

OCENA BIOKOMPATYBILNOŚCI KOMPOZYTÓW NA BAZIE CHITOSANU DO STOSOWANIA W INŻYNIERII TKANKOWEJ KOŚCI

AGATA PRZEKORA*, KAROLINA WÓJTOWICZ, GRAŻYNA GINALSKA

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII,
UL. W. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN, POLSKA
*MAILTO: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 27-28*]

Głównym składnikiem części mineralnej kości i zębów jest hydroksyapatyt (HAp). Ceramika wapniowo-fosforanowa w formie granul, jak i porowatego rusztowania jest materiałem powszechnie stosowanym jako substytut tkanki kostnej w ortopedii i stomatologii [1-3]. W celu polepszenia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej hydroksyapatytu można wprowadzać do niego dodatkowy komponent organiczny np. polisacharydowy [4,5]. Właściwości biologiczne chitosanu sprawiają, że jest on idealnym polisacharydowym składnikiem kompozytów na bazie hydroksyapatytu. Chitosan jest szeroko stosowany w inżynierii tkankowej dzięki swoim charakterystycznym właściwościom, takim jak brak toksyczności, szybka biodegradacja, podatność na chemiczną i enzymatyczną modyfikację, stymulacja adhezji i proliferacji komórek oraz osteoinduktywność. W medycynie regeneracyjnej, kompozyty na bazie chitosanu często stosowane są w formie hydrożeli, implantów, czy rusztowań mających zdolność dostarczania leków, czynników wzrostu oraz komórek do miejsca implantacji [6].

Celem niniejszej pracy było określenie biokompatybilności 2 kompozytów na bazie chitosanu: składającego się z krylowego chitosanu i granul HAp (chitosan-HA Biocer) oraz składającego się z krylowego chitosanu i mieszaniny granul HAp /TCP (chitosan-HT Biocer). Krylowy chitosan o dużej masie cząsteczkowej został uzyskany dzięki uprzejmości dr Anny Wojtasz-Pająk z Morskiego Instytutu Rybackiego w Gdyni. Granule HAp (HA Biocer) oraz granule HAp/TCP (HT Biocer) uzyskano dzięki uprzejmości Prezesa firmy Chema Elektromet Spółdzielnia Pracy Rzeszów Jarosława Proniewskiego.

Badania in vitro przeprowadzono z zastosowaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB 1.19) pozyskanej z banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, England, UK). Cytotoksyczność biomateriałów oszacowano metodą pośrednią za pomocą płynnych ekstraktów uzyskanych przez umieszczenie kompozytów w pełnym podłożu hodowlanym w stosunku 0,1 g próbki/ml podłoża na 24 godziny w temperaturze 37°C (ISO 10993-5). Kontrolę negatywną cytotoksyczności stanowiło podłoże hodowlane inkubowane w takich samych warunkach, ale bez biomateriałów. Kontrolę pozytywną cytotoksyczności stanowił 0,1% roztwór fenolu. Żywotność komórek hFOB po 24, 48 i 72-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów określono z użyciem 2 testów – MTT (ocena aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej) i LDH total (ocena liczby komórek przez pomiar aktywności całkowitej puli LDH obecnej w cytoplazmie po lizie komórek). Dodatkowo cytotoksyczność ekstraktów określono za pomocą standardowego testu LDH release, w którym dokonuje się pomiaru aktywności LDH uwolnionej do podłoża hodowlanego przez komórki z uszkodzonymi błonami plazmatycznymi. Oceny

THE BIOCOMPATIBILITY ASSESSMENT OF CHITOSAN- BASED COMPOSITES FOR BONE TISSUE ENGINEERING

AGATA PRZEKORA*, KAROLINA WÓJTOWICZ, GRAŻYNA GINALSKA

MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,
1 W. CHODŹKI STR., 20-093 LUBLIN, POLAND
*MAILTO: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

[*Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 27-28*]

Hydroxyapatite is the main inorganic component of bones and tooth. Calcium phosphate ceramics in the form of granules and porous scaffolds are widely used as bone substitutes in dentistry and orthopedics [1-3]. In order to improve mechanical properties and surgical handiness of hydroxyapatite, an organic component e.g. polysaccharide can be added [4,5]. Biological properties of chitosan make this polysaccharide an ideal component of hydroxyapatite-based composites. Chitosan is extensively applied in tissue engineering because of its characteristic properties such as nontoxicity, rapid biodegradation, prone to chemical and enzymatic modification, simulation of cell adhesion and proliferation and osteoinduction. In regenerative medicine, chitosan-based composites are often applied in the form of hydrogels, implants or scaffolds capable to deliver drug, growth factors and cells into implantation area [6].

The aim of this work was to evaluate the biocompatibility of 2 chitosan-based composites: consisting of krill chitosan and HAp granules (chitosan-HA Biocer) and consisting of krill chitosan and mix of HAp/TCP granules (chitosan-HT Biocer). High molecular weight krill chitosan was kindly obtained from Anna Wojtasz-Pająk from National Marine Fisheries Research Institute in Gdynia. HAp granules (HA Biocer) and HAp/TCP granules (HT Biocer) were obtained by courtesy of President of Chema Elektromet Spółdzielnia Pracy Rzeszów Jarosław Proniewski.

In vitro tests were carried out using normal human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19) obtained from ATCC (American Type Culture Collection, England, UK). Cytotoxicity was estimated indirectly by means of fluid extracts obtained by immersing the composites in fresh growth medium for 24 hours at 37°C (ISO 10993-5). The ratio between the sample weight and the volume of the extraction vehicle was 0,1 g/ml. Culture medium incubated in the same conditions but with no test material served as negative control of cytotoxicity. 0,1% phenol solution served as positive control of cytotoxicity. Viability of hFOB cells after 24, 48 and 72-hour exposure to the extracts was assessed by 2 methods – MTT (assessment of mitochondrial dehydrogenases activity) and LDH total (evaluation of cell number via total cytoplasmic LDH activity measurement after cell lysis). Additionally, cytotoxicity of extracts was estimated by standard LDH release test that allows for membrane damage assessment via measurement of LDH activity released into the medium. LDH total and WST-8 (assessment of mitochondrial dehydrogenases activity) tests were performed to evaluate cell adhesion into tested composites surface. Cell proliferation was evaluated after long term culture directly on biomaterials. After 16 days of culture, cells were stained with Draq5 and Hoechst 33342 fluorescence dye and observed under the confocal microscope. Moreover, biocompatibility was estimated via measurement of bone alkaline phosphate activity (b-ALP) – the marker of II stadium of osteoblast differentiation. To

adhezji komórek do powierzchni testowanych kompozytów dokonano za pomocą testów LDH total oraz WST-8 (ocena aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej). Proliferację komórek określono prowadząc hodowlę osteoblastów bezpośrednio na biomateriałach. Po 16 dniach hodowli, komórki barwiono barwnikiem fluorescencyjnym Draq5 oraz Hoechst 33342 i obserwowano ich wzrost przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Ponadto, biokompatybilność określono poprzez pomiar aktywności frakcji kostnej fosfatazy alkalicznej (b-ALP) – markera II stadium różnicowania osteoblastów. W tym celu hodowlę komórek linii hFOB 1.19 prowadzono bezpośrednio na biomateriałach w podłożu osteogennym przez okres 20 dni. Po 4,8,12,16 i 20 dniach oznaczono aktywność b-ALP poprzez pomiar ilości powstającego p-nitrofenolu (pNP).

Wyniki testów na oznaczanie cytotoksyczności jednoznacznie wykazały, że kompozyty chitosan-HA Biocer oraz chitosan-HT Biocer nie negatywnie wpływają na żywotność komórek linii hFOB 1.19 przez cały czas trwania doświadczenia. Testy LDH total oraz WST-8 wykazały, że powierzchnia kompozytu chitosan-HA Biocer bardziej sprzyja adhezji osteoblastów niż powierzchnia kompozytu chitosan-HT Biocer. Obserwacja w mikroskopie konfokalnym sugeruje, że komórki lepiej proliferują na powierzchni kompozytu chitosan-HA Biocer niż na powierzchni kompozytu chitosan-HT Biocer. Hodowla komórek bezpośrednio na biomateriałach w podłożu osteogennym wykazała, że kompozyty chitosan-HA Biocer oraz chitosan-HT Biocer powodują wzrost aktywności b-ALP w czasie. Osteoblasty rosnące na powierzchni kompozytu chitosan-HA Biocer wykazywały nieznacznie wyższą aktywność b-ALP w porównaniu do komórek kontrolnych rosnących na powierzchni płytki polistyrenowej. Natomiast osteoblasty rosnące na powierzchni kompozytu chitosan-HT Biocer wykazywały obniżoną aktywność b-ALP w porównaniu do kontroli.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć wniosek, że kompozyty chitosan-HA Biocer oraz chitosan-HT Biocer są nietoksyczne, biokompatybilne oraz wykazują właściwości osteoindukcyjne. Jednakże, warto zaznaczyć, że kompozyt chitosan-HA Biocer wykazuje nieznacznie większą biokompatybilność niż kompozyt chitosan-HT Biocer i jest bardziej odpowiedni do stosowania jako rusztowanie dla komórek w inżynierii tkankowej kości.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach DS MNd 2. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w projekcie realizowanym zgodnie z umową nr POPW.01.03.00-06-010/09-00 w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi Priorytetowej I, Nowoczesna Gospodarka, Działanie 1.3. Wspieranie Innowacji.

Piśmiennictwo

- [1] Sopyan Y.I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 2007; 8: 116-123.
- [2] Aronov D., Karlov A., Rosenman G. Hydroxyapatite nanoceramics: Basic physical properties and biointerface modification. *Journal of the European Ceramic Society* 2007; 27: 4181-4186.
- [3] Belcarz A., Ginalska G., Zalewska J., Rzeski W., Ślósarczyk A., Kowalczyk D., Godlewski P., Niedźwiadek J. Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes gentamicin release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009; 89: 102-113.

assess b-ALP activity, hFOB 1.19 cells were cultured directly on the biomaterials in osteogenic medium for 20 days. After 4, 8, 12, 16 and 20 days of culture, b-ALP activity was evaluated by measuring of p-nitrophenol (pNP) production.

The cytotoxicity tests results clearly showed that chitosan-HA Biocer and chitosan-HT Biocer composites do not affect cell viability throughout the full length of the experiment. LDH total and WST-8 tests revealed that chitosan-HA Biocer surface is more favorable to cell adhesion than surface of chitosan-HT Biocer composite. Confocal microscopic observation suggests that better cell proliferation is on the chitosan-HA Biocer surface than on the chitosan-HT Biocer surface. Cell culture experiment directly on the biomaterials in osteogenic medium showed that chitosan-HA Biocer and chitosan-HT Biocer composites provoke increase of b-ALP activity with time. Osteoblasts cultured on the surface of chitosan-HA Biocer composite revealed slightly higher b-ALP activity compared to the control cells cultured on polystyrene plate. Whereas, cells cultured on the surface of chitosan-HT Biocer composite showed decreased b-ALP activity compared to the control.

In summary, basing on the results, it can be concluded that chitosan-HA Biocer and chitosan-HT Biocer composites are nontoxic, biocompatible and have osteoinductive properties. However, it is worth to notice that chitosan-HA Biocer composite shows slightly greater biocompatibility than chitosan-HT Biocer composite and is more appropriate for bone tissue engineering application as cell scaffold.

Acknowledgements

This work was supported by financial support from DS MNd 2. The paper was developed using the equipment purchased within the agreement No. POPW.01.03.00-06-010/09-00 Operational Program Development of Eastern Poland 2007-2013, Priority Axis I, Modern Economy, Operations 1.3. Innovations Promotion.

References

- [4] Belcarz A., Ginalska G., Polkowska I., Przekora A., Ślósarczyk A., Zima A., Paszkiewicz Z. Pilot clinical study of efficacy of flexible HAP-based composite for bone defects replacement. *Engineering of Biomaterials* 2010; 99-101: 16-18.
- [5] Tsiptsias C., Panayiotou C. Preparation of cellulose-nano-hydroxyapatite composite scaffolds from ionic liquid solutions. *Carbohydrate Polymers* 2008; 74: 99-105.
- [6] Muzzarelli A.A.R. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 2009; 76: 167-182.(1997) 239-249.