

# BADANIA BIOAKTYWNOŚCI Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK KOŚCIOTWÓRCZYCH NA TYTANIE POKRYTYM CHITOZANEM

MILENA SUPERNAK

POLITECHNIKA GDAŃSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I SPAJANIA,  
UL. GABRIELA NARUTOWICZA 11/12, 80-233 GDAŃSK  
E-MAIL: MILENA@SHL.PL

## Streszczenie

*Chitozan to naturalny polimer z grupy polisacharydów, który znalazł szerokie zastosowanie w aplikacjach biomedycznych w celu wywołania bioaktywności implantu. W opisanych badaniach przeprowadzono próbę nałożenia membran chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji na powierzchnię tytanu, a następnie sprawdzenie bioaktywności materiału w warunkach in vitro, przy wykorzystaniu komórek kościotwórczych MC3T3-E1. Powierzchnia tytanu przed nałożeniem powłoki chitozanowej została poddana utlenianiu. Po siedmiu dniach od nałożenia komórek na tytan pokryty powłoką chitozanową wykonano testy proliferacji, których rezultat analizowano na mikroskopie fluorescencyjnym Olympus BX 51. Zaobserwowany wzrost komórek wskazuje na uzyskanie dobrej bioaktywności powierzchni, jednak niewystarczającej adhezji pomiędzy tytanem a membraną chitozanową. Proponowana jest dalsza modyfikacja powierzchni tytanu i procesu nakładania powłok chitozanowych.*

**Słowa kluczowe:** chitozan, tytan, bioaktywność, komórki kościotwórcze

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 69-72]

## Wprowadzenie

Tytan i jego stopy są materiałami powszechnie stosowanymi na implanty, mają bardzo dobrą wytrzymałość i odporność korozyjną [1]. Jednak mimo doskonalenia ich powierzchni pozostaje problematyczna kwestia trwałego połączenia implant-tkanka kostna [2]. Rozwiązaniem tego problemu jest uzyskanie powierzchni o odpowiedniej bioaktywności umożliwiającej szybki i stabilny przerost implantu tkanką [3].

Na poprawę bioaktywności powierzchni tytanu może wpłynąć naniesienie powłoki chitozanowej [4]. Chitozan - należy do grupy polisacharydów produkowanych w procesie chemicznej deacetylacji chityny [5]. Może uzyskiwać różne stopnie deacetylacji [6]. Niższy stopień zwiększa bioaktywność, wyższy sprzyja lepszemu przywiązaniu komórek [7]. Ten naturalny polimer jest nietoksyczny, biodegradowalny, biokompatybilny, a przede wszystkim działa antybakteryjnie [8,9]. Dzięki swym właściwościom znalazł szerokie zastosowanie w biotechnologii, farmacji i medycynie [10].

Celem badań było podjęcie próby nałożenia powłoki chitozanowej na powierzchnię tytanu, a w dalszym etapie sprawdzenie bioaktywności takiej powierzchni w warunkach in vitro, z wykorzystaniem komórek kościotwórczych.

# BIOACTIVITY STUDIES USING OSTEOGENIC CELLS ON TITANIUM COATED WITH CHITOSAN

MILENA SUPERNAK

GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
11/12 NARUTOWICZA STR., 80-952 GDANSK, POLAND  
E-MAIL: MILENA@SHL.PL

## Abstract

*Chitosan is a natural polymer from the group of polysaccharides, which has found wide application in biomedical applications to induce bioactivity of implant. The studies described were carried out test imposition of chitosan membranes with varying degrees of deacetylation on the surface of titanium, and then check the bioactivity of the material in vitro, using osteogenic cells MC3T3-E1. Titanium surface before imposition of chitosan coating has been subjected to oxidation. After seven days of the imposition of cells on titanium with chitosan coated, we performed proliferation test using fluorescent microscope Olympus BX51. The observed increase in cell indicates a obtain good bioactivity of the surface, however the adhesion between the titanium and the chitosan membrane is insufficient. Proposed a further modification of titanium surface and chitosan coating process.*

**Keywords:** chitosan, titanium, bioactivity, osteogenic cells

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 69-72]

## Introduction

Titanium and its alloys are materials commonly used for implants, they have very good strength and corrosion resistance [1]. However despite the improvement of their surface, remains a problematic question of a lasting connection implant-bone tissue [2]. The solution to this problem is to obtain a suitable surface bioactivity enabling fast and stable implant tissue overgrowth [3]. To improve bioactivity of titanium surface may affect drawing of chitosan coating [4].

Chitosan - belongs to a group of polysaccharides produced by chemical deacetylation of chitin [5]. May obtain different degrees of deacetylation [6]. Lower degree increases bioactivity, higher promotes better cell attachment [7]. This natural polymer is non-toxic, biodegradable, biocompatible and especially antibacterial [8, 9]. Thanks to their properties, has found wide application in biotechnology, pharmacy and medicine [10].

The aim of this study was to try to impose chitosan coating on titanium surface and at a later stage to check bioactivity of this surface using osteogenic cells in vitro.

## Materials and methods

### Materials

To test was used pure titanium 99.6% (AST B262), with dimensions 10x10x2 mm. The samples were polished on one side with waterproof paper to the final graduation 2400, and then subjected to ultrasonic cleaning in the reagents such as acetone, ethanol, deionized water. Prepared in this

**Materiały**

Do badań użyty został czysty tytan 99,6% (AST B262), o wymiarach 10x10x2 mm. Próbkę były szlifowane jednostronnie na wodoodpornym papierze do końcowej gradacji 2400, a następnie poddane czyszczeniu w myjni ultradźwiękowej, w takich odczynnikach jak: aceton, etanol, woda dejonizowana. Tak przygotowane próbki zostały poddane utlenianiu w atmosferze powietrza w temperaturze 550°C, w czasie 3h. Po zakończonym procesie utleniania próbki poddano obserwacji mikroskopowej (RYS. 1) na skaningowym mikroskopie elektronowym (SUPRA 25 ZEISS), udostępnionym przez Islandzkie Centrum Innowacji.

Chitozan w postaci sproszkowanej (udostępniony przez Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) o różnym stopniu deacetylacji: DD 87% sigma, DD 87% , DD 96% został wykorzystany w procesie nanoszenia powłoki na powierzchnię tytanu.

W eksperymencie wykorzystano komórki kościotwórcze (udostępnione przez Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) pochodzące od myszy, typu MC3T3-E1. Komórki pobrane z organizmu żywego były przechowywane w temperaturze -80°C. W celu wykorzystania ich do badań doświadczalnych zostały one rozmrożone w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Komórki zostały umieszczone w inkubatorze w temperaturze 37°C z wilgotnością sięgającą 95% i dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. Jako pożywkę dla komórek zastosowano specjalny pokarm składający się z roztworu o nazwie handlowej α-MEM przygotowanego przez firmę GIBCO™ z dodatkiem 10% FBS (surowica bydlęca)

**Metody badań**

Membrany chitozanowe przygotowano wg procedury: 1% wagowy chitozanu rozpuszczonego w 0,5% wagowy kwasu octowego w wodzie, nanoszono na próbki tytanowe 3 krotnie, w odstępie czasowym 5 minut pomiędzy drugą aplikacją, w celu podsuszenia warstw. Następnie próbki zostały przeniesione do inkubatora w temp. 37°C, gdzie uległy wysuszeniu. Kolejnym etapem była neutralizacja membran w wodorotlenku sodu oraz sterylizacja z wykorzystaniem etanolu. Na tak przygotowanych próbkach zasiedlono komórki kościotwórcze MC3T3-E1, w ilości 5000 komórek na cm<sup>2</sup>. Komórki były karmione co 2 dni pokarmem o nazwie handlowej DMEM-F12 przygotowanym przez firmę GIBCO™ z dodatkiem surowicy bydlęcej (FBS) oraz penicyliny i streptomycyny (P/S).

Po siedmiu dniach przeprowadzono testy proliferacji komórek, wykorzystując w tym celu dwa odczynniki:

- CFSE (dioctan karboksyfluoresceina, sukcydimidowy ester) pokazujący rozrost komórek,
- DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol) pokazujący jądra komórkowe.

**Wyniki i dyskusja**

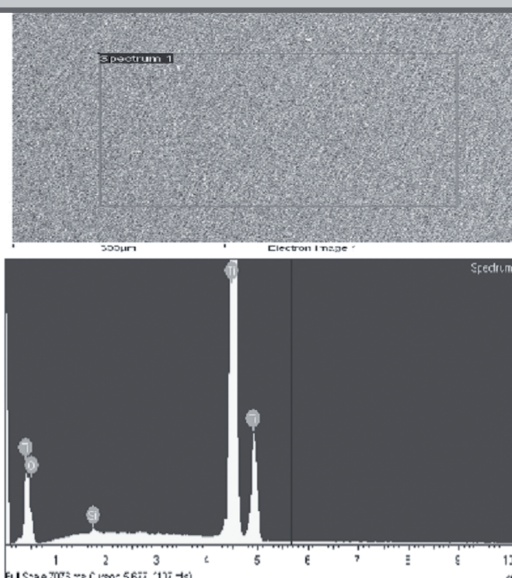
Próbki po badaniach proliferacji poddano obserwacji mikroskopowej na mikroskopie fluorescencyjnym Olympus BX

Spectrum processing :  
No peaks omitted

Processing option : All elements analyzed  
(Normalised)  
Number of iterations = 3

Standard :  
O 2440 CaCO3 15-Mar-2011 03:37 PM  
Si 3587 AISI 316 14-Dec-2010 02:09 PM  
Ti 2440 Ti 2-Dec-2010 03:56 PM

Element	Weight%	Atomic%
O K	13.40	31.62
Si K	0.26	0.35
Ti K	86.33	68.02
Totals	100.00	



**RYS. 1. Topografia powierzchni oraz skład chemiczny próbki tytanowej po utlenianiu.**  
**FIG. 1. Topography and surface composition of titanium samples after oxidation.**

way samples were subjected to oxidation in air atmosphere at 550°C during 3h. After the oxidation process, samples were subjected to microscopic observation (FIG.1) on scanning electron microscope (ZEISS SUPRA 25), shared by Icelandic Innovation Center.

Chitosan in powder (shared by Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) with different degrees of deacetylation: 87% DD sigma, DD 87% 96% DD were used in the process of applying a coating on the titanium surface.

In the experiment were used osteogenic cells (shared by Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) coming from mouse, MC3T3-E1 type. Cells taken from a living organism were stored at -80°C. To use them for experimental studies they were unfrozen in a water bath at 37°C. The cells were placed in an incubator at 37°C with humidity up to 95% and the addition of 5% CO<sub>2</sub>. As a medium for the cells used a special food consisting of solution called α-MEM prepared by GIBCO™ with 10% FBS (bovine serum).

**Methods**

Chitosan membranes were prepared according the procedure: 1% by weight of chitosan dissolved in 0.5% by weight of acetic acid in water applied to the titanium sample 3 times, waiting five minutes between one application and another, to dry layers. Then samples were transferred to an incubator at 37°C, where they were dried. The next step was a neutralization of membranes in sodium hydroxide and sterilization using ethanol. At so prepared samples inhabited osteogenic cells MC3T3-E1, in an amount 5000 cells per cm<sup>2</sup>. Cells were fed every 2 days food DMEM-F12 prepared by GIBCO™ with the addition of FBS (bovine serum) and P/S (penicillin and streptomycin).

After seven days performed tests of cell proliferation, use for this purpose two reagents:

- CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) cell proliferation,
- DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindole) – cell nucleus.

**Results and discussion**

Samples after proliferation studies subjected to microscopic observation on fluorescence microscope Olympus BX 51. We analyzed four samples:

- sample with chitosan membrane DD87% sigma (FIG. 2),



51. Analizie zostały poddane 4 próbki:

- próbka z membraną chitozanową DD87% sigma (RYS. 2),
- próbka z membraną chitozanową DD87% (RYS. 3),
- próbka z membraną chitozanową DD 96% (RYS. 4),
- próbka tytanowa po procesie utleniania (RYS. 5).

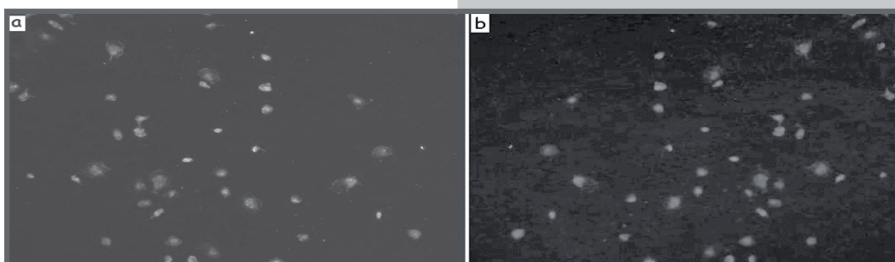
Na próbkach tytanowych z powłoką chitozanową DD 87%, (RYS. 3) i DD 96%, (RYS. 4) uzyskano oczekiwany wzrost komórek. Zaobserwować można znaczną ilość jąder komórkowych, co świadczy o stałym wzroście komórek, który w dalszym etapie prowadzi do narastania tkanki kostnej. Próbka z membraną DD87% sigma (RYS. 2) nie uzyskała oczekiwanego wzrostu komórek, zaobserwować można nieznaczną ilość jąder komórkowych, ale nie widać ich rozwoju. Spowodowane jest to niewystarczającą adhezją powłoki chitozowej do powierzchni tytanu (membrana nie utrzymała się na całej powierzchni próbki). Na próbkach tytanowych bez powłoki chitozowej (RYS. 5) obserwowany jest zbyt szybki wzrost komórek, który prowadzi do ich obumierania z powodu braku odpowiedniej ilości pożywienia.

Przeprowadzone badania są jednymi z pierwszych, które podjęły próbę połączenia tytanu z powłoką chitozanową bez stosowania szkodliwych substancji dla organizmu żywego, takich jak np. glutaraldehyd i silany [11, 12]. Uzyskane wyniki świadczą o zadowalającej bioaktywności po-

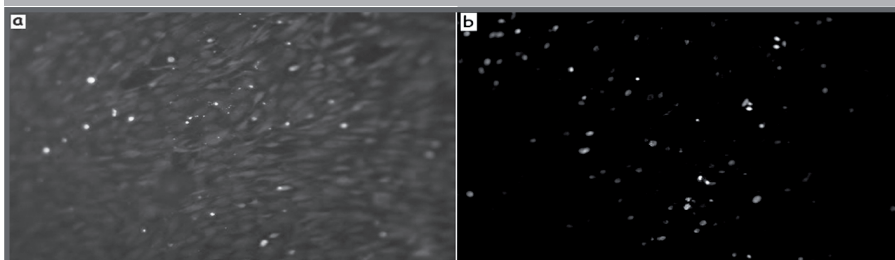
- sample with chitosan membrane DD87% (FIG. 3),
- sample with chitosan membrane DD96% (FIG. 4),
- titanium sample after oxidation (FIG.5).

On samples of titanium coated with chitosan DD 87%, (FIG.3) and DD 96% (FIG.4) obtained the expected growth of cells. May be observe a considerable amount cell nuclei, which shows steady growth of cells, which in a later stage lead to a build bone tissue. A sample of membrane DD 87% sigma (FIG.2) did not obtain the expected increase in cell, may be observe a slight amount cell nuclei, but can not see their growth. This is due to not sufficient adhesion chitosan coating to the surface of titanium (membrane is not kept over the whole surface of the sample). On samples of titanium without coating chitosan (FIG.5) observed is too fast cell growth, which will lead to their death because do not have enough medium.

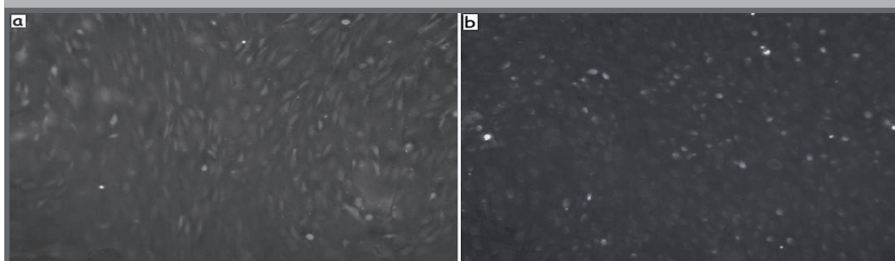
The research are one of the first, which attempted to connect the titanium with chitosan without using noxious substances for the living organism, such as glutaraldehyde and silanes [11,12]. The results show a satisfactory bioactivity of the surface, which leads to even better osseointegration of the implant tissue. However it is necessary to continue modification the surface of titanium and attempt to use its non-toxic alloys and coating process of chitosan, so that the the resulting material fulfills all the requirements for biomaterials.



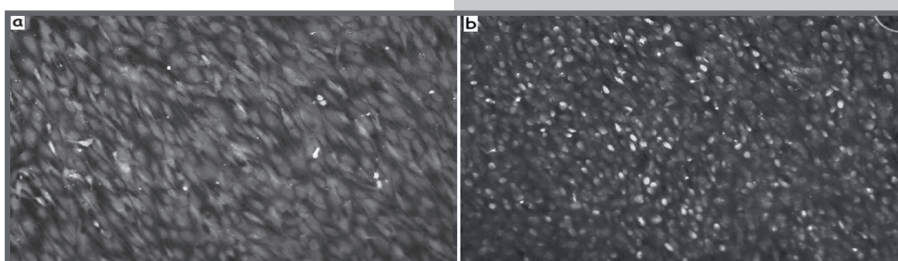
RYS. 2. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej membraną chitozanową DD87% sigma z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.  
FIG. 2. Image of the surface of titanium samples with chitosan membran DD87% sigma - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.



RYS. 3. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej membraną chitozanową DD87% z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.  
FIG. 3. Image of the surface of titanium samples with chitosan membran DD87% - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.



RYS. 4. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej membraną chitozanową DD96 z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.  
FIG. 4. Image of the surface of titanium samples with chitosan membran DD96% - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.



**RYS. 5.** Obraz powierzchni próbki tytanowej po procesie utleniania, z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.

**FIG. 5.** Image of the surface of titanium samples after oxidation - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.

wierzchni, która prowadzi do jeszcze lepszej osteointegracji tkanki z implantem. Niezbędna jest jednak dalsza modyfikacja powierzchni tytanu oraz próba wykorzystania jego nietoksycznych stopów i procesu nakładania powłok chitozanowych, tak aby uzyskany materiał spełniał wszystkie kryteria stawiane biomateriałom.

### Podziękowania

Badania zostały wykonane częściowo dzięki środkom Polsko- Islandzkiego projektu "Porous composite titanium alloy of high corrosion resistance, biocompatibility and bioactivity PORTAL" w ramach programu ERA-NET MATERA, jak też stypendium z Funduszu Stypendialnego i Szkoleniowego (FSS).

Autorka pragnie również złożyć podziękowanie za współpracę następującym osobom: Dr. Gissur Örylgsson - Innovation Center Iceland, Dr. Ólafur E. Sigurjónsson - Bloodbank, Landspítali- Univ. Hospital, Reykjavik Univ.

### Acknowledgments

The study was done in part thanks to the Polish-Icelandic project "Porous composite titanium alloy of high corrosion resistance, biocompatibility and bioactivity PORTAL" under ERA-NET MATERA Programme, as well as scholarship FSS.

The author also wishes to thank the following people for their cooperation : Dr. Gissur Örylgsson - Innovation Center Iceland, Dr. Ólafur E. Sigurjónsson - Bloodbank, Landspítali- Univ. Hospital, Reykjavik Univ.

### Piśmiennictwo

- [1] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Surface engineering in the production of titanium biomaterials. Oficyna wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2000.
- [2] Marciniak J.: Problems use metallic biomaterials in orthopedic surgery. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2000.
- [3] Krupa D., Baszkiewicz J., Sobczak J.W., Bliński A., Barcz A.: Modifying the properties of titanium surface with the aim of improving its bioactivity and corrosion resistance. Journal of Materials Processing Technology 143-144 (2003) 158-163.
- [4] Vanzillotta P.S., Sader M.S., Bastos I.N., de Almeida Soares G.: Improvement on in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments. Dental Materials (2006) 22, 275-282.
- [5]. Gross R.A., Scholz C.: Biopolimers from polysaccharides and agroproteins. Waszyngton D.C., ACS 2001.
- [6]. Nagahama H., Maeda H., Kasjiki T., Jayakumar R., Furuike T., Tamura H.: Preparation and characterization on novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. Carbohydrate Polymers 76 (2009) 255-260.

### References

- [7] Chatelet C., Damour O., Domar A.: Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials 22 (2001) 261-268.
- [8] Chitin Handbook. European Chitin Society 1997.
- [9] Prashant K.V.H., Tharanthan R.N.: Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. Trends Food Sci. Technol. 2007, 18, 117-131.
- [10] Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Tamura H.: Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances 29 (2011) 323-337.
- [11] Yuan et al.: Mechanical Property, Degradation rate, and Bone Cell Growth of Chitosan Coated on Titanium influenced by Degree of Deacetylation of Chitosan. Wiley InterScience DOI: 10.1002/jbm.b.31012.
- [12] Bumgardner et al.: Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. Implant Dentistry, Volume 16-Number 1.