

WOJCIECH FABIANOWSKI<sup>1)</sup>, BEATA POLAK<sup>1)</sup>, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ<sup>2)</sup>

## Polimery wykorzystywane do rekonstrukcji kości — ocena wybranych podłoży polimerowych w hodowli *in vitro* osteoblastów

POLYMERS FOR BONE RECONSTRUCTION — EVALUATION OF CHOSEN POLIMERIC SUBSTRATES IN OSTEOBLASTS *IN VITRO* CULTURE

**Summary** — In a literature review the theoretical fundamentals and achievements in osseous implants' investigations have been presented. Especially polymeric materials used in implants were discussed as well as the criteria of the proper polymers choice. These criteria cover the structure of a polymer, porosity, mechanical and surface properties and biodegradation process course. Modification of osseous implant surface with proteins has been also discussed. The part concerning the own research contains the results of evaluation of bone cells' (osteoblasts) adhesion to various types of biomaterials, used as porous osseous implants. A new way of evaluation, presented in Scheme A, was used. Contact angle values (CA, Fig. 1) of the surfaces obtained were measured. Also viability of cells after one-week incubation was investigated basing on the measurements of activity of enzymes of succinate dehydrogenase (XTT Test, Fig. 2) or alkaline phosphatase (ALP Test, Fig. 3). 11 series of measurements differing in the substrate type were done. The best results have been obtained for the surfaces with dextran as well as with the systems: dextran + poly(acrylic acid) (PAA), dextran + Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or dextran + PAA + Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. We did not find an unambiguous correlation between biological tests results and hydrophylic or hydrophobic character of polymeric substrate.

**Key words:** osseous implants, method of estimation of biopolymers' usefulness for bone cells deposition, XTT Test, ALP Test, hydrophobic or hydrophylic character of polymeric substrate.

Konieczność rekonstrukcji tkanek uszkodzonych w wyniku urazu, wad wrodzonych lub innych patologii, bądź też usuniętych na drodze resekcji guzów nowotworowych jest wciąż aktualnym zagadnieniem w leczeniu człowieka. Postęp w zakresie zarówno inżynierii materiałowej, jak i nauk biologicznych sprawia, że jako materiały implantacyjne oferowane są coraz to nowe związki. Tworzywa sztuczne stanowią alternatywę dla przeszczepów allogenicznych przygotowywanych w bankach tkanek, a także przeszczepów autogenicznych, tj. implantacji własnej tkanki pacjenta pobranej z innego miejsca. Materiał ten musi być dobrze tolerowany przez tkanki biorcy.

W przypadku rekonstrukcji kości, w opisie kontaktu tkanki biorcy z implantem, mówi się o zjawisku osteoin-

dukcyjności (*osteinduction*), jeśli dochodzi do różnicowania komórek i powstawania preosteoblastów z komórek początkowo niezróżnicowanych. Histologicznym dowodem na osteoindukcyjność danego składnika jest powstanie tkanki kostnej w innej tkance (na przykład podskórnej) po wszczepieniu do niej tego składnika. Wytwarzanie tkanki kostnej na powierzchni implantu w bezpośrednim kontakcie z wszczepem nazywa się natomiast osteokondukcyjnością (*osteoconductivity*). Jeżeli w wyniku osteoindukcyjności i osteokonduktywności powstaje trwałe połączenie tkanki i implantu, wytrzymałe w długim okresie czasu, mówimy o osteointegracji (*osteointegration*) [1]. Ważną rolę w wymienionych procesach pełni warstwa powierzchniowa implantu.

W rekonstrukcji tkanki kostnej wykorzystuje się wiele rodzajów materiałów, m.in. metale, materiały ceramiczne, polimery, a także kompozyty. Ogromne możliwości stwarza użycie polimerów, które są często stosowane w chirurgii rekonstrukcyjnej tkanek i narządów [2—4]. Polimery używane jako wypełnienie ubytków kostnych (zwane dalej w celu uproszczenia implantami

<sup>1)</sup> Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa; e-mail: wofab@ch.pw.edu.pl

<sup>2)</sup> Akademia Medyczna w Warszawie, Wydział Nauki o Zdrowiu, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa.

kostnymi) muszą być dobrze tolerowane przez tkankę biorcy (biogodność). Wymóg ten dotyczy zarówno materiału w stanie wyjściowym, jak i produktów jego degradacji.

Polimery resorbowalne są zwłaszcza korzystne jako zespolenia kostne, które w odróżnieniu od metalowych elementów tego typu nie muszą być usuwane na drodze reoperacji po uzyskaniu prawidłowego zrostu kostnego. Polimery takie mogą być również stosowane w konstrukcji wszczepów metodami inżynierii tkankowej. W tej technice polimer stanowi trójwymiarowe rusztowanie (*scaffold*) żywych, hodowanych *in vitro* komórek pacjenta, których zadaniem po implantacji do tkanek biorcy jest odtwarzanie *in situ* prawidłowej tkanki kostnej.

Idealny polimer, oprócz warunku biogodności, powinien charakteryzować się tu wytrzymałością mechaniczną pozwalającą na zastąpienie mechanicznej funkcji kości, być odporny na sterylizację radiacyjną oraz w stosunkowo łatwy sposób poddawać się kształtowaniu, najlepiej z możliwością ostatecznej modyfikacji kształtu w sali operacyjnej, bezpośrednio przed implantacją, tak aby mógł być dostosowany do indywidualnych potrzeb biorcy. Krytycznym wymogiem w stosunku do polimerów jest biotolerancja ze strony zarówno tkanek po implantacji, jak i komórek hodowanych *in vitro* w bezpośrednim kontakcie z materiałem. Prawidłowe rozplaszczanie się komórek w hodowli, ich proliferacja i ewentualne różnicowanie oraz dojrzewanie, a także zdolność do produkcji macierzy pozakomórkowej *in vitro* zależą głównie od budowy chemicznej oraz topografii warstwy wierzchniej implantu. Stąd wynika potrzeba modyfikacji warstwy powierzchniowej polimerów do wszczepów kostnych. W niniejszym artykule szczególną uwagę poświęciliśmy temu właśnie zagadnieniu; stanowi on krótki przegląd właściwości polimerów stosowanych do śródkostnej implantacji oraz omówienie wyników prac własnych w tym zakresie.

## POLIMEROWE IMPLANTY KOSTNE

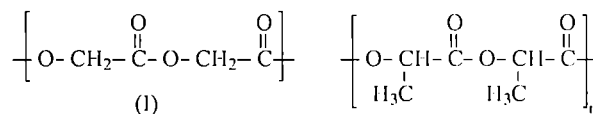
### Typy materiałów polimerowych

Wiele polimerów różniących się ciężarem cząsteczkowym, stopniem polidispersyjności, temperaturą zeszklenia i budową łańcucha głównego, pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, wykorzystuje się jako biomateriały [2—5]. Można je podzielić nie tylko ze względu na ich budowę chemiczną, ale także według rodzaju tkanki, którą mają zastąpić.

W przypadku implantów kostnych stosuje się głównie polimery ulegające stopniowej erozji (począwszy od warstw zewnętrznych), a nie ulegające degradacji chemicznej w całej masie [6], co może spowodować nagłą utratę właściwości mechanicznych. Stopniowa erozja — warstwa po warstwie — umożliwia kształtowanie się właściwej tkanki kostnej etapami.

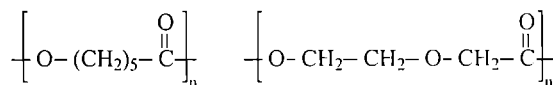
Szczegółowy opis właściwości polimerów na implanty kostne można znaleźć w licznych pracach przeglądowych [3, 4, 7, 8]. W tej pracy przedstawimy podstawową charakterystykę, zwłaszcza tych materiałów, które zostały dopuszczone do stosowania przez FDA (*Food and Drug Administration*) lub o wyjątkowych cechach. Podstawowe właściwości i nazwy handlowe produktów dopuszczonych do stosowania w ramach procedury 510(k) (produkt jest podobny do wyrobu znajdującego się na rynku i jego dopuszczenie może nie wymagać badań klinicznych) oraz procedury PMA (*Premarket Approval*), która wymaga badań klinicznych, znajdują się w publikacjach [3, 5, 7, 8].

Podstawową grupę polimerów stosowanych na implanty kostne stanowią alifatyczne poliestry, mianowicie poliglikolid [PGA — wzór (I)], poli(D-laktyd) (PDLA) i poli(L-laktyd) [PLLA — wzór (II)], poli-ε-kaprolakton [PCL — wzór (III)], polidioksanon [PDS — wzór (IV)],



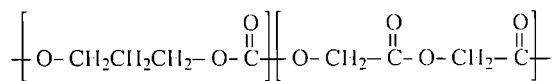
(I)

(II)



(III)

(IV)



(V)

kopolimery poli-D,L-laktyd (DLPLA), poli(D,L-laktyd-co-poli-L-laktyd) (LDLPLA), kopolimer poliglikolid/węglan trimetylenowy (PGA/TMC), kopolimer L-laktyd/glikolid [LPLG — wzór (V)] lub poli(kwas β-hydroksybutanowy) (PHB).

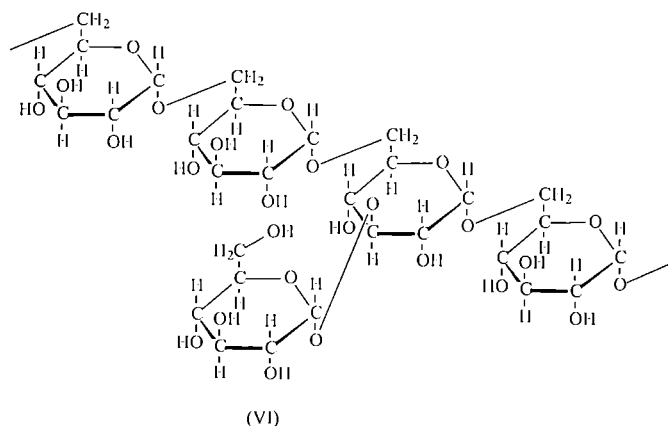
Homopolimeryczny PGA otrzymywany z glikolidu (cyklicznego diestru kwasu hydroksooctowego) wykazuje stosunkowo dużą zawartość fazy krystalicznej (ok. 50 % mas.) oraz wysoką temperaturę zeszklenia i topnienia, co powoduje powstawanie sztywnych wyrobów ulegających biodegradacji w ciągu kilku miesięcy. Kopolimery glikolidu charakteryzują się szybszą biodegradacją, mniejszą zawartością fazy krystalicznej i niższymi wartościami temperatury przemian niż PGA.

Wśród optycznie czynnych postaci D i L oraz postaci racemicznej D,L laktydu (cyklicznego diestru kwasu mlekowego) największe znaczenie do zastosowań na implanty ma izomer L. PLLA charakteryzują się małą zawartością fazy krystalicznej (ok. 37 %), stosunkowo wysoką temperaturą zeszklenia (65 °C) i długim czasem degradacji wynoszącym nawet 5—6 lat [8, 9]. Dzięki tej ostatniej właściwości PLLA, kopolimery L-laktydu nie powodują lokalnego znacznego zmniejszenia wartości

pH w miejscu stosowania implantu (prowadzącego do kwasicy i obumierania komórek) oraz pojawienia się efektu autokatalitycznego przyspieszającego reakcję biodegradacji. Obok kopolimerów L-laktydu, duże znaczenie praktyczne mają kopolimery zawierające mery TMC [7, 8].

Osobną grupę kostnych implantów polimerowych stanowią polimery pochodzenia naturalnego (np. kolagen), często stosowane w postaci kompozytów z napełniaczem mineralnym [10]. Sieciowanie za pomocą aldehydu glutarowego pozwala na regulowanie właściwości mechanicznych i szybkości resorpcji, a jednocześnie nie powoduje toksyczności. Otrzymane implanty mają dobre właściwości osteokondukcyjne.

Wśród naturalnych polimerów na implanty kostne należy wyróżnić hydrożele dekstranowe [11—13]. Naturalny dekstran otrzymywany w wyniku fermentacji sacharozy w obecności bakterii *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Acetobacter* lub innych [14] jest zbudowany z łańcucha głównego poli- $\alpha$ -D-(1,6) glukozy i krótkich odgałęzień  $\alpha$ -D-(1,3) glukozy [wzór (VI)]. Duży ciężar cząsteczkowy dekstranu wynoszący 10—30 milionów [15], dobra



rozpuszczalność w wodzie, nietoksyczność i biogodność, obecność wielu grup hydroksylowych umożliwiającą liczne modyfikacje chemiczne i fizycznych (np. żelowanie za pomocą tworzenia stereokompleksów ze związanymi łańcuchów PLLA i PDLA [12]), oraz możliwość regulowania szybkości biodegradacji i dokładna znajomość enzymów hydrolizujących dekstran [16] sprawiają, że modyfikowany dekstran staje się bardzo obiecującym materiałem do stosowania na implanty kostne.

### Wpływ rodzaju polimeru na biodegradację implantów

Zaletą implantów z alifatycznych poliestrów jest fakt, że produkty hydrolizy włączają się zwykle w naturalne cykle metabolizmu kwasów trójkarboksylowych i są usuwane z organizmu [8]. Kłopoty wywołane zmniejszeniem wartości pH można ograniczyć dodatkiem soli alkalicznych (np. magnezu). Wpływ na wynik rekon-

strukcji wywierają również sposób i warunki przeprowadzenia zabiegu chirurgicznego. Według obserwacji Böstmana [9] ten sam rodzaj implantu PLLA wywoływał komplikacje odpowiednio u 0,2 % i 47 % pacjentów w zależności od miejsca wykonania zabiegu.

Stosowanie kopolimerów, np. PLLA/PCL umożliwia lepsze dostosowanie właściwości implantów i szybkości ich biodegradacji niż w przypadku użycia homopolimerów. Amorficzny PCL, migrując do warstwy wierzchniej kopolimeru, szybciej ulega biodegradacji niż krystaliczny PLLA pozostający wewnątrz implantu [17].

Interesującą alternatywą dla poliestrów alifatycznych są polidiodoksanon (PDS), poliaminokwasy i pseudopoliaminokwasy (poliaminokwasy, w których wiązania peptydowe zostały zastąpione wiązaniami estrowymi lub uretanowymi bądź też węglanowymi), polibezwodniki, poliortoestry oraz poliuretany, a zwłaszcza poliuretany na podstawie oligowęglanodioli [7, 18—20]. PDS znalazł wiele zastosowań w medycynie ze względu na degradację *in vivo* do nietoksycznych monomerów [7].

Szereg potencjalnych zastosowań jako biomateriały mają także poliaminokwasy. Obecność grup funkcyjnych w łańcuchu bocznym umożliwia bowiem wprowadzanie krótkich odcinków peptydów, leków, środków sieciujących lub grup modyfikujących właściwości fizyczne i mechaniczne polimerów. Poliaminokwasy, często wykorzystywane jako biomateriały, ulegają biodegradacji na drodze hydrolizy enzymatycznej wiązania amidowego. Podczas degradacji tych związków uwalniają się nietoksyczne, naturalnie występujące w organizmie aminokwasy. Utrudnia to odtwarzanie i kontrolowanie procesu degradacji *in vivo* ze względu na różny poziom aktywności enzymatycznej — inny u każdej osoby. Pewne ograniczenie stanowi też fakt, że polimery zawierające trzy lub więcej aminokwasów są rozpoznawane jako antygeny. Rozwiązanie tego problemu polega na zastosowaniu pseudopoliaminokwasów [7, 18—20], bowiem obecność w łańcuchu polimeru wiązań amidowych, węglanowych bądź estrowych pozwala na szeroki zakres regulowania szybkości biodegradacji; jednocześnie, w przypadku wiązań węglanowych, produkty hydrolizy zawierają tylko grupy hydroksylowe, co nie powoduje lokalnego zmniejszenia wartości pH.

Liczne zastosowania, m.in. w systemie kontrolowanego dostarczania leków, znajdują polibezwodniki i poliortoestry. Ich degradacja następuje w wyniku erozji powierzchniowej. W przypadku polibezwodników, w zależności od stopnia hydrofobowości danego monomeru, można sterować czasem degradacji (od kilku dni do roku).

### Porowatość

Polimerowe implanty kostne powinny mieć pory otwarte, połączone w trójwymiarową sieć ułatwiającą zasiedlenie komórkami osteogenicznymi, a następnie stanowiącą podłoże macierzy pozakomórkowej. Średnie

wymiary porów powinny wynosić  $>100\ \mu\text{m}$ , korzystnie  $150\text{—}300\ \mu\text{m}$ , a nawet  $500\text{—}700\ \mu\text{m}$  [2]. Zwykle porowatą strukturę implantu uzyskuje się w wyniku wyekstrahowania soli o odpowiedniej granulacji, ale stosuje się również porofory typu kwasów karboksylowych, a także spienienie gazem, w fazie stopionej lub mikrofalowe [21]. Porowata struktura implantu przed umiejscowieniem w tkance kostnej może być wstępnie modyfikowana dodatkiem żywych komórek. W przypadku hydrożeli żywe komórki mogą znajdować się w rozproszonej fazie wodnej, a fotosieciowanie hydrożelu przeprowadza się tak, aby nie uszkodzić żywych komórek [11].

### Właściwości mechaniczne

Implanty metalowe oraz implanty z UHMWPE (*Ultra High Molecular Weight Polyethylene*) charakteryzują się właściwościami mechanicznymi (moduł Younga, wytrzymałość na ściskanie) przewyższającymi właściwości tkanki kostnej. Tkanka kostna wokół takiego („mechanicznie mocnego”) implantu przestaje pracować, ulega rozluźnieniu i osłabieniu, co może prowadzić do poważnych komplikacji. W przypadku polimerowych implantów kostnych skład i stopień usieciowania jest tak dobierany, aby ich właściwości mechaniczne były jak najbardziej zbliżone do właściwości naturalnej tkanki kostnej [10, 21—23]. W roli czynnika wzmacniającego implanty stosuje się napełniacz, np. hydroksyapatyt, lub  $\beta$ -trójfosforan wapniowy w ilości do 30 % mas. Listę napełniaczy stosowanych do uzupełnienia ubytków kostnych zaaprobowanych przez FDA zawiera [5].

Właściwości mechaniczne polimeru determinują sposób otrzymywania kształtek na implanty kostne. Najczęściej wykorzystuje się do tego metodę wtryskiwania, zapewniającą uzyskiwanie powtarzalnych elementów o ściśle zadanych wymiarach i właściwościach mechanicznych [22, 23]. Niemniej istnieje potrzeba formowania wypełnienia *in situ* zgodnie z indywidualnymi potrzebami pacjenta.

### Właściwości powierzchniowe

Kluczową rolę w adhezji oraz we wzroście i różnicowaniu się osteoblastów odgrywa stan powierzchni implantu kostnego. Stan ten można rozpatrywać z punktu widzenia topografii, czyli szorstkości powierzchni, obecności rowków/brzeżków i wysepek, bądź też ze względu na budowę chemiczną powierzchni, czyli obecności wyspecjalizowanych białek o odpowiedniej sekwencji aminokwasów, czynników wzrostu oraz odpowiednim stosunku grup OH do innych grup o charakterze hydrofilowym i/lub hydrofobowym.

Zdaniem niektórych badaczy [3, 24] do prawidłowego rozwoju komórek kostnych konieczna jest mechaniczna stymulacja polegająca na odpowiednio mocnym związaniu komórek osteoblastów z podłożem implantu. Związanie to, w głównej mierze, odbywa się za pomocą

odpowiednich białek adhezyjnych (kadheryny, integryny), ale wcześniej musi dojść do mechanicznego związania komórek osteoblastów z podłożem. Z reguły szorstka powierzchnia z rowkami głębokości do  $0,8\ \mu\text{m}$  polepsza adhezję komórek.

Interesujące wyniki badania szorstkości powierzchni polistyren/poli(4-bromostyren) przedstawiono w pracy [25]. Problem ten rozpatrywano w skali nanometrycznej, otrzymano bowiem „wyspy” odmiennej wysokości rzędu nanometrów. W zakresie wysokości „wysp”  $13\text{—}95\ \text{nm}$  stwierdzono zróżnicowaną adhezję fibroblastów do podłoża oraz zmianę ilości białek cytoszkieletu. Najlepsze warunki wzrostu fibroblastów zaobserwowano wówczas, gdy wysokość „wysp” wynosi  $27\ \text{nm}$ .

### Modyfikacja powierzchni polimerowych implantów kostnych — substancje bioaktywne

Powierzchnię implantów kostnych modyfikuje się za pomocą czynników mających za zadanie polepszenie adhezji komórek do powierzchni. Zalicza się do nich m.in. krótkie sekwencje aminokwasowe (RGD, RGDS, KRSR), transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$ , morfogenetyczne białka kości (BMP2, BMP7) [3, 5, 26, 27]. Te ostatnie uczestniczą w różnicowaniu komórek prekursorowych w kierunku osteoblastów. Dzięki zastosowaniu techniki druku pieczętkowego ( *$\mu$ -contact printing*) możliwe jest selektywne nanoszenie na powierzchnię implantu sekwencji aminokwasowych w postaci kół średnicy  $10\text{—}200\ \mu\text{m}$  [27]. Metoda ta umożliwia dostosowanie adhezji konkretnego rodzaju komórek na wybranym obszarze powierzchni implantu, np. fibroblastów i osteoblastów (sekwencja RGDS) lub tylko osteoblastów (sekwencja KRSR), bądź też zabezpieczanie fragmentów powierzchni przed adhezją (powierzchnia z przeciwpriyczepnym oktaedecylotrichorosilanem).

Powierzchnie biomateriałów modyfikuje się również za pomocą glikoprotein, takich jak fibronektyna, kolagen, heparyna lub agrekan. Są to substancje zawierające miejsca zdolne do wiązania składników występujących w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM).

Odrębnym zagadnieniem jest zapewnienie na powierzchni implantów (np. tytanowych [28, 29], polihydroksymasłowych [30], krzemionkowych [31]) występowania odpowiedniej zawartości grup hydroksylowych i równowagi grup hydrofilowych do hydrofobowych, a także szorstkości. Nie jest wykluczona rola innych jeszcze czynników wpływających na rozwój komórek w kontakcie z podłożem [32]. Obecnie prowadzone są także badania nad kowalencyjną immobilizacją antybiotyków na powierzchniach implantów w celu długoterminowej ochrony antybakteryjnej wszczepu [33].

### PRACE WŁASNE

Jak już wspomnieliśmy, polimerowy implant kostny stosowany do wypełniania ubytków kostnych powinien

spełniać szereg wymagań biologicznych i fizykochemicznych. Trudno jest przypuszczać, aby te wszystkie wymagania spełniał jeden materiał, ale można sądzić, że sprostą im wielowarstwowy układ z różnych rodzajów materiałów. Jednym z podstawowych warunków jakie ma spełniać implant kostny jest odpowiednia budowa i skład warstwy wierzchniej, bezpośrednio kontaktującej się z żywymi komórkami.

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności różnych rodzajów biomateriałów stosowanych jako podłoża do wzrostu i różnicowania się komórek kostnych.

## Materiały

Podłoża wykonywano z następujących substancji:

— hydrofobowych — okta-decylo-trichlorosilanu (Aldrich), poli(dimetylosiloksanu) (Petrarch Systems), trimetoksywinylosilanu (Petrarch Systems);

— hydrofilowych — poli(kwasu akrylowego) (PAA, Fluka AG), poli(tlenków etylenu) o ciężarze cząsteczkowym 1000, 20 000 i 5 000 000 (Loba Chemie, BDH Chemicals Ltd., Ferark Berlin), izotaktycznego poli(tlenku propylenu) ( $M = 700$ ) i poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) o ciężarze cząsteczkowym 1700 i 1100 (synteza dr hab. J. Lewiński, Wydział Chemiczny, PW), poli(metakrylanu-2-hydroksyetylenowego) (Aldrich) oraz poli( $N$ -izopropylakrylamidu) (Aldrich), poliuretanów (współpraca Wydziału Chemicznego PW i Instytutu Chemii Przemysłowej w Warszawie);

— dekstranu (Pharmacia Fine Chemicals AB) i jego mieszanin z PAA,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , a także z lekami.

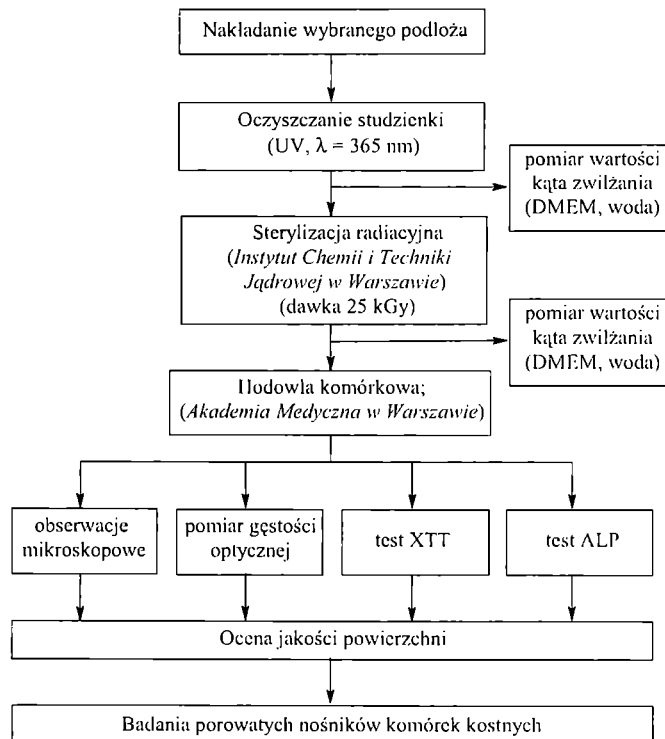
Na powierzchnie nakładano także proteiny — fibronektynę (Biochrom KG, Sigma), albuminę bydlęcą (Sigma), albuminę ludzką (Biomed, Warszawa) i kolagen (Henkel) oraz fosfolipidy — lecytynę (Bauer), 1-palmitoilolizolecytynę (Koch-Light Lab.).

Wykonano również powierzchnie z przemienne ułożonych multiwarstw hybrydowych zbudowanych z układów z PAA/bentonit (Vanderbilt), PAA/bemit (Condea Vista Company) i PAA/hydroksyapatyt (Instytut Szkła i Ceramiki w Warszawie).

Stosowano następujące rozpuszczalniki: DI woda, heksan, metanol, chlorek metylenu (Przedsiębiorstwo Odczynników Chemicznych, Lublin).

## Aparatura

Badania wykonano przy użyciu standardowych 96-studzienkowych naczyń z polistyrenu do hodowli komórkowych TCPS (*Tissue Culture PS*) firmy Dow-Corning. Polistyren, z którego wykonano naczynia, był odpowiednio przygotowany przez producenta w celu polepszenia procesu adhezji komórek; materiał ten stanowił odnośnik w badaniach. Ogólny sposób postępowania przedstawia schemat A. Jest on zgodny z analogicznymi metodami stosowanymi obecnie w tego typu badaniach [34—37].



Schemat A. Blokowy schemat prowadzenia badań odpowiedzi komórkowej na różne podłoża

Scheme A. Block scheme of carrying out of the studies on cell answer on various supports

## Sposób wykonywania podłoży

Płytkę TCPS składa się z 8 rzędów i 12 kolumn studzienek. Do każdej z nich wprowadzano po 50  $\mu\text{l}$  roztworu. Kolumn zewnętrznych nie uwzględniano w dalszych badaniach, a naniesienie każdego rodzaju podłoża w jednej kolumnie powtarzano sześciokrotnie. Na każdej płytce TCPS na kolumnę nr 2 nie nanoszono podłoża i służyła ona jako kolumna odniesienia. Kolumnę nr 3, również bez podłoża, naświetlano promieniowaniem UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ), podobnie jak wszystkie dalsze kolejne kolumny; była to kolumna kontrolna. Kolejną kolumnę poddawano działaniu samego rozpuszczalnika w celu sprawdzenia jego wpływu na komórki kostne. W następnych studzienkach odparowywano roztwory badanych substancji tworzących podłoża (temperatura pokojowa, czas 24 h).

Wykonano 11 serii pomiarowych w następujący sposób podzielonych ze względu na rodzaj podłoża:

— I — związki o charakterze hydrofobowym (tu polisiloksany),

— II — polimery biokompatybilne wylewane z roztworów w chlorku metylenu [poli(tlenki etylenu), poli( $\epsilon$ -kaprolaktony), poli(tlenek propylenu), poli(metakrylan-2-hydroksyetylenowy, poli( $N$ -izopropylakrylamid)],

— III — multiwarstwy polielektrolitowe z użyciem czynnika sprzęgającego: 3-aminopropylotrietoksyilan ( $\gamma$ -APS),

- IV — polimery naturalne,
- V—VII — poliuretany,
- VIII — multiwarstwy polielektrolitowe (bez czynnika sprzęgającego),
- IX — polimery biokompatybilne (por. seria II), wylewane z roztworów w metanolu,
- X — dekstran oraz jego układy z PAA i  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,
- XI — proteiny.

Substancją toksyczną w odniesieniu do komórek okazał się środek sprzęgający warstwy polielektrolitowe, czyli  $\gamma$ -APS; dlatego oprócz serii III zbadaliśmy serię nr VIII.

### Hodowla komórkowa

Na zmodyfikowanych podłożach TCPS zakładano hodowlę komórek ludzkich wyizolowanych z tkanki kostnej. Hodowlę prowadzono w inkubatorze o stałej temp. 37 °C w warunkach wilgotności wynoszącej 96 % i obecności 5 %  $\text{CO}_2$  w ciągu 1 tygodnia. Jako pożywkę hodowlaną wykorzystywano roztwór DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) zawierający dodatkowo 10 % płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 2 mM L-glutaminy oraz 1 % antybiotyku.

W tym celu na płaskie powierzchnie PS wylewano odpowiednie ilości tych samych roztworów badanych substancji (po to, aby uzyskać identyczne stężenie powierzchniowe) i odparowywano je w uprzednio podanych warunkach.

### Metody badań

Metodą goniometryczną wyznaczano wartości kątów zwilżania (CA) podłoży utworzonych na płytkach PS. Pomiarów dokonano zarówno przed, jak i po procesie sterylizacji radiacyjnej. Ciecz zwilżającą stanowiła woda lub roztwór DMEM.

Morfologię komórek obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego „Nikon TS 100”. W celu oszacowania średniej wielkości populacji komórkowych utworzonych na naniesionych podłożach, komórki wybarwiano fioletem krystalicznym, a następnie wyznaczano gęstość optyczną za pomocą spektrofotometru „Multiscan RC” (długość fali  $\lambda = 540$  nm).

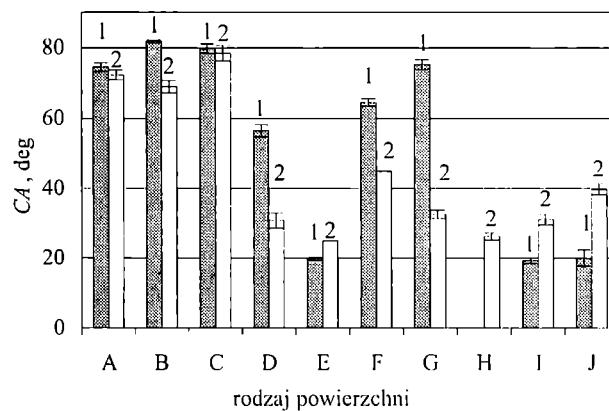
Test XTT jest przyżyciowym testem aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (enzym występujący w mitochondriach żywych komórek). Związek XTT [sól wewnętrzna 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolo-5-karboksyamidu] jest substratem w reakcji zachodzącej pod wpływem dehydrogenazy bursztynianowej, w wyniku której powstają barwne, rozpuszczalne w wodzie formazany [36]. Wyniki testu zostały odczytane w czytniku płytek stosowanym w testach ELISA (długość fali  $\lambda = 450$  nm, „Sigma X 425”).

Test ALP, czyli pomiar aktywności fosfatazy alkalicznej (enzymu wytwarzanego przez komórki kostne) prowadzono za pomocą zestawu „Sigma” nr 245—500. Fos-

fataza alkaliczna katalizuje hydrolizę fosforanu *p*-nitrofenyłu, w wyniku której powstaje *p*-nitrofenol. Jest to barwny produkt oznaczany spektrofotometrycznie (długość fali  $\lambda = 450$  nm).

### Dyskusja wyników

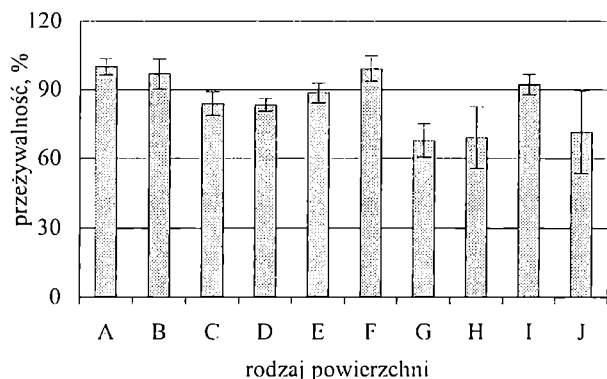
Najlepsze wyniki uzyskaliśmy w przypadku powierzchni z dekstranem i jego układami (seria X), zatem wyniki badań tych właśnie powierzchni omówimy w niniejszym punkcie. Powierzchnie dekstranu, zwłaszcza dekstranu z dodatkiem PAA, mają charakter silnie hydrofilowy (wartość CA < 45° — rys. 1). Stwierdzono, że po



Rys. 1. Wartości kątów zwilżania (CA) za pomocą DMEM w przypadku serii X przed (1) i po (2) procesie sterylizacji radiacyjnej (dawka 25 kGy); rodzaj powierzchni: A — TCPS nieoczyszczany promieniowaniem UV, B — TCPS oczyszczany UV, C — woda, D — dekstran, E — dekstran + PAA, F — dekstran + 0,003 % mol  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , G — dekstran + 0,03 % mol  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , H — dekstran + 0,01 % mol  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , I — dekstran + PAA + 0,003 % mol  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , J — dekstran + PAA + 0,03 % mol  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; I — odchylenie standardowe

procesie sterylizacji radiacyjnej (słupki nr 2) wartości CA rosną, ale powierzchnie w dalszym ciągu zachowują silnie hydrofilowy charakter (wartości CA nie przekraczają 40°). Podobne wartości kąta zwilżania uzyskuje się w przypadku wody.

Wartości testu XTT w przedziale od ok. 70 % do 100 % w odniesieniu do próbki kontrolnej (powierzchnia A, rys. 2) serii X świadczą o dużej przeżywalności hodowanych na tej powierzchni komórek. Największe

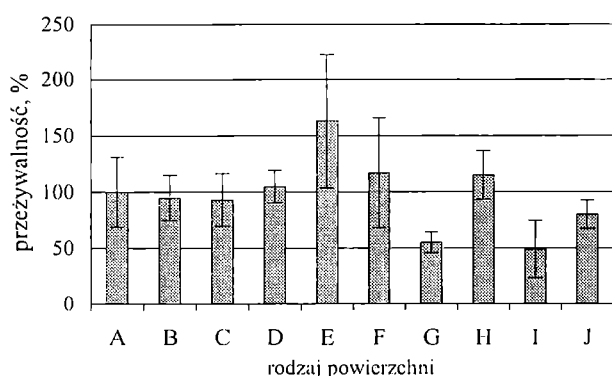


Rys. 2. Wyniki testu XTT serii X; oznaczenia symboli jak na rys. 1 (przeżywalność podano w % w odniesieniu do próbki kontrolnej = 100 %)

Fig. 2. XTT Test results of series X. Symbols denotations as in Fig. 1 (viability is given in % in relation to control sample = 100 %)

wartości przeżywalności w ramach tej serii uzyskano w odniesieniu do powierzchni dekstran + 0,003 % mol.  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (powierzchnia F) oraz dekstran + PAA + 0,003 % mol.  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (powierzchnia I). W przypadku powierzchni z samego dekstranu (powierzchnia D) test XTT osiągnął wartość 83,4 %.

Także testy ALP (rys. 3) potwierdzają dobre właściwości podłoża z dekstranem. Najlepsze wyniki (wyraźnie lepsze niż próbki kontrolnej A) uzyskuje się w przypadku powierzchni dekstran + PAA (powierzchnia E) oraz dekstran +  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  zarówno gdy użyliśmy 0,003 % mol., jak i 0,01 % mol. soli (odpowiednio powierzchnie F i H).



Rys. 3. Wyniki testu ALP serii X; oznaczenia symboli jak na rys. 1 (przeżywalność podano w % w odniesieniu do próbki kontrolnej = 100 %)

Fig. 3. ALP Test results of series X. Symbols denotations as in Fig. 1 (viability is given in % in relation to control sample = 100 %)

Przedstawione wyniki obydwu testów — XTT i ALP — prowadzą więc do wniosku, że przeżywalność komórek kostnych na powierzchniach dekstran +  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

oraz dekstran + PAA jest co najmniej taka sama lub większa niż w przypadku standardowej powierzchni TCPS.

Inne badane rodzaje powierzchni (pozostałe serie) nie dawały tak dobrych wyników jak dekstran. Najgorsze wyniki testów XTT i ALP uzyskaliśmy w odniesieniu do powierzchni hydrofobizowanych polisiloksanami (seria I) oraz gdy jako rozpuszczalnik stosowano chlorek metylenu (seria II), który działał toksycznie na komórki. Ponadto stwierdziliśmy, że podłoża polisiloksanowe mogą zostać wykorzystane podczas kontrolowanego zabezpieczania fragmentów powierzchni przed osadzaniem komórek. Rezultaty badań powierzchni modyfikowanych polimerami biokompatybilnymi (seria IX) były zbliżone do wyników oceny kontrolnej hodowli komórkowej.

Podjęliśmy również próbę znalezienia korelacji pomiędzy wartością CA oraz wynikami hodowli komórkowej (test XTT i ALP). Stwierdziliśmy, że komórki nie przylegały zarówno do podłoża o właściwościach silnie hydrofobowych ( $\text{CA} > 80^\circ$ ), jak i do podłoża o charakterze silnie hydrofilowym ( $\text{CA} < 15^\circ$ ). Prawidłowości tej nie obserwowaliśmy jednak w odniesieniu do wszystkich badanych rodzajów podłoża. Wyjątek stanowiła mianowicie hydrofilowa powierzchnia PAA/bentonit, do której komórki przylegały [39] i gdzie wzrost liczby multiwarstw polielektrofilowych zmieniał charakter powierzchni na hydrofilowy; jednocześnie znacznie malały wartości testów XTT i ALP. Z kolei powierzchnie modyfikowane za pomocą kolagenu wykazują również charakter silnie hydrofilowy ( $\text{CA} < 15^\circ$ ), a wyniki testów XTT i ALP takich powierzchni są bardzo dobre — na poziomie kontrolnej hodowli komórkowej. Zatem pozwala to na stwierdzenie, iż hydrofilowy bądź hydrofobowy charakter powierzchni nie jest ani jedynym, ani dostatecznym kryterium oceny odpowiedniego przylegania komórek do podłoża.

## WNIOSKI

Zaproponowana metoda pozwoliła na ocenę jakości powierzchni pod względem jej zdolności do adhezji komórek kostnych. Umożliwiło to wytypowanie podłoża do dalszych badań nośników komórek kostnych. Na obecnym etapie badań wydaje się, że najbardziej obiecujące są hydrofilowe cienkie warstwy otrzymane z dekstranu z dodatkiem PAA i soli wapniowej.

Serdecznie dziękujemy Pani Agnieszce Jurkowskiej za pomoc w hodowli komórek i pomiarach mikroskopowych.

Niniejsza praca została zrealizowana w ramach grantu KBN 4 T08E01824.

## LITERATURA

1. Albrektsson T., Johansson C.: *Eur. Spine J.* 2001, 10, 96.

2. Slomkowski S.: „Polimery biomedyczne” w „Chemia polimerów”, t. III (red. Florjańczyk Z., Penczek S.), Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1998, str. 159—178, 189.
3. Seal B. L., Otero T. C., Panitch A.: *Mater. Sci. & Engin.* 2001, **34**, 147.
4. Griffith L. G.: *Acta Mater.* 2000, **48**, 263.
5. Burg K., Poter S., Kellam J.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2347.
6. Göpferich A.: *Biomaterials* 1996, **17**, 103.
7. Middleton J. C., Tipton A. J.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2335.
8. An Y., Woolf S., Friedman R.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2635.
9. Böstman O., Pihlajamäki H.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2615.
10. Kikuchi M., Matsumoto H., Yamada T., Koyama Y., Takakuda K., Tanaka J.: *Biomaterials* 2004, **25**, 63.
11. Nguyen K. T., West J.: *Biomaterials* 2002, **23**, 4307.
12. De Jong S., Van Nostrum C., Kroon-Batenburg L., Kettenes-van den Bosch J., Hennink W.: *J. Appl. Polym. Sci.* 2002, **86**, 289.
13. Ferdous A., Watanabe H., Akaike T., Maruyama A.: *Nucleic Acid Res.* 1998, **26**, 3949.
14. Ul-Qader S., Iqbal L., Rizvi H., Zuberi R.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2001, **34**, 93.
15. Amersham Biosciences, Native dextran, Internet data file Dextran, 18-1153-43 AA, 2001-11.pl
16. Aoki H., Sakano Y.: *Biochem. J.* 1997, **323**, 859.
17. De Groot J., Zijlstra F., Kuipers H., Pennings A., Klompmaker J., Veth R., Jansen H.: *Biomaterials* 1997, **18**, 613.
18. Resiak I., Rokicki G.: *Polimery* 2000, **45**, 592.
19. Tangasuthadol V., Penharkar S., Kohn J.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2371.
20. Tangasuthadol V., Penharkar S., Peterson R., Kohn J.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2379.
21. Gomes M., Ribeiro A., Malafaya P., Reis R., Cunha A.: *Biomaterials* 2001, **22**, 883.
22. Ogando J.: *Global Design News* 2002, Feb., 42.
23. He S., Yaszamski M., Yasko A., Engel P., Mikos A.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2389.
24. Anselme K.: *Biomaterials* 2000, **21**, 667.
25. Dalby M., Giannaras D., Riehle M., Gedegaard N., Affrossman S., Curtis A.: *Biomaterials* 2004, **25**, 77.
26. LeBaron R., Athanasiou K.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2575.
27. Hasenbein M., Andersen T., Bizios R.: *Biomaterials* 2002, **23**, 3937.
28. Rice J., Hunt J., Gallagher J., Hanarp P., Sutherland D., Gold J.: *Biomaterials* 2003, **24**, 4799.
29. Tamnasco de Olibeira P., Nanci A.: *Biomaterials* 2004, **25**, 403.
30. Yang X., Zhao K., Chen G.: *Biomaterials* 2002, **23**, 1391.
31. Gomez-Vega J., Iyoshi M., Kim K., Hozumi A., Sugimura H., Takai O.: *Thin Solid Films* 2001, **398—399**, 615.
32. Olkowski R.: dane nieopublikowane, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Akademia Medyczna w Warszawie.
33. Glinalska G., Uryniak A., Osińska M., Urbanik-Sypniewska T., Kowalczyk D.: *Biocyber. Inż. Biomed.* 2003, **1**, 145.
34. Hilmann, Steinkamp-Zucht A., Geurtsen W., Gross G., Hoffmann A.: *Biomaterials* 2002, **23**, 1461.
35. Schaefer, Martin I., Shastri P., Padera R., Langer R., Freed L., Vunjak-Novakovic G.: *Biomaterials* 2000, **21**, 2599.
36. Morgan J.: *Inter. Biochem. Lab.* 2003, June, 12.
37. Castner D., Ratner B.: *Surf. Sci.* 2002, **500**, 28.
38. Internet: <http://members.pgonline.com/~bryand/StainsFile/dyes/class/clstetra.htm>
39. Fabianowski W., Polak B., Lewandowska-Szumiel M.: *Pol. Chem. Soc. Annal.* 2003, **1**, 199.