

Ocena właściwości użytkowych rusztowań komórkowych o strukturze gąbczastej oraz wzrostu na nich fibroblastów

Aleksandra Kruk¹⁾, Agnieszka Gadomska-Gajadur^{1), *)}, Judyta Dulnik²⁾, Izabela Rykaczewska¹⁾, Paweł Ruśkowski¹⁾, Agnieszka Sebai¹⁾, Ludwik Synoradzki¹⁾

DOI: [dx.doi.org/10.14314/polimery.2018.4.3](https://doi.org/10.14314/polimery.2018.4.3)

Streszczenie: Zbadano wpływ dodatku ciekłych prekursorów porów na morfologię, porowatość i właściwości mechaniczne polilaktydowych rusztowań komórkowych. Rusztowania otrzymano metodą mokrej inwersji faz w wariancie *freeze extraction*. Oceniono cytotoksyczność wybranych rusztowań w stosunku do fibroblastów mysich oraz ich przydatność do hodowli komórkowych. Wykazano, że dodatek prekursora porów do polilaktydu korzystnie zmienia morfologię wytworzonych rusztowań, jednocześnie pogarszając ich wytrzymałość mechaniczną. Stwierdzono, że polilaktydowe rusztowania komórkowe z powodzeniem mogą być wykorzystywane do hodowli komórkowych.

Słowa kluczowe: rusztowania komórkowe, polilaktyd, hodowle komórkowe, fibroblasty.

Evaluation of functional properties and fibroblast growth on squashy cellular scaffolds

Abstract: The effect of liquid pore precursor addition on the morphology, porosity and mechanical properties of polylactide scaffolds was investigated. The scaffolds were obtained by inversion phase method in freeze extraction mode. Selected scaffolds were subjected to a cytotoxicity test using mouse fibroblast cells. It has been shown that the addition of pore precursors favorably changes the morphology of scaffolds at the cost of decreased mechanical strength. It has been found that polylactide cellular scaffolds can be successfully used for cell culture.

Keywords: cellular scaffolds, polylactide, cell culture, fibroblasts.

Tkanka jest podstawowym elementem budulcowym wszystkich organizmów, złożonym z komórek oraz macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). Ta z kolei składa się z form upostaciowionej i bezpostaciowej oraz płynu tkankowego. Forma upostaciowiona jest zbudowana z włókien białkowych (m.in. kolagenu i elastyny), forma bezpostaciowa to mieszanina substancji białkowych i cukrowych, natomiast płyn tkankowy składa się z wody oraz związków małowcząsteczkowych. Dzięki charakterystycznej budowie ECM pełni wiele bardzo ważnych funkcji. Przede wszystkim stanowi miejsce przyczepu komórek oraz zapewnia wytrzymałość mechaniczną tkanki, dlatego często jest nazywana szkieletem tkankowym [1–3]. W tkankach, które uległy uszkodzeniu, zaburzona struktura macierzy uniemożliwia jej prawidłowe pełnienie swojej funkcji, co z kolei utrudnia regenerację tkanek. Bardzo powszechnym w ostatnich latach rozwią-

zaniem tego problemu są rusztowania komórkowe, nazywane także skafoldami (ang. *scaffolds*) [4, 5]. Są to przestrzenne struktury złożone z sieci wzajemnie połączonych porów. Główną rolą skafoldów w regeneracji tkanek jest zastępowanie ECM [6–9]. Rusztowania komórkowe często otrzymuje się z polimerów biodegradowalnych, np. polilaktydu lub polikaprolaktonu. Polimery te wykazują korzystne właściwości mechaniczne, ponadto degradują do nietoksycznych produktów łatwo wydalanych z organizmu (CO₂, H₂O). Dlatego też rusztowania wytwarzane z polimerów biodegradowalnych są niekiedy nazywane czasową macierzą zewnątrzkomórkową [10–14].

Rusztowania komórkowe przeznaczone do zastosowania w regeneracji uszkodzonych tkanek muszą spełniać określone wymagania. Zarówno rusztowania, jak i ewentualne produkty ich rozkładu nie mogą być toksyczne dla komórek organizmu (cytotoksyczne). Ponadto, wymiary porów muszą być dopasowane do typu komórek regenerowanej tkanki. Czas degradacji rusztowania z polimerów biodegradowalnych musi być dostosowany do szybkości regeneracji tkanki. Rozkład rusztowania powinien przebiegać wolniej niż regeneracja tkanki. Niezmiernie ważna jest odpowiednia wytrzymałość mechaniczna rusztowania, która powinna być zbliżona do wytrzyma-

¹⁾ Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Laboratorium Procesów Technologicznych, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa.

²⁾ Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN, ul. Pawińskiego 5b, 02-106 Warszawa.

*) Autor do korespondencji; e-mail: agadomska@ch.pw.edu.pl

łości regenerowanej tkanki, co gwarantuje, że rusztowanie się nie zerwie i spełni swoją funkcję [15, 16].

Celem pracy była ocena wpływu prekursorów porów na morfologię i wytrzymałość mechaniczną polilaktydowych rusztowań komórkowych, otrzymywanych metodą mokrej inwersji faz w wariancie *freeze extraction*, według opracowanej w zespole metody [17]. Wytypowano rusztowanie o najkorzystniejszych właściwościach, następnie zbadano cytotoksyczność materiału oraz możliwości prowadzenia na nim hodowli komórkowych – fibroblastów mysich.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

Do otrzymywania rusztowań wykorzystano poli-L-laktyd (PLA, typ 2003D, NatureWorks®, USA) o $M_n = 86\ 000$, rozpuszczalniki 1,4-dioksan cz.d.a. (POCh) oraz metanol techn. (Butra), zaś wodę destylowaną używano we własnym zakresie.

Otrzymywanie rusztowań

Rusztowania otrzymano metodą mokrej inwersji faz w wariancie *freeze extraction* [17, 18]. Roztwory poli-L-laktydu w dioksanie, o stężeniu 3,2 % mas., wylewano na szalki Petriego i umieszczano na 24 h w zamrażalniku w temp. $-18\ ^\circ\text{C}$. Następnie uformowane rusztowania zanurzano na 48 h w kąpeli żelującej (metanol : woda = 4 : 1 obj./obj.) o temp. $-18\ ^\circ\text{C}$. Po tym czasie rusztowania płukano w wodzie destylowanej i suszono w suszarce próżniowej. W wypadku stosowania prekursora porów wybrane substancje dodawano do roztworu PLA (prekursor porów : roztwór PLA = 1 : 12 obj./obj.), mieszano dokładnie aż do całkowitego rozpuszczenia się, a następnie wylewano na szalkę.

Metody badań

Badanie cytotoksyczności, hodowla fibroblastów

Badania komórkowe przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów mysich L929 (Sigma Aldrich). Wycięte z rusztowań krążki układano na płytkach wielodołkowych, po czym w dołkach umieszczano zawiesinę komórek w medium hodowlanym [89 % DMEM (standardowe podłoże hodowlane), 10 % PBS (buforowany roztwór soli fizjologicznej), 1 % antybiotyki] o gęstości odpowiedniej dla każdego testu (test cytotoksyczności i hodowla fibroblastów: $1 \cdot 10^4$ komórek/dołek, obrazowanie metodą skaningowej mikroskopii elektronowej SEM: $2,5 \cdot 10^3$ komórek/ cm^3). Próbami referencyjnymi były puste dołki wypełnione medium hodowlanym. Przygotowane płytki umieszczano w inkubatorze ($37\ ^\circ\text{C}$, 5 % CO_2), w którym przebywały przez czas odpowiedni dla każdego testu (test cytotoksyczności: 24 h, hodowla fibroblastów: 72 h, obrazowanie SEM: 120 h). W wypadku

testu cytotoksyczności i hodowli fibroblastów po upływie określonego czasu liczono żywe komórki pozostające w każdym dołku za pomocą testu PrestoBlue i z wykorzystaniem odczytu wartości fluorescencji. W odniesieniu do obrazowania SEM, próbki rusztowań analizowano po uprzednim wysuszeniu ich pod wyciągiem [19].

Metody analityczne

– Morfologię rusztowań badano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) Phenom ProX, wyposażonego w oprogramowanie pozwalające na określenie średniej porowatości oraz zakresu średnic porów na podstawie analizy obrazów.

– Hodowle fibroblastów na rusztowaniach zobrazowano przy użyciu mikroskopu SEM JEOL JSM-6010LV. Przed badaniem rusztowania wraz z komórkami pokrywano 7 nm warstwą złota.

– Wytrzymałość mechaniczną rusztowań określano w próbie rozciągania za pomocą aparatu Instron 5566. Do badań użyto wycięte z rusztowań folie o wymiarach 2×7 cm. Na podstawie otrzymanych wyników obliczano moduły Younga rusztowań. Wynik był średnią z trzech pomiarów.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Otrzymywanie rusztowań

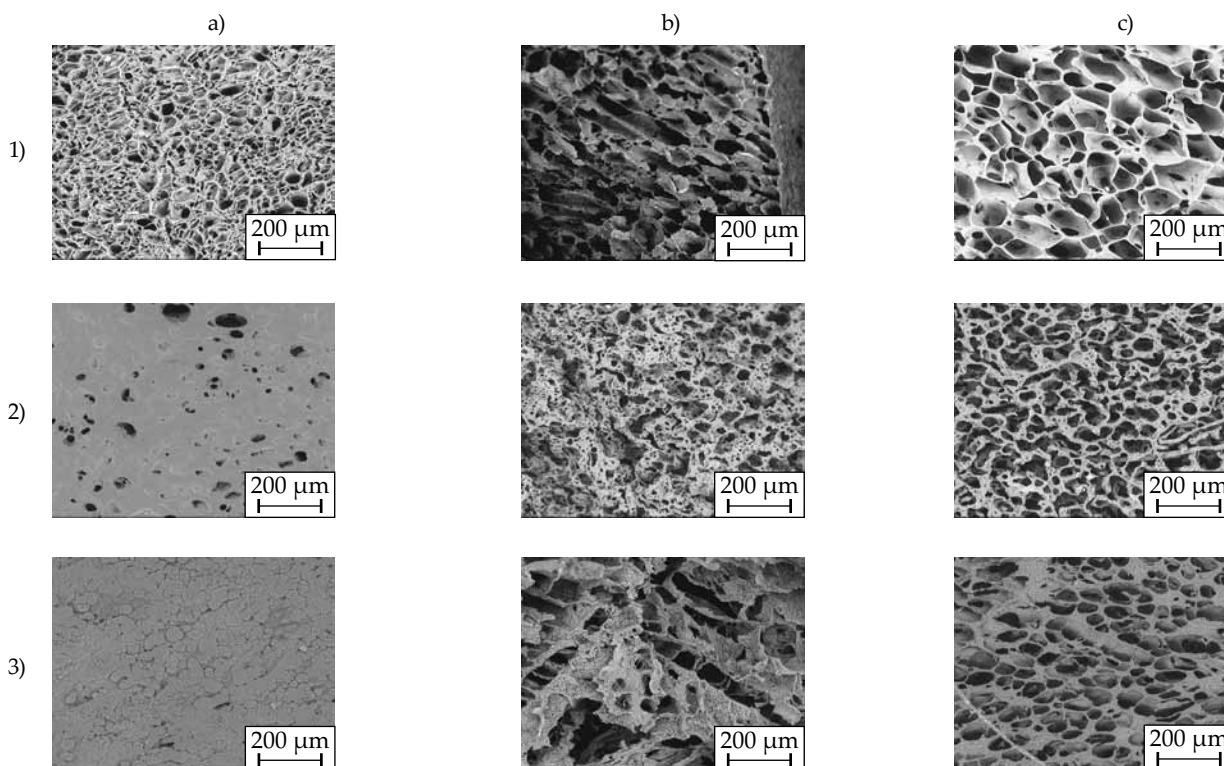
Zbadano wpływ wody i metanolu, jako ciekłych prekursorów porów, na morfologię i porowatość otrzymanych polilaktydowych rusztowań. Zobrazowano powierzchnie dolne, górne oraz przełomy (rys. 1), obliczono także średnie porowatości oraz zakresy średnic porów (tabela 1).

Otrzymane rusztowania wykazywały różną morfologię porów w przełomie. W rusztowaniach bez dodatku prekursora porów pory były duże, miały kształt zbliżony do owal-

T a b e l a 1. Porowatość i średnica porów rusztowań otrzymanych bez dodatku i z dodatkiem prekursora porów

T a b l e 1. Comparison of the porosity and pore diameter of scaffolds obtained without and with the addition of pore precursors

	Rusztowania z L-PLA		
	Bez porofora	z H_2O	z MeOH
Średnia porowatość powierzchni dolnej, %	29,5	4,5	17,6
Średnia porowatość powierzchni górnej, %	50,5	47,5	34,0
Zakres średnic porów w przełomie, μm	2–120	2–65	2–75
Zakres średnic porów na powierzchni dolnej, μm	2–45	2–80	2–12
Zakres średnic porów na powierzchni górnej, μm	9–120	2–75	8–100



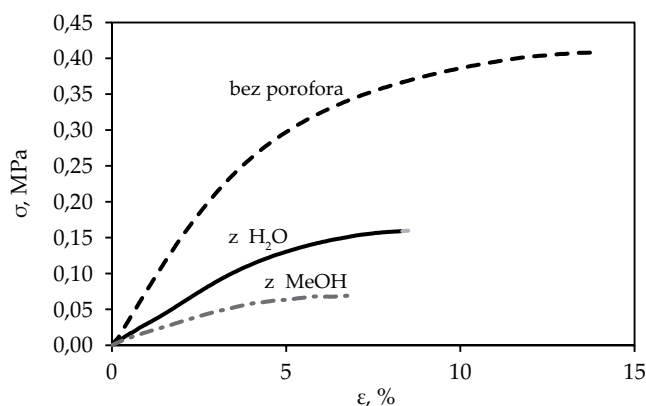
Rys. 1. Morfologia rusztowań otrzymanych: a) bez dodatku prekursora porów, b) z dodatkiem wody, c) z dodatkiem metanolu; 1) powierzchnia dolna, 2) przełom, 3) powierzchnia górna

Fig. 1. Morphology of scaffolds obtained: a) without pore precursor, b) with addition of water, c) with addition of methanol; 1) lower surface, 2) cross-section, 3) upper surface

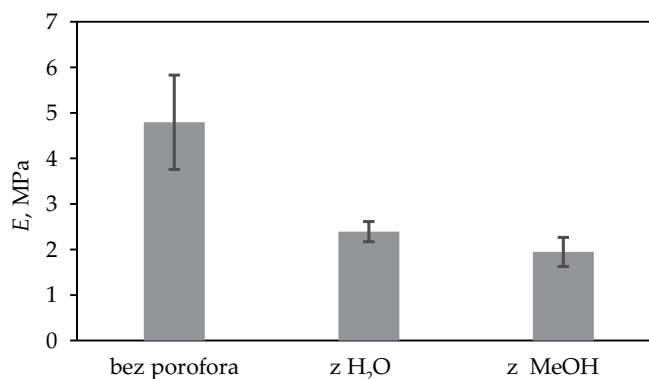
nego i zawierały nieliczne małe pory w ścianach wewnętrznych. Rozmiar porów mieścił się w przedziale 2–120 μm . Powierzchnia dolna tych rusztowań była mniej porowata i zawierała pory mniejsze (porowatość 29,5 %, wielkość porów: 2–45 μm) niż powierzchnia górna (porowatość: 50,5 %, wielkość porów: 9–120 μm). Rusztowania z PLA otrzymane z dodatkiem wody jako prekursora porów miały pory mniejsze niż rusztowania bez wody, o nieregularnym kształcie. Wymiary porów w przełomie mieściły się w przedziale 2–65 μm . Ściany wewnętrzne tych porów zawierały liczne perforacje w postaci małych porów. Powierzchnia dolna rusztowań była zdecydowanie mniej porowata (4,5 %) niż powierzchnia górna (47,5 %), ale pory na obu powierzchniach miały podobne wymiary (2–80 μm). Rusztowania, w których zastosowano dodatek metanolu również miały pory o nieregularnym kształcie, zarówno podłużnym, jak i zbliżonym do owalnego. Wymiary porów mieściły się w przedziale 2–75 μm , a ich ściany, podobnie jak opisano poprzednio, były perforowane. Powierzchnia dolna rusztowań była mniej porowata (17,6 %) i zawierała mniejsze pory (2–12 μm) niż powierzchnia górna (34,0 %, 8–100 μm).

Wytrzymałość mechaniczna

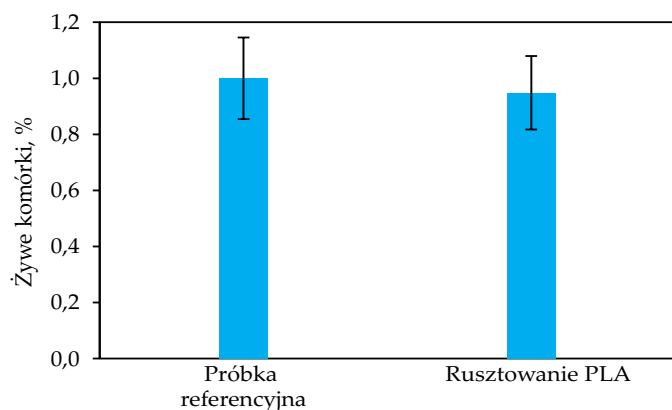
Otrzymane rusztowania poddano próbie rozciągania. Na podstawie krzywej zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ , wydłużenie względne) (rys. 2) wyznaczono wartości modułu Younga (E , współczynnik sprężystości wzdłużnej) (rys. 3).



Rys. 2. Przykładowe krzywe naprężenia otrzymanych rusztowań
Fig. 2. Exemplary stress-strain curve of scaffolds



Rys. 3. Wartości modułów Younga otrzymanych rusztowań
Fig. 3. Young's modulus of scaffolds



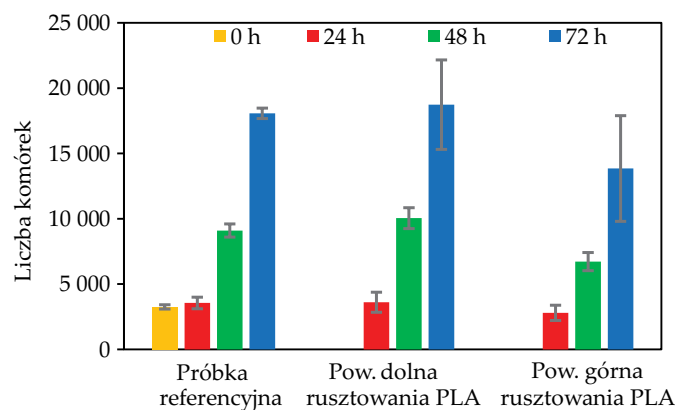
Rys. 4. Zawartość żywych komórek w hodowli po 24 h
Fig. 4. Percent of live cells after 24 h culture

Największą wartość modułu Younga wykazywało rusztowanie, w którym nie stosowano dodatku prekursora porów. Rusztowanie to charakteryzowało się również największym naprężeniem przy zerwaniu oraz największym wydłużeniem względnym. Mniejsze wartości modułu Younga rusztowań otrzymanych z dodatkiem wody lub metanolu, a także ich mniejsze naprężenie przy zerwaniu i wydłużenie względne są wynikiem perforacji ścian wewnętrznych największych porów.

Na podstawie analizy morfologii porów oraz właściwości mechanicznych stwierdzono, że rusztowania PLA otrzymane bez dodatku prekursora porów najlepiej spełniają warunki do prowadzenia hodowli komórkowych.

Cytotoksyczność

Oceniano cytotoksyczność otrzymanych rusztowań PLA w stosunku do fibroblastów mysich (rys. 4). O braku cytotoksyczności świadczy liczba komórek pozostających w hodowli po 24 h, przekraczająca 50 % ich stanu początkowego w chwili wysiania [20].



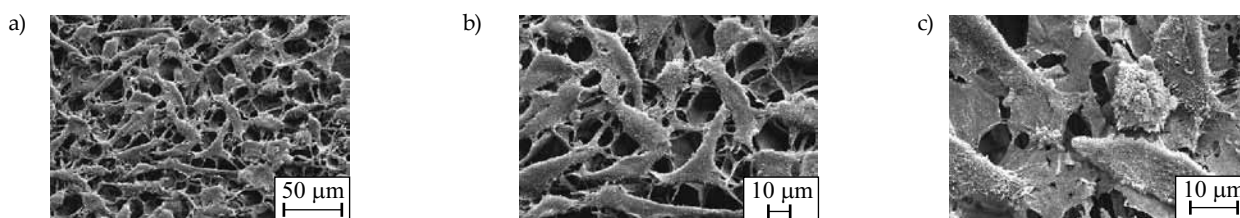
Rys. 5. Liczba żywych komórek podczas hodowli
Fig. 5. Number of live cells during the culture

W wypadku rusztowania z PLA bez udziału prekursora porów po 24 h hodowli liczba komórek praktycznie biorąc nie zmieniła się w stosunku do stanu początkowego, gdyż utrzymywała się na poziomie $95 \pm 13\%$. Wynik ten świadczy o braku cytotoksyczności badanych rusztowań wobec fibroblastów.

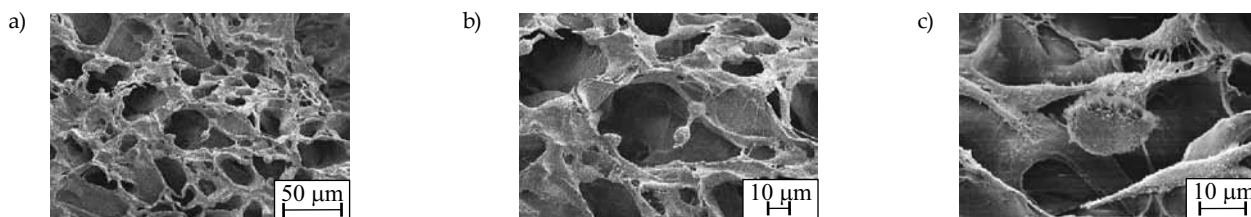
Hodowla fibroblastów

Na wybranych rusztowaniach hodowano komórki fibroblastów mysich. Badanie prowadzono przez 72 h, przy czym co 24 h pobierano z hodowli próbki i liczone żywe komórki występujące na każdej z powierzchni rusztowań (rys. 5).

Fibroblasty to komórki adherentne, które przylegają do powierzchni i namnażają się w monowarstwie, dążąc do 100 % konfluencji powierzchni [17, 18]. Taki charakter wzrostu powoduje, że komórki te preferują wzrost na powierzchniach płaskich i nie wykazują tendencji do wnicania w struktury trójwymiarowe, dlatego badano wzrost komórek tylko na powierzchniach, pomijając przełomy.



Rys. 6. Powierzchnia dolna rusztowań po 120 h hodowli fibroblastów, w powiększeniu: a) 500×, b) 1000×, c) 2000×
Fig. 6. Lower surface of scaffolds after 120 h fibroblasts culture, magnification: a) 500×, b) 1000×, c) 2000×



Rys. 7. Powierzchnia górna rusztowań po 120 h hodowli fibroblastów, w powiększeniu: a) 500×, b) 1000×, c) 2000×
Fig. 7. Upper surface of scaffolds after 120 h fibroblasts culture, magnification: a) 500×, b) 1000×, c) 2000×

Po 24 h liczba występujących na obu powierzchniach rusztowania komórek była zbliżona (pow. dolna: 2800 ± 590 , pow. górna: 3600 ± 770). Po upływie 48 h hodowli liczba komórek na powierzchni dolnej zwiększyła się prawie trzykrotnie ($10\,000 \pm 790$), a na powierzchni górnej dwukrotnie (6700 ± 690). Po 72 h zaobserwowano dalszy prawie dwukrotny wzrost komórek na powierzchni dolnej ($19\,000 \pm 3000$) oraz górnej ($14\,000 \pm 4000$), przy czym na powierzchni dolnej nastąpiło w tej dobie spowolnienie wzrostu. Podczas trwania hodowli największy, taki sam jak na powierzchni próbki referencyjnej, wzrost liczebności komórek zaobserwowano na powierzchni dolnej.

Z rusztowań, na których prowadzono hodowlę komórek przez 120 h pobrano próbki, wysuszono je i poddano analizie za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (rys. 6, 7). Dla porównania analizowano obrazy SEM rusztowań bez komórek.

Na obu powierzchniach, górnej i dolnej, zaobserwowano obecność fibroblastów. Powierzchnia dolna prawie w całości była pokryta komórkami rozprzestrzonymi między porami. Na powierzchni górnej mniejsza liczba komórek była rozprzestrzeniona między porami, a występujące między ich ściankami duże odległości wynikały ze znacznych rozmiarów porów, utrudniających najprawdopodobniej przyleganie komórek do ich powierzchni.

Stwierdzono, że fibroblasty preferują do wzrostu powierzchnie nieporowate.

PODSUMOWANIE

Zbadano właściwości rusztowań komórkowych otrzymanych metodą mokrej inwersji faz w wariacie *freeze extraction*. Najliczniejsze i największe pory w przetłomie miały rusztowania wytworzone bez dodatku prekursora porów. Wykazywały one także najlepsze właściwości mechaniczne, prawdopodobnie dzięki niewielkiej liczbie perforacji w wewnętrznych ścianach porów.

Otrzymane rusztowania charakteryzowały się brakiem cytotoksycznego wpływu na fibroblasty mysie. Wykazano, że na badanych rusztowaniach jest możliwy wzrost fibroblastów mysich, jednak ze względu na trójwymiarową porowatą strukturę rusztowań z PLA należy na nich hodować komórki preferujące wzrost w przestrzeni (co jest zgodne z planowanym przeznaczeniem), dlatego dalsze nasze badania będą poświęcone hodowli chondrocytów.

Praca została sfinansowana przez Politechnikę Warszawską oraz w ramach działalności statutowej Laboratorium Procesów Technologicznych Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

Autorzy dziękują firmie PIK INSTRUMENTS za udostępnienie mikroskopu SEM do badań.

LITERATURA

- [1] Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W.: *Acta Biomaterialia* **2015**, 23, 17.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>
- [2] Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C. i in.: *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, 97, 4.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- [3] Alberts B., Bray D., Hopkin K.: „Podstawy biologii komórki”, tom 1, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2005, str. 16.
- [4] Bhattacharjee M., Coburn J., Centola M. i in.: *Advanced Drug Delivery Review* **2015**, 84, 107.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.010>
- [5] Trachtenberg J., Vo T., Mikos A.: *Annals of Biomedical Engineering* **2015**, 43, 681.
<https://dx.doi.org/10.1007/s10439-014-1151-0>
- [6] Nerem R.M., Sambanis A.: *Tissue Engineering* **2007**, 1, 3.
<http://dx.doi.org/10.1089/ten.1995.1.3>
- [7] O'Brien F.J.: *Materials Today* **2011**, 14, 88.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- [8] Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S.: *International Journal of Polymer Science* **2011**, 2011, 1. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/290602>
- [9] Grolik M.: *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ. Nauki ścisłe* **2011**, 2, 33.
- [10] Gunatillake P.A., Adhikari R.: *European Cells and Materials Journal* **2003**, 5, 1.
<https://dx.doi.org/10.22203/eCM.v005a01>
- [11] Guo B., Ma X.P.: *Science China Chemistry* **2014**, 57, 490.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11426-014-5086-y>
- [12] Nair L.S., Laurencin C.T.: *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 762.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- [13] Gupta A.P., Kumar V.: *European Polymer Journal* **2007**, 43, 4053. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.06.045>
- [14] Kruk A., Gadomska-Gajadur A., Ruśkowski P.: „Nowoczesne trendy w medycynie” (red. Olszówka M., Maciąg K.), Wydawnictwo Tygiel, Lublin 2015, str. 91.
- [15] Kruk A., Gadomska-Gajadur A., Ruśkowski P. i in.: *Desalination and Water Treatment* **2017**, 64, 317.
<http://dx.doi.org/10.5004/dwt.2017.11415>
- [16] Perez R.A., Mestres G.: *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* **2016**, 61, 922. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.087>
- [17] *Zgłosz. pat. PL P-415 317* (2015).
- [18] Kruk A., Gadomska-Gajadur A., Ruśkowski P. i in.: *Polimery* **2017**, 62, 118.
<http://dx.doi.org/10.14314/polimery.2017.118>
- [19] Urbanek O., Sajkiewicz P., Pierini F. i in.: *Biomedical Materials* **2017**, 12, 015 020.
<http://dx.doi.org/10.1088/1748-605X/aa5647>
- [20] <http://biotechnologia.pl/biotechnologia/jak-badac-aktywnosc-cytotoksyczna-zwiazkow-chemicznych,15115> (data dostępu 13.03.2015).
- [21] Langdon S.P.: “Cancer Cell Culture: Methods and Protocols”, Humana Press, Totowa 2004, str. 5.
- [22] Stokłosowa S.: „Hodowla komórek i tkanek”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006, str. 148.

Otrzymano 6 VII 2017 r.