

Kształtki umieszczone w płytkach hodowlanych przepłukiwano roztworem PBS. Następnie do każdej studzienki dodawano roztwór XTT (0,45 mM) z dodatkiem metatarsianu fenazy (7,5  $\mu$ M). Po 4 godzinach inkubacji w 37°C zebrano supernatanty i w czytniku płytek ELISA przy długości fali 450 nm odczytano wartość absorbancji barwnego produktu. Test wykonano w 7 dniu hodowli ludzkich komórek osteogennych osadzonych na powierzchni badanych kształtek. Planowano przeprowadzenie oznaczenia także w 14 dniu hodowli, jednak ze względu na nagłe zakwaszenie medium 13 dnia, powodujące obumieranie komórek, zrezygnowano z testów w tym punkcie czasowym (zob. wyniki). Ludzkie komórki osteogenne hodowane na podłożu polistyrenowych naczyń hodowlanych posłużyły jako kontrola.

#### **Human bone derived cell culture**

Human bone derived cells (HBDCs) were used in the experiments described. The cells were isolated from bone chips by a method described by Gallagher [25]. The authors obtained an approval of the Bioethics Committee of the Medical University of Warsaw for the experimental use of human cells from tissues harvested during surgery and which would otherwise be discarded.

The cells were seeded on the disks placed tightly in a 24-well culture dish in the number of 250 000 per scaffold for quantitative assays and 50 000 per disk for microscopic observations. After 24 h the culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM medium (Gibco) supplemented with foetal bovine serum (FBS) (10%), L-glutamine (1%), antibiotic-antimycotic mixture (1%) and L-ascorbic acid 2-phosphate (120 mM)) was supplemented with osteoblastic differentiating agents: vitamin D3 (10 nM), dexametazone (10 nM) and  $\beta$ -glycerophosphate (10 mM) (Sigma). Phenol red-containing DMEM was used in order to control the pH changes (red color means neutral pH, yellow – aciditation).

The differentiating medium was changed every 2 or 3 days. Cells in the number of 500 000 were cultured on tissue culture polystyrene bottles as a control for each quantitative assay and time point.

After cell seeding the dishes were maintained in an incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for 2 weeks. After 7 and 14 days, quantitative assays were planned to be performed. Due to the sudden culture medium aciditation, which occurred on the 13<sup>th</sup> day of culture, quantitative assays planned for day 14 were not performed.

#### **Cell viability testing (XTT assay)**

The XTT assay is based on the on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzymes in living cells to convert the yellow water-soluble substrate (2,3-bis(2methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carboxyl]-2H-tetrazolium hydroxide) into a highly colored water-soluble formazan product. The amount of the colored product is proportional to the number of cells and their metabolic activity [26].

The disks were washed with PBS in a 24-well culture dish. 1.020 ul of XTT (0.45 mM) and phenazine methosulphate (7.5  $\mu$ M) solution in DMEM was added to each well. After 4-hour incubation in 37°C, the supernatants (120 ul) were collected and the absorbances of orange formazan product dyes were directly read in microplate ELISA reader at 450 nm. The assay was performed on day 7 in the HBDC culture on the solid disks. It was planned to be done also on day 14, but this was abandoned due to the rapid material degradation on day 13 (see results) which was lethal for cells. HBDCs cultured on tissue culture polystyrene (TCPS) served as a control.

#### **Alkaline phosphatase activity (ALP)**

Alkaline phosphatase activity was quantified by ALP Assay Kit (Sigma) on day 7 in the HBDC culture on the solid disks. The cell lysates were prepared by adding 1 ml of 10 mM TrisHCl-0.1% Triton X-100 into a well of 24-well dish. The conversion of parantitrophenylphosphate to para-nitrophenol by ALP lasted 30 minutes in room temperature and the absorbance was measured in a microplate ELISA reader at 405 nm. HBDCs cultured on tissue-culture-polystyrene (TCPS) served as a control.

#### **DNA quantity (PicoGreen assay)**

ALP activity was normalized to the DNA quantity of each culture. The DNA was measured in the fluorescent assay PicoGreen (Invitrogen). The cell lysates, described above, were used according to the protocol provided by the producer.

### Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP)

Aktywność fosfatazy zasadowej oznaczano przy użyciu zestawu ALP Assay Kit (Sigma) w 7 dniu hodowli ludzkich komórek osteogennych osadzonych na powierzchni kształtek polimerowych. Lizaty komórkowe przygotowano poprzez dodanie roztworu 10 mM TrisHCl-0,1% Triton X-100 do każdej studzienki płytki 24-dółkowej. Hydrolizę paranitrofenylofosforanu do para-nitrofenolu przez fosfatazę zasadową prowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie wykonywano pomiar absorbancji w czytniku ELISA przy długości fali 405 nm. Hodowla ludzkich komórek osteogennych na powierzchni polistyrenowego naczynia hodowlanego posłużyła jako kontrola.

### Oznaczenie ilości DNA (test PicoGreen)

Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP) znormalizowano do ilości DNA. Ilość DNA oznaczono fluorescencyjnie za pomocą zestawu PicoGreen (Invitrogen). Lizaty komórkowe przygotowano według procedury opisanej powyżej i następnie użyto ich do oznaczeń, które prowadzono według protokołu producenta.

### Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Próbki materiału z osadzonymi na nich komórkami utrwalaono roztworem glutaraldehydu. Powierzchnie biomateriałów obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Hitachi SEM) w 7 i 13 dniu hodowli.

## Wyniki i dyskusja

### Przeżywalność komórek (test XTT)

Przeżywalność komórek oznaczoną w 7 dniu hodowli przedstawiono na RYS. 1. Wartość absorbancji mierzona testem XTT była niższa w hodowlach na badanych materiale w stosunku do kontroli (komórki hodowane na podłożu polistyrenowego naczynia hodowlanego), aczkolwiek jej poziom przekraczał 70% wartości uzyskanej w kontroli. Oznaczenia nie wykonano w 14 dniu doświadczenia ze względu na nagłe zakwaszenie pożywki hodowlanej, zaobserwowane w dniu 13, które skutkowało śmiercią komórek. Na podstawie obserwacji morfologicznej oceniono, że stan komórek w dniu poprzedzającym był dobry (RYS. 3).

Degradacja poliestrów o wymiarach ponad 1 mm przebiega heterogenicznie [27]. Powolna dyfuzja kwaśnych produktów degradacji jest przyczyną ich akumulacji wewnątrz próbki i autoakceleracji procesu. Przy znaczącym postępie degradacji zewnętrzna warstwa próbki także ulega zniszczeniu i następuje gwałtowne uwolnienie produktów degradacji prowadzące do zakwaszenia medium hodowlanego. Szybkie zakwaszenie medium może być szkodliwe dla komórek w hodowli [28]. Możliwe jest jednak jego kontrolowanie przez dobór wielkości i struktury próbek [29].

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że badany materiał może stanowić odpowiednie podłoże dla ludzkich komórek osteogennych, aż do czasu nagłej dezintegracji materiału. Zjawisko nagłej dezintegracji litych kształtek zbudowanych z PLGA/PLLA powinno być brane pod uwagę w czasie hodowli żywych komórek.

### Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP)

Na RYS. 2 przedstawiono aktywność enzymatyczną fosfatazy zasadowej (ALP) oznaczoną w 7 dniu hodowli. Wartości aktywności enzymu znormalizowano do ilości DNA, oznaczonej testem PicoGreen. Testu nie wykonywano w 14 dniu, ze względu na nagłe zakwaszenie pożywki hodowlanej, które zaobserwowano w 13 dniu hodowli.

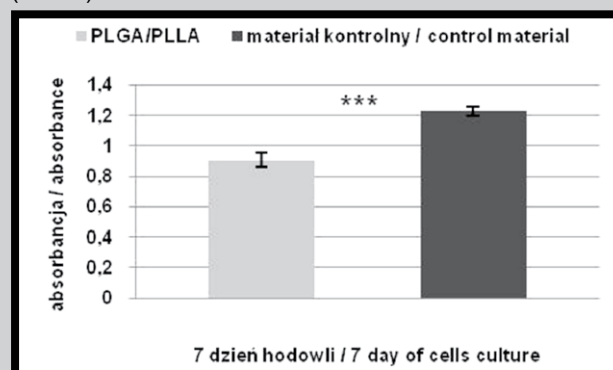
### Scanning Electron Microscope (SEM) observations

The control disks (without cells) and the disks with cell culture were fixed with glutaraldehyde. The surfaces of the biomaterials were observed in SEM (Hitachi) on day 7 and on day 13.

## Results and Discussions

### Cell viability (XTT assay)

Cell viability measured on day 7 is presented on FIG. 1. XTT absorbance in the culture on the investigated materials is lower than in the control (tissue culture polystyrene), but still at the level of more than 70%. The assay was not performed on day 14 due to a sudden culture medium acidification, which was observed on day 13. This was accompanied by rapid cell death in the whole population, although the condition of the cells estimated on the basis of morphological observation on the previous day was fine (FIG. 3).



**RYS. 1. Przeżywalność ludzkich komórek osteogennych mierzona 7 dnia hodowli przy użyciu testu XTT. Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).**

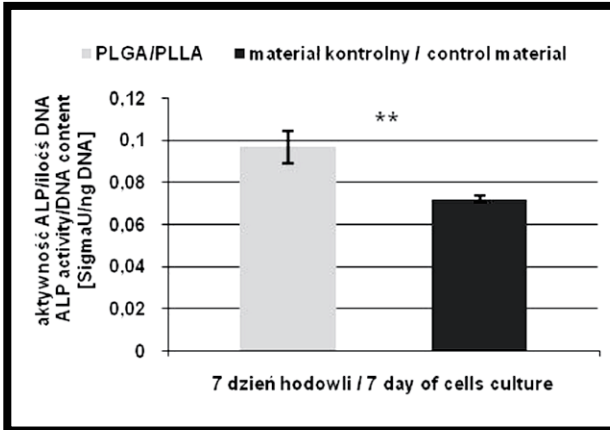
**FIG. 1. Human bone derived cells' viability measured on day 7 of culture using the XTT assay. The results were statistically analyzed with Student's t-test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).**

The mechanism of degradation of macroscopic devices made from aliphatic polyesters is heterogenous [27]. It was established that the degradation is more rapid inside the sample than at the surface because of the accumulation of acidic products inside. The advancement of the degradation process causes a disintegration of the outer layer and a sudden release of a large amount of acidic compounds. The rapid acidification may be harmful for cells in the culture [28]. The scale of the eruption of the acidic degradation products may be controlled by the size and architecture of the samples [29].

The obtained results confirm that the investigated material might serve as a satisfactory support for human bone derived cells up to the sudden disintegration of the material – a phenomenon which should be taken into account when PLGA/PLLA-based materials are put in contact with living cells.

### Alkaline phosphatase activity (ALP)

Alkaline phosphatase (ALP) enzymatic activity of the cells on Day 7 is presented in FIG. 2. The results are normalized to the DNA quantity measured in a PicoGreen assay. The assay was not performed on day 14, due to a sudden acidification of the culture medium, which was observed on the 13 day of culture.



**RYS. 2. Aktywność fosfatazy zasadowej (ALP) znormalizowana do ilości DNA w 7 dniu hodowli. Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test t-Studenta (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ). FIG. 2. Alkaline phosphatase activity (ALP) normalized to the DNA content on day 7 of cell culture. The results were statistically analyzed with Student's t-test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ).**

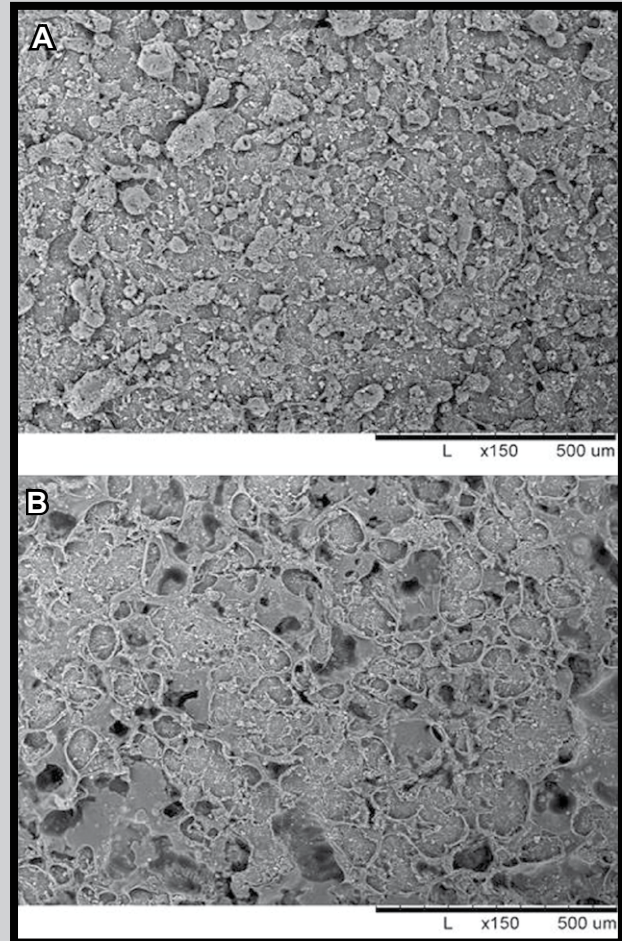
Fosfataza zasadowa jest uznawana za dobry, choć niespecyficzny marker wczesnej fazy różnicowania w kierunku osteoblastów [30,31]. Otrzymano zadowalający wynik wskazujący, iż aktywność ALP była wyższa w hodowlach na powierzchni polimerów modyfikowanych krzemionką niż w kontroli.

#### Obserwacje mikroskopowe (SEM)

Obraz komórek na powierzchni badanych materiałów przedstawiono na RYS. 3. Pomimo trudności w obserwacji wynikającej z rozwinięcia powierzchni podłoża, w obu punktach czasowych widoczne są komórki rozplaszczone na powierzchni materiału. W 13 dniu widoczne jest większe zagęszczenie komórek, tworzących sieć na badanej powierzchni.

#### Wnioski

Kopolimer PLGA/PLLA z domieszką PLLA zmodyfikowany dodatkiem krzemionki jest materiałem dobrze tolerowanym przez ludzkie komórki osteogenne w warunkach in vitro. Potwierdza to wysoki stopień przeżywalności komórek na materiale oraz wysoka aktywność fosfatazy zasadowej w hodowli ludzkich komórek osteogennych. W czasie przedłużonej hodowli należy brać pod uwagę ryzyko nagłego uwolnienia kwaśnych produktów degradacji do pożywki hodowlanej, co wywołuje efekt letalny. Ponieważ przebieg procesu degradacji zależy do wielkości fragmentów litego materiału poliestrowego, w zastosowaniach, w których takie materiały mają stanowić podłoże dla hodowli lub transplantacji komórek, należy właściwie dobrać strukturę rusztowania.



**RYS. 3. Zdjęcia SEM ludzkich komórek osteogennych osadzonych na powierzchni badanych materiałów w 7 dniu hodowli (A) i w 13 dniu hodowli (B).**

**FIG. 3. SEM images of human bone derived cells seeded on the surface of the investigated materials on day 7 (A) and on day 13 (B).**

Alkaline phosphatase is considered a good although not specific marker of the early stages of osteoblast differentiation [30,31]. The activity of ALP was higher in the culture on the silica-modified disks than in the control, which is advantageous.

#### Scanning Electron Microscope (SEM)

The cells spread on the surface of the investigated samples are presented in FIG. 3. The cell network is more dense on day 13.

#### Conclusions

PLGA/PLLA modified with silica filler is well tolerated by human bone derived cells in vitro, which was confirmed by the satisfactory cell viability, as well as by the alkaline phosphatase activity, which was found of a higher value than in the positive control. However, if such material is planned to be used as a scaffold for cell transplantation, a rapid release of the acidic end-products of the material degradation into the culture medium should be expected after a prolonged culture. This phenomenon has a lethal effect on the cells. In view of the fact that the intensity of the acid eruption would depend on the size of the bulk polyester pieces – due to the nature of the polyesters degradation process – it is postulated that the scaffold architecture should be carefully selected.

Praca zrealizowana w ramach projektu R13 01901 finansowanego przez MNiSW.

This scientific work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education, grant R13 01901.

## Piśmiennictwo

- [1] Hutmacher, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000. 21(24): p. 2529-43.
- [2] Ishaug, S.L., et al., Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 1997. 36(1): p. 17-28.
- [3] Widmer, M.S., et al., Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials*, 1998. 19(21): p. 1945-55.
- [4] Yu, N.Y., et al., Biodegradable poly(alpha-hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010. 93(1): p. 285-95.
- [5] Athanasiou, K.A., G.G. Niederauer, and C.M. Agrawal, Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 1996. 17(2): p. 93-102.
- [6] Barrett, D.G. and M.N. Yousaf, Design and applications of biodegradable polyester tissue scaffolds based on endogenous monomers found in human metabolism. *Molecules*, 2009. 14(10): p. 4022-50.
- [7] Bostman, O., et al., Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br*, 1990. 72(4): p. 592-6.
- [8] Lu, L., et al., In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, 2000. 21(18): p. 1837-45.
- [9] Kim, M.S., et al., An in vivo study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA- and/or porcine small intestinal submucosa-based scaffolds. *Biomaterials*, 2007. 28(34): p. 5137-43.
- [10] Kim, S.S., et al., Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006. 27(8): p. 1399-409.
- [11] Aboudzadeh, N., et al., Fabrication and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 2010. 94(1): p. 137-45.
- [12] He, J., D.C. Genetos, and J.K. Leach, Osteogenesis and trophic factor secretion are influenced by the composition of hydroxyapatite/poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(1): p. 127-37.
- [13] Calandrelli, L., et al., Biocompatibility studies on biodegradable polyester-based composites of human osteoblasts: a preliminary screening. *J Biomed Mater Res*, 2002. 59(4): p. 611-7.
- [14] Bleach, N.C., et al., Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate--polylactide composites. *Biomaterials*, 2002. 23(7): p. 1579-85.
- [15] Flahiff, C.M., et al., Analysis of a biodegradable composite for bone healing. *J Biomed Mater Res*, 1996. 32(3): p. 419-24.
- [16] Zhang du, J., et al., Preparation and characterization of biodegradable poly(D,L-lactide) and surface-modified bioactive glass composites as bone repair materials. *J Mater Sci Mater Med*, 2009. 20(10): p. 1971-8.

## References

- [17] Thomson, R.C., et al., Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials*, 1998. 19(21): p. 1935-43.
- [18] Damadzadeh, B., et al., Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *J Mater Sci Mater Med*, 2010. 21(9): p. 2523-31.
- [19] Ara, M., Watanabe, M., Imai, Y., Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid). *Biomaterials*, 2002. 23(12): p. 2479-83.
- [20] Zheng, X., et al., Effect of in vitro degradation of poly(D,L-lactide)/beta-tricalcium composite on its shape-memory properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008. 86(1): p. 170-80.
- [21] Schiller, C., Epple, M., Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. *Biomaterials*, 2003. 24(12): p. 2037-43.
- [22] Cotton, N.J., M.J. Egan, and J.E. Brunelle, Composites of poly(DL-lactide-co-glycolide) and calcium carbonate: in vitro evaluation for use in orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A*, 2008. 85(1): p. 195-205.
- [23] Gadzinowski, M., Sosnowski, S., Slomkowski, S., Poly(L,L-lactide) and poly(L,L-lactide-co-glycolide) microparticles by dialysis. *e-Polymers*, 2005. 084.
- [24] Wozniak, P., Sosnowski, S., Slomkowski, S., Reinforced polymer for scaffolds for bone tissue regeneration. *Polish J. Appl. Chem.*, 2009. 53(195-2001).
- [25] Gallagher, J.A., R. Gundle, and J.N. Beresford, Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblasts) from human bone. *Methods Mol Med*, 1996. 2: p. 233-62.
- [26] Scudiero, D., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, Anneerney, Siobhan, et al., Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res*, 1988. 48(17): p. 4827-4833.
- [27] Grizzi, I., et al., Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*, 1995. 16(4): p. 305-11.
- [28] Garric, X., et al., Growth of various cell types in the presence of lactic and glycolic acids: the adverse effect of glycolic acid released from PLGA copolymer on keratinocyte proliferation. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2002. 13(11): p. 1189-201.
- [29] Shive, M.S. and J.M. Anderson, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997. 28(1): p. 5-24.
- [30] Quarles, L.D., et al., Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*, 1992. 7(6): p. 683-92.
- [31] Whited, B.M., et al., Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. *Biomaterials*, 2011. 32(9): p. 2294-304.