

[7] Chłopek J.: Kompozyty węgiel-węgiel. Otrzymywanie i zastosowanie w medycynie. Polski Biuletyn Ceramiczny, Ceramika, 52, Kraków 1997.

[8] Bajor G., Błażewicz M., Bohosiewicz J., Chłopek J., Stoch A.: Badania powierzchni kompozytów węglowych pokrytych hydroksyapatytem po implantacji. Inżynieria Biomateriałów, 3, (1998), 21-27.

[9] Chłopek J.: New materials orthopedic screws, Acta Montana (in print).

[10] Shiota T.: Healing around hydroxylapatite coated istal- led with revascularized bone graft. Proc. of Congr. of JAOP, Hamburg 1992.

[11] Chłopek J., Stoch A., Degórska B., Kmiecński W.: Composite stems for dog's hip-joint endoprotheses, International Conference of Biomaterials Cracow '99, 30.05-02.06.99. Inżynieria Biomateriałów (in print).

[12] Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z.: Hydroksyapatyt jako materiał implantacyjny. Ceramika, 46, 8, (1994), 155-158.

POŁĄCZENIE DWÓCH METOD TESTOWANIA BIOMATERIAŁÓW IN VITRO

D. KUDELSKA-MAZUR*, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*, J. KOMENDER*, G. BENKE**

*ZAKŁAD TRANSPLANTOLOGII I CENTRALNY BANK TKANEK, INSTYTUT BIOSTRUKTURY, AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE.

**KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDYCZNA AKADEMII MEDYCZNEJ W WARSZAWIE.

Streszczenie

W pracy przedstawiono połączenie dwóch metod testowania biomateriałów w układzie *in vitro*. W doświadczeniu wykorzystano osteoblasty i fibroblasty ludzkie otrzymane z hodowli pierwotnych. Komórki wysiano na powierzchnię próbek materiałów: hydroksyapatytu, tlenku glinu i stali chirurgicznej. Zbadano żywotność, liczbę i rozplaszczanie komórek. Żywotność oznaczono w teście XTT (ELISA). Komórki poddano znakowaniu barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst oraz barwieniu z użyciem przeciwciał anti- α -tubulinie metodą pośrednią. Następnie próbki obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym. Liczbę i rozplaszczanie komórek zmierzono za pomocą programu do analizy obrazu ImageProPlus. Wyniki testów żywotności porównano z wynikami pomiarów rozplaszczania i liczby komórek. Zauważono korelację pomiędzy rozplaszczaniem i żywotnością osteoblastów i fibroblastów hodowanych na hydroksyapatycie, tlenku glinu i stali chirurgicznej.

Słowa kluczowe: testowanie biomateriałów, osteoblasty ludzkie, fibroblasty ludzkie, metody *in vitro*, rozplaszczanie komórek, analiza obrazu.

Wstęp

Zastosowanie metod *in vitro* do testowania biogodności materiałów wszczepialnych umożliwia precyzyjne zbadanie reakcji tkanek w kontakcie z implantem [1,2,3]. Warunki doświadczalne bardziej zbliżone do sytuacji klinicznej można osiągnąć wykorzystując w badaniach hodowle pierwotne komórek ludzkich [4,5]. Za pomocą metod *in vitro* można między innymi przeprowadzać testy toksyczności, badania przylegania, żywotności, czynności wydzielniczych i innych

COMBINATION OF TWO METHODS FOR BIOMATERIAL TESTING IN VITRO

D. KUDELSKA-MAZUR*, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*, J. KOMENDER*, G. BENKE**

*DEPARTMENT OF TRANSPLANTOLOGY AND CENTRAL TISSUE BANK, INSTITUTE OF BIOSTRUCTURE, THE MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW.

**DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS, THE MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW.

Abstract

We present a combination of two methods of biomaterial testing *in vitro*. Primary culture human osteoblasts and fibroblasts seeded on the samples of hydroxyapatite, alumina and surgical steel were used in the experiments. Cell viability, number and spreading were investigated. Viability was estimated in XTT test (ELISA). Anti- α -tubulin antibodies were used for indirect immunofluorescent labelling of cells and Hoechst fluorescent dye for staining of nuclei. Subsequently the samples were observed in a fluorescence microscope. Cell number and spreading were measured by means of ImageProPlus software. The results of viability test were compared with calculations of cell number and spreading. It was observed that correlation existed between spreading and viability of osteoblasts and fibroblasts cultured on hydroxyapatite, alumina and surgical steel.

Keywords: biomaterial testing, human osteoblasts, human fibroblasts, *in vitro* methods, cell spreading, image analysis.

Introduction

In vitro methods in biocompatibility investigation of implantable materials enable more precise evaluation of tissue reaction in contact with the implant [1,2,3]. Application of human primary cell cultures makes the experimental conditions closer to clinical situations [4,5]. *In vitro* investigations include toxicity testing, testing of cell viability, adherence and other functions [6,7,8]. Especially cell adherence and spreading seem to influence the regeneration of tissues in contact with implants [9,10,11].

The purpose of this study was to establish an effective quantitative method to assess cell adherence and

funkcji komórek [6,7,8]. Wydaje się, że szczególnie przyleganie i rozplaszczanie komórek ma wpływ na regenerację tkanek w kontakcie ze wszczepem [9,10,11].

Celem pracy było znalezienie efektywnej, ilościowej metody do oceny przylegania i rozplaszczania komórek na powierzchni wybranych biomateriałów. W badaniach określono żywotność, liczbę, pole powierzchni i rozplaszczanie komórek przylegających do powierzchni materiałów implantacyjnych. Następnie porównano wyniki poszczególnych pomiarów i sprawdzono czy istnieje korelacja pomiędzy żywotnością komórek a ich liczbą i rozplaszczaniem. W doświadczeniach wykorzystano materiały, które znalazły już zastosowanie w klinice.

Materiały i metody

Badania wykonano na osteoblastach i fibroblastach ludzkich pochodzących z hodowli pierwotnych. Komórki wyizolowano z materiału amputowanego podczas operacji ortopedycznych. Osteoblasty izolowano z wykorzystaniem metody opisanej przez Gallager i wsp. [12]. Fibroblasty otrzymano z fragmentów torebki stawowej metodą trawienia w kolagenazie. Zarówno fibroblasty, jak i osteoblasty hodowano w Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) z dodatkiem surowicy bydlęcej (10%FBS), L-glutaminy, penicyliny, streptomycyny i amfoterycyny B.

W doświadczeniach użyto następujące materiały: gęste spiekane bioceramiki (hydroksyapatyt i tlenek glinu) oraz stal chirurgiczną. Próbkę materiałów o średnicy 6mm wypolerowano i umieszczono na dnie studzienek w płytce 96-studzienkowej przeznaczonej do hodowli komórkowych. Materiały poddano preinkubacji w pożywce hodowlanej przez 24h.

Próbki podzielono na dwie grupy. Na pierwszą grupę próbek wysiano osteoblasty (15000 komórek/studzienkę), na drugą fibroblasty (10000 komórek/studzienkę). W studzienkach kontrolnych komórki wysiano bezpośrednio na powierzchnię naczynia hodowlanego.

Po 24h hodowli wykonano test XTT (ELISA) [13] oraz barwienie fluorescencyjne komórek. XTT jest testem aktywności mitochondrialnej komórek stosowanym w toksykologii do oceny żywotności i proliferacji komórek. Po inkubacji z substratem absorbancję supernatantu z nad hodowli zmierzono przy długości fali 450 nm.

Po utrwaleniu komórek wykonano barwienie fluorescencyjne włókien a-tubuliny za pomocą odpowiednich przeciwciał i barwienie jąder komórkowych (Hoechst). Następnie obserwowano próbki w mikroskopie fluorescencyjnym (Hoechst przy długości fali 495 nm, przeciwciała sprzężone z fluorochromem przy 365 nm). Przeprowadzono analizę obrazu [14] z wykorzystaniem programu komputerowego ImageProPlus. Określono liczbę jąder komórkowych w poszczególnych polach widzenia przy powierzchni pojedynczego pola widzenia równej $22528 \mu\text{m}^2$. Na każdej płytce zbadano co najmniej 40 pól widzenia. Pomiary powtórzone trzykrotnie. W podobny sposób zmierzono całkowite pole powierzchni komórek. Obliczono średnie pole pojedynczej komórki (rozplaszczanie komórek) poprzez podzielenie całkowitego pola powierzchni komórek przez liczbę komórek (jąder komórkowych).

Wyniki i dyskusja

Żywotność zarówno osteoblastów, jak i fibroblastów zmierzona w teście XTT była mniejsza na powierzchni stali niż na materiałach ceramicznych. Osteoblasty na hydroksyapatycie i tlenku glinu wykazały żywotność porównywalną z kontrolą. Żywotność fibroblastów na materiałach bioceramicznych była wyższa niż w kontroli i na próbkach sta-

spreading on the surfaces of biomaterials. We determined viability, number, surface area and spreading of cells adhering to the samples of implantable materials. Subsequently we compared the results in order to find out whether or not any correlation existed between cell viability, number and spreading. In order to focus on the method, in the experiments we used materials already applied in the clinical practice.

Materials and methods

Human primary culture cells isolated from the material amputated in orthopaedic operations were used in the investigation: osteoblasts (from bone fragments) and fibroblasts (from hip joint fibrous capsule). Human osteoblasts were obtained from primary cultures according to the method described by Gallager et al. [12]. Human fibroblasts were isolated by etching of tissue fragments in a collagenase solution. Both fibroblasts and osteoblasts were cultured in DMEM containing 10%FBS, L-glutamine, penicillin, streptomycin and amphotericin B.

The following materials were used in the experiments: dense sintered bioceramics (hydroxyapatite and alumina) and surgical steel. Samples, 6 mm in diameter, were polished and placed on the bottom of 96-well culture dishes. The samples were preincubated with culture medium for 24h.

On one part of the material samples, human osteoblasts were seeded and on the other part - human fibroblasts. Cells seeded directly into the polystyrene wells without any additional material served as control. The number of osteoblasts was 15,000 cells/well and that of fibroblasts - 10,000 cells/well in 0,2 ml culture medium.

After 24 h, the XTT test (ELISA) [13] and fluorescent staining of cells were performed.

XTT is a mitochondrial activity test (ELISA) used in toxicology in vitro in order to assess cell viability and proliferation. Following incubation with the substrate, absorbance of culture medium was measured at a wavelength of 450 nm.

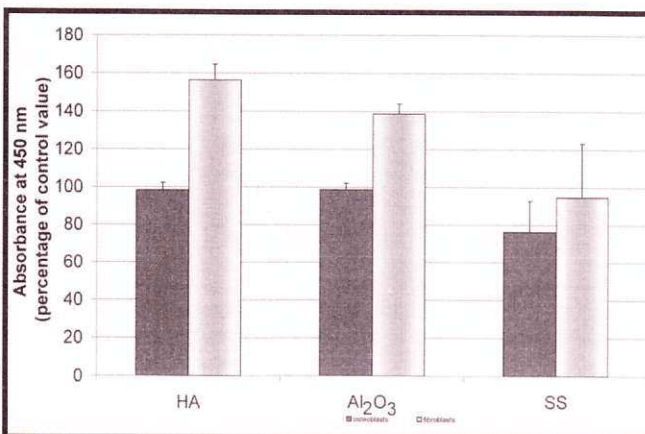
After cell fixation, labelling of a-tubulin fibres and Hoechst staining of nuclei were performed. Then the samples were observed in a fluorescence microscope (Hoechst at 495 nm wavelength and fluorochrome conjugated antibodies at 365 nm). The image was analysed [14] by means of ImageProPlus software. The number of nuclei in a standardised area ($22528 \mu\text{m}^2$) was counted. There were at least 40 areas analysed on each sample and measurements were performed in triplicate. Total area of cells was determined in the same manner. Afterwards, the average single cell area (cell spreading) was calculated by dividing total area of cells by the number of cells (number of nuclei).

Results and discussion

Viability of both osteoblasts and fibroblasts measured by means of XTT test was lower on steel than on the surface of bioceramics. Osteoblasts on hydroxyapatite and alumina showed viability comparable with control samples. Fibroblast viability on bioceramics was higher than in control and steel samples (FIG. 1).

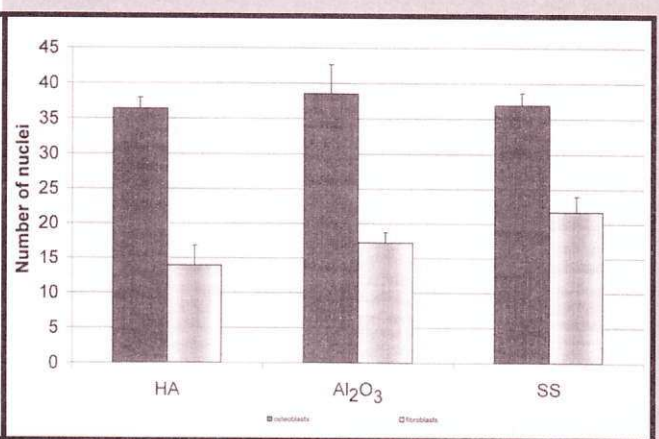
The highest number of fibroblast nuclei was noted on surgical steel, whereas on hydroxyapatite and alumina it was similar. There were no differences between the materials in the number of osteoblasts (FIG. 2).

According to the microscopic observations, the cells were spread regularly covering almost the entire surface of the samples. Image analysis revealed that spreading of fibroblasts was the greatest on hydroxyapatite whereas on alumina and steel it was similar. Spreading of osteoblasts



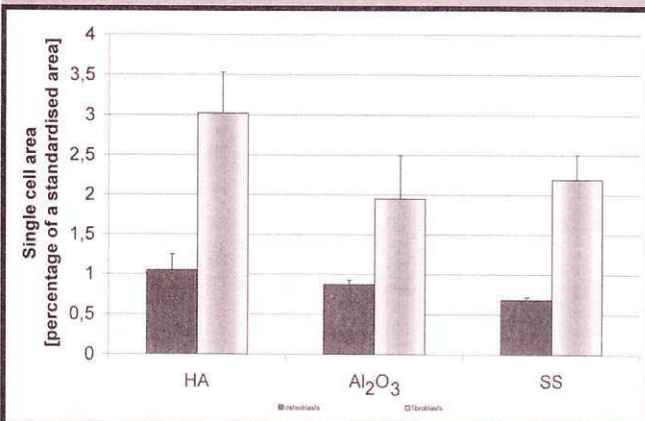
RYS.1. Wyniki testu XTT [absorbancja przy długości fali 450 nm] dla osteoblastów i fibroblastów przedstawione jako procent wartości kontroli (komórki hodowane na polistyrenie); HA - hydroksyapatyt, Al₂O₃ - tlenek glinu, SS - stal chirurgiczna.

FIG.1. XTT test results [absorbance at 450 nm] for osteoblasts and fibroblasts as percentage of control value (cells cultured on polystyrene); HA - hydroxyapatite, Al₂O₃ - alumina, SS - surgical steel.



RYS.2. Średnia liczba jąder osteoblastów i fibroblastów w pojedynczym polu widzenia na powierzchni biomateriałów; HA - hydroksyapatyt, Al₂O₃ - tlenek glinu, SS - stal chirurgiczna.

FIG.2. The average number of nuclei of osteoblasts and fibroblasts in a single standardised area on the surface of biomaterials; HA - hydroxyapatite, Al₂O₃ - alumina, SS - surgical steel.



RYS.3. Rozplaszczanie komórek zdefiniowane jako średnie pole powierzchni pojedynczego osteoblastu i fibroblastu - [procent powierzchni pola widzenia]; HA - hydroksyapatyt, Al₂O₃ - tlenek glinu, SS - stal chirurgiczna.

FIG.3. Cell spreading defined as average area of a single osteoblast and of a single fibroblast [percentage of the standardised area]; HA - hydroxyapatite, Al₂O₃ - alumina, SS - surgical steel.

lowych (RYS.1).

Największą liczbę jąder fibroblastów stwierdzono na stali, natomiast na hydroksyapatycie i na tlenku glinu liczba fibroblastów była zbliżona. Nie stwierdzono różnic pomiędzy liczbą osteoblastów na poszczególnych materiałach (RYS.2).

Na podstawie obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym stwierdzono, że komórki były równomiernie rozplaszczane i pokrywały prawie całkowicie powierzchnię próbek. Analiza obrazu dowiodła, że rozplaszczanie fibroblastów było największe na hydroksyapatycie; na tlenku glinu i na stali chirurgicznej było zbliżone. Rozplaszczanie osteoblastów było niższe na stali niż na bioceramikach; pomiędzy hydroksyapatytem a tlenkiem glinu nie stwierdzono różnic (RYS.3).

Zauważono, że rozplaszczanie fibroblastów było około dwukrotnie większe niż rozplaszczanie osteoblastów po 24h

was smaller on steel than on bioceramics but there were no differences between alumina and hydroxyapatite (FIG.3).

It was noticed that spreading of fibroblasts was about two times greater than spreading of osteoblasts after 24h (FIG.3). Observations of control wells in the light microscope also showed that fibroblasts began to spread earlier than osteoblasts.

Fibroblasts were seeded at a density by 1/3 lower than osteoblasts but the results of XTT viability test for fibroblasts were higher than for osteoblasts. This might result from differences in proliferation rate and could indicate that the number of fibroblasts increased faster during the experiment so that after 24h it was markedly higher than that of osteoblasts. On the other hand, the number of osteoblasts counted after Hoechst staining was approximately two times higher than that of fibroblasts. Thus, lower number of cells showed higher viability in XTT test. This means that the results of viability test were not correlated with the number of cells.

Differences in spreading of osteoblasts on various materials were not accompanied by changes in cell number estimated by counting of the nuclei (FIGS.2,3). Osteoblast spreading was smaller on steel than on hydroxyapatite and alumina whereas the number of cells was similar on all the materials tested.

In the case of fibroblasts the lowest number of cells on hydroxyapatite coincided with the greatest spreading of cells on this material after 24h. Fibroblast spreading on steel and on alumina was similar, whereas the numbers of cells on these materials were different.

Comparison of the results of XTT test and image analysis revealed that in the osteoblast culture the influence of hydroxyapatite, alumina and surgical steel surfaces on spreading and viability, measured by means of XTT, was similar (FIGS.1,3). However, in the case of fibroblasts there was no correlation of XTT results and cell spreading on alumina and steel samples.

Hydroxyapatite appeared to be the best environment for cell spreading in vitro compared with alumina and surgical steel. This is consistent with clinical data on tissue reaction with these materials.

eksperymentu (RYS.3). Ponadto, obserwacje komórek w studzienkach kontrolnych w mikroskopie świetlnym wykazały, że fibroblasty zaczęły rozplaszczanie wcześniej niż osteoblasty.

Pomimo, że fibroblasty wysiano w gęstości o 1/3 mniejszej niż osteoblasty, wynik testu żywotności XTT był wyższy w hodowli fibroblastów niż osteoblastów. Może to wynikać z różnic w tempie proliferacji i mogłoby oznaczać, że liczba fibroblastów wzrosła bardziej w czasie trwania doświadczenia i po 24h była wyższa niż liczba osteoblastów. Z drugiej strony, obliczenia wykonane po zabarwieniu jąder komórkowych (Hoechst) wykazały, że liczba osteoblastów była w przybliżeniu dwukrotnie wyższa niż liczba fibroblastów. Zatem mniejsza liczba komórek wykazała większą żywotność w teście XTT. Oznacza to, że wyniki testu żywotności nie były skorelowane z liczbą komórek.

Różnicom w rozplaszczeniu osteoblastów na poszczególnych materiałach nie towarzyszyły zmiany liczby komórek, określonej przez policzenie jąder komórkowych (RYS.2,3). Rozplaszczanie osteoblastów było niższe na stali niż na hydroksyapatycie i tlenku glinu podczas, gdy liczba osteoblastów na wszystkich materiałach była zbliżona. W przypadku fibroblastów najniższej liczbie komórek na hydroksyapatycie towarzyszyło największe rozplaszczanie komórek na tym materiale po 24h. Rozplaszczanie fibroblastów na stali i na tlenku glinu było zbliżone, natomiast wystąpiły różnice w liczbie komórek na tych materiałach.

Porównanie wyników testu XTT i analizy obrazu wykazało, że w hodowli osteoblastów wpływ podłoża na rozplaszczanie i żywotność określoną w teście XTT jest podobny (RYS.1,3). Natomiast w przypadku fibroblastów stwierdzono brak korelacji rozplaszczania komórek i wyników testu XTT na próbkach tlenku glinu i stali.

Hydroksyapatyt okazał się najlepszym podłożem do rozplaszczania komórek in vitro w porównaniu z tlenkiem glinu i stalą chirurgiczną. Jest to zgodne z klinicznymi obserwacjami oddziaływania tkanek z tymi materiałami.

Rozplaszczanie fibroblastów przylegających do powierzchni różnych biomateriałów jest większe niż rozplaszczanie osteoblastów.

Żywotność oznaczona za pomocą testu XTT nie koreluje z liczbą komórek na poszczególnych materiałach, dlatego nie można uznać tych dwóch testów za równoważne.

Żadna z powyższych metod stosowana osobno nie daje wystarczających informacji o interakcji pomiędzy komórkami a biomateriałami. Jednakże metody te mogą być wartościowe, gdy będą stanowiły część zestawu testów do badania biogodności in vitro.

Podziękowania

Niniejsza praca była finansowana przez Komitet Badań Naukowych (grant nr 4.PO5A.065.11)

Spreading of fibroblasts adhering to the surfaces of different biomaterials is greater than that of osteoblasts.

Viability measured by means of XTT test does not correspond with the number of cells counted on each material so these two tests cannot be considered equivalent.

Neither of the above methods when applied separately provides enough information on interactions between cells and biomaterials, however both may be useful in complex biocompatibility testing in vitro.

Acknowledgements

This work was supported by the State Committee for Scientific Research (grant no. 4.PO5A.065.11).

Piśmiennictwo

References

- [1] Ozawa S., Kasugai S.: Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials*, 17, (1996), 23-29.
- [2] Hunt J.A., McLaughlin P.J., Flanagan B.F.: Techniques to investigate cellular and molecular interactions in the host response to implanted biomaterials. *Biomaterials*, 18, (1997), 1449-1459.
- [3] Sidqui M., Collin P., Vitte C., Forest N.: Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclast on calcium sulphate hemihydrate. *Biomaterials*, 16, (1995), 1327-1332.
- [4] Clover J., Gowen M.: Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone*, 15, 6 (1994), 585-591.
- [5] Oliva A., Della Ragione F., Salerno A., Riccio V., et al Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials*, 17, (1996), 1351-1356.
- [6] Bordji K., Jouzeau J.Y., Mainard D., et al: Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials*, 17, (1996), 929-940.
- [7] Boyan B.D., Batzer R., Kiesswetter K., et al: Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. *J.Biomed.Mater.Res.*, 39, (1998), 77-85.
- [8] Yamato M., Okuhara M., Karikusa F., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T.: Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a temperature-responsive polymer. *J.Biomed.Mater.Res.*, 44, (1999), 44-52.
- [9] Okamoto K., Matsuura T., Hosokawa R., Akagawa Y.: RGD peptides regulate the specific adhesion scheme of osteoblasts to hydroxyapatite but not to titanium. *J.Dent.Res.*, 77(3), (1998), 481-487.
- [10] van Kooten T.G., Klein C.L., Wagner M., Kirkpatrick C.J.: Focal adhesions and assessment of cytotoxicity. *J.Biomed.Mater.Res.*, 46, (1999), 33-43.
- [11] Walboomers X.F., Monaghan W., Curtis A.S.G., Jansen J.A.: Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. *J.Biomed.Mater.Res.*, 46, (1999), 212-220.
- [12] Gallagher J.A., Gundle R., Beresford J.N.: Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblasts) from human bone. *Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols*. Ed. by G.E. Jones, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996.
- [13] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Tierney S., 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.*, 48, (1988), 4827-4833.
- [14] Acarturk T.O., Peel M.M., Petrosko P., et al: Control of cell attachment, morphology, and proliferation of skeletal myoblasts on silanized glass. *J.Biomed.Mater.Res.*, 44, (1999), 355-370.