

BADANIA BIOAKTYWNOŚCI I CYTOTOKSYCZNOŚCI IN VITRO BIOSZKIEŁ Z UKŁADU SiO_2 -CaO WYTWORZONYCH METODĄ ZOL-ŻEL Z ZASTOSOWANIEM SILANÓW

LIDIA CIOŁEK^{1*}, JOANNA KARAS¹, ANDRZEJ OLSZYNA¹, EWA ZACZYŃSKA², ANNA CZARNY², BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA³

¹ INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH, UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA

² INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ, POLSKA AKADEMIA NAUK,

UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCŁAW

³ AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU, UL. PASTEURA 1, 50-361 WROCŁAW

* E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

Streszczenie

Celem badań była ocena bioaktywności i cytotoxyczności in vitro bioszkieł o składzie chemicznym SiO_2 70% mas. i CaO 30% mas., wytworzonych metodą zol-żel. Podczas syntezy do wprowadzenia SiO_2 zastosowano TEOS lub jego mieszaniny z winylo(trimetoksy)silanem (VS) lub trimetoksy-silometakrylanem propylowym (MPS). Bioaktywność oceniono z zastosowaniem SEM przez analizę obrazów morfologii powierzchni bioszkieł po kontakcie z roztworem symulującym osocze (SBF). Natomiast ocenę działania cytotoxycznego wykonano metodą bezpośrednią i pośrednią zgodnie z PN-EN 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoxyczności: metody in vitro” po kontakcie z komórkami fibroblastopodobnymi L929. Wyniki przeprowadzonych badań bioaktywności pozwalają stwierdzić, że otrzymane bioszkieła są bioaktywne w kontakcie z roztworem SBF, na co wskazuje obecność na powierzchni bioszkieł sferycznych struktur typowych dla morfologii apatyty. Natomiast wyniki cytotoxyczności in vitro wykonane metodą pośrednią dla wszystkich wytworzonych bioszkieł wskazują na brak efektu toksycznego na komórki L929.

Słowa kluczowe: bioszkieło, metoda zol-żel, bioaktywność, cytotoxyczność

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 21-26]

Wprowadzenie

Bioaktywne szkła i materiały szkło-ceramiczne stosowane są w chirurgii do wypełniania ubytków kostnych [1,2]. Dzięki reakcjom fizykochemicznym zachodzącym na powierzchni bioaktywnego materiału [3], powstaje warstwa hydroksyapatytu węglanowego o składzie chemicznym bliskim naturalnej kości. Warstwa tego hydroksyapatytu zapewnia silne wiązanie z żywymi tkankami, zarówno z tkanką kostną jak i tkankami miękkimi, co zapobiega powstawaniu warstwy tkanki włóknistej i izolacji wszczepionego materiału. Uważa się, że zastosowanie niektórych silanów jako reagentów do syntezy bioszkieł metodą zol-żel, może zwiększać bioaktywność otrzymanego biomateriału [4].

STUDY ON BIOACTIVITY AND IN VITRO CYTOTOXICITY OF BIOGLASSES FROM THE SiO_2 -CaO SYSTEM OBTAINED BY THE SOL-GEL METHOD USING SILANES

LIDIA CIOŁEK^{1*}, JOANNA KARAS¹, ANDRZEJ OLSZYNA¹, EWA ZACZYŃSKA², ANNA CZARNY², BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA³

¹ INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS, 9 POSTĘPU STR., 02-676 WARSZAWA, POLAND

² INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES,

12 RUDOLFA WEIGLA STR., 53-114 WROCŁAW, POLAND

³ WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY,

1 PASTEUR STR., 50-361 WROCŁAW, POLAND

* E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

Abstract

The aim of this study was to evaluate the bioactivity and in vitro cytotoxicity of bioglass with chemical composition 70 wt% SiO_2 and 30 wt% CaO obtained by the sol-gel method. During the synthesis TEOS or mixture thereof with vinyltriethoxysilane (VS) or (trimethoxysilyl)propyl methacrylate (MPS) were used to introduce SiO_2 content. Bioactivity was assessed by SEM observations of bioglass surface morphology after contact with a simulated body fluid (SBF). The evaluation of cytotoxicity was performed according to PN-EN 10993-5 “Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods” after contact with fibroblast like cells L929. Results of the study of bioactivity allow to conclude that the obtained bioglasses are bioactive in contact with SBF solution, as indicated by the presence on the surface of spherical structures typical for morphology of the apatite. Moreover the results of indirect method in vitro cytotoxicity tests involving all produced bioglasses revealed no toxic effect on L929 cells.

Keywords: bioglass, sol-gel method, bioactivity, cytotoxicity

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 21-26]

Introduction

Bioactive glasses and glass-ceramic materials are used in surgery for filling bone defects [1,2]. Due to physical and chemical reactions occurring on the surface of bioactive material [3], a carbonate hydroxyapatite layer is formed, having chemical composition similar to natural bone. The layer of this hydroxyapatite provides a strong bond with living tissues, bone as well as soft tissue. This bonding prevents the formation of fibrous tissue and isolation of the implanted material. It is believed that the use of certain silanes as reagents for the synthesis of bioglasses according to the sol-gel method, can increase the bioactivity of the resulting biomaterial [4].

Celem przeprowadzonych badań było określenie bioaktywności i cytotoksyczności bioszkieł z układu $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. Bioaktywność oceniono z zastosowaniem SEM, przez analizę obrazów morfologii powierzchni po kontakcie z roztworem symulującym osocze (SBF). Natomiast ocenę działania cytotoksycznego wykonano zgodnie z PN-EN 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności: metody in vitro” po kontakcie z komórkami fibroblastopodobnymi L929.

Materiały i metody badań

Bioszko o symbolu P-0 zawierające 70% mas. SiO_2 i 30% mas. CaO , stanowiące materiał odniesienia wytworzono używając jako zasadniczych substratów tetraetoksylan (TEOS) i azotan wapnia czterowodny. Natomiast w bioszkiełach P0-VS i P0-MPS, posiadających analogiczny skład jak P-0, wprowadzono 5% mas. SiO_2 innymi silanami. W przypadku bioszkieła P0-VS zastosowano winylo(trimetoksy)silan (VS), a przypadku P0-MPS inny silan, a mianowicie trimetoksy-sililometakrylan propylowy (MPS). Proces wytworzenia bioszkieł metodą zol-żel przeprowadzono uwzględniając metodykę [5].

Po obróbce termicznej żelu w 600°C przez 6 h uzyskano gruboziarniste proszki, które rozdrobniono następnie w młynku mechanicznym do drobnoziarnistych proszków.

Dla określenia bioaktywności in vitro wytworzonych bioszkieł przeprowadzono ocenę oddziaływania z roztworem symulującym płyn fizjologiczny (SBF). Z otrzymanych proszków uformowano pastylki o wymiarach $\phi = 7$ mm i $h = 2$ mm przy użyciu prasy hydraulicznej PYTE, stosując prasowanie osiowe o nacisku 5 kN. Następnie w szczelnie zamykanych naczyniach zawierających 65 ml roztworu SBF umieszczono po 5 pastylek każdego rodzaju bioszkieła. Inkubację bioszkieł w SBF prowadzono przez 28 dni w 37°C . Próbkę do badań pobierano po 7 i 28 dniach, przemywano wodą destylowaną i suszono. Morfologię powierzchni tak otrzymanych bioszkieł przed i po kontakcie z SBF badano z użyciem wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego Nova NanoSEM 200 firmy FEI. Pomiarów ramanowskie zostały wykonane za pomocą spektrometru Nicolet 6700 z modułem NXR FT - Raman Module.

Badanie działania cytotoksycznego wykonano metodą bezpośredniego kontaktu przy stężeniu bioszkieł w postaci proszków 0,25 mg/ml oraz metodą pośrednią czyli poprzez badanie eluatów tych materiałów z jednowarstwową hodowlą komórek fibroblastopodobnych L929. Parametrami do oceny stopnia cytotoksyczności była morfologia komórek oraz ich żywotność. W teście na wyciągach oceniano zmiany morfologiczne komórek wywołane przez wyekstrahowane substancje z badanych biomateriałów.

Komórki otrzymano z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy, a hodowlę prowadzono w płynie Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej przez 30 min w 56°C surowicy cielęcej oraz 100 U/ml penicyliny, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy, w 37°C w atmosferze 5% CO_2 . Komórki przeszczepiano stosując roztwór 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

W badaniu z bezpośrednim kontaktem komórek z bioszkiełami na płytce 24-dółkowej firmy Costar zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości $1 \times 10^5/\text{ml}$ i inkubowano 24 h w 37°C , w atmosferze 5% CO_2 . Po tym czasie płyn z nadkomórek usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek zalano płynem hodowlanym w ilości 1 ml z dodatkiem 2% surowicy cielęcej. Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów i inkubowano przez 24 h oraz 48 h w 37°C i atmosferze 5% CO_2 .

The aim of this study was to determine the bioactivity and cytotoxicity of bioglasses from the $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ system. Bioactivity was assessed using SEM, through analysis of surface morphology after contact with a simulated body fluid (SBF). On the other hand the assessment of cytotoxicity was performed according to PN-EN 10993-5 "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods" after contact with fibroblast like cells L929.

Materials and Methods

Bioglass P-0 containing 70 wt% SiO_2 and 30 wt% CaO being a reference material was produced using as basic substrates tetraethoxysilane (TEOS) and calcium nitrate tetrahydrate. Bioglasses P0-VS and P0-MPS with the same composition as P-0 were obtained introducing 5 wt% of SiO_2 content by other silanes. In the case of bioglass P0-VS vinyltriethoxysilane was used, and in the case of P0-MPS different silane, namely (trimetoxysilyl)propyl methacrylate. The process of preparing bioglasses by sol-gel method was carried out respecting the earlier reports [5].

After heat treatment of gels at 600°C for 6 h coarse powders were obtained, which were ground in a mechanical mortar, in order to obtain fine powders.

To determine in vitro bioactivity of produced bioglasses, an impact assessment was carried out with a solution of simulated body fluid (SBF). From the obtained powders, $\phi = 7$ mm and $h = 2$ mm pellets were formed using a hydraulic press PYTE, applying axial pressure 5 kN. Then, in a tightly closed vessel containing 65 ml of SBF solution was placed, five pellets of each type bioglass. Immersion of bioglasses in SBF was carried out for 28 days at 37°C . Test specimens were taken after 7 and 28 days, washed with distilled water and dried. The surface morphology of bioglasses obtained in such a way before and after contact with SBF were tested in scanning electron microscope NanoSEM 200 made by FEI. Raman measurements were performed using a Nicolet 6700 spectrometer with NXR FT - Raman Module.

The cytotoxicity test was performed by direct contact with concentration of bioglass powders of 0.25 mg/ml and by indirect method testing of extracts of these materials with monolayer growing of fibroblast like cells L929. Parameters to assess the degree of cytotoxicity were morphology and cell viability. In the indirect test method, cell morphological changes induced by extracted substances from tested biomaterials were evaluated.

Cells were obtained from subcutaneous fat of a mouse, and breeding was carried out in Eagle's liquid supplemented with 10% inactivated for 30 min at 56°C calf serum and 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin and 2 mM/ml L-glutamine, at 37°C in 5% CO_2 . Cells were transplanted using a solution of 0.05% trypsin with 0.02 % EDTA in PBS, pH 7.2.

In the test utilising direct contact of cells with bioglasses on the 24-well Costar plate, an L929 cell culture was established, with density of $1 \times 10^5/\text{ml}$, which was incubated for 24 h at 37°C in 5% CO_2 . After this time, the fluid above the cells was removed, and the cell monolayer was covered with 1 ml of liquid culture with 2% calf serum. On the cell culture prepared in this manner, samples of the tested materials were placed and incubated for 24 h and 48 h at 37°C in 5% CO_2 .

Żywotność komórek oceniano metodą barwienia błękitem trypanu. W tym celu zawieszinę komórek L929 i badanego materiału pobierano w ilości 100 μl do probówki Eppendorf, następnie dodawano 100 μl 0,4% błękitu trypanu i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie kroplę płynu наносzono na kamerę Burkera i pod mikroskopem świetlnym zliczano liczbę żywych komórek. Komórki martwe wybarwiły się na granatowo, co jest spowodowane wnikaniem barwnika do wnętrza komórki poprzez uszkodzoną błonę komórkową. Żywe komórki L929 pozostały niezabarwione.

W metodzie pośredniej do przygotowania wyciągów użyto bioszkieł w postaci proszku, które zalano płynem hodowlanym Eagle'a bez surowicy cielęcej (0%), a z dodatkiem 100 U/ml penicyliny, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy. Tak przygotowane próby o stężeniu 1,0 mg badanych bioszkieł na 1,0 ml płynu inkubowano przez 24 godziny w 37°C w atmosferze 5% CO_2 . Po tym czasie wyciągi zebrano do jałowych probówek i wykonano badanie cytotoksyczności.

Na płytce 24-dobkowej zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości $1 \times 10^5/\text{ml}$ i inkubowano 24 h w 37°C, w atmosferze 5% CO_2 . Po tym czasie płyn nad komórek usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek L929 zalano po 1000 μl płynem nad zawiesziny proszków i inkubowano przez 24 h w 37°C i atmosferze 5% CO_2 . Dalsze postępowanie jak wyżej opisano przy ocenie żywotności komórek.

Ocenę każdego biomateriału wykonano w trzech powtórzeniach i przedstawiono reprezentatywne wyniki badań.

Wyniki i dyskusja

Na powierzchni wszystkich badanych bioszkieł po zanurzeniu w SBF po 7 dniach (RYS. 1) jak i po 28 dniach obserwowano sferyczne struktury, które według doniesień literaturowych [5] są typowe dla morfologii apatytu uzyskiwanego w sposób biomimetyczny, a których obecności nie stwierdza się na powierzchni bioszkieł przed inkubacją w SBF.

Wyniki analizy FTIR powierzchni bioszkieł przed kontaktem z SBF oraz po 28 dniach inkubacji (RYS. 2 i 3) potwierdzają obecność hydroksyapatytu na powierzchni bioszkieł inkubowanych w SBF. W widmach próbek P0-MPS-SBF oraz P0-VS-SBF widoczne jest pasmo przy 960 cm^{-1} charakterystyczne dla hydroksyapatytu (HA), które przypisuje się symetrycznym drganiom rozciągającym grupy PO_4^{3-} [6,7]. W widmach tych próbek występują także słabe pasma przy 430 cm^{-1} pochodzące od drgań zginających PO_4^{3-} . To świadczy o tym, że na próbkach P0-VS-SBF i P0-MPS-SBF pojawiły się struktury hydroksyapatytu po kontakcie z roztworem SBF. Pasm charakterystycznych dla hydroksyapatytu nie ma w widmach próbek P0-VS i P0-MPS. Intensywność drgań charakterystycznych jest większa w przypadku próbki P0-MPS-SBF co wskazuje na większą ilość hydroksyapatytu na powierzchni próbki z dodatkiem MPS.

Wyniki badań in vitro cytotoksyczności wg kryteriów normy ISO 10993-5 wykonanych metodą bezpośrednią dla stężenia 0,25 mg/ml po 24 h i 48 h inkubacji (TABELA 1) wskazują na nieznaczną cytotoksyczność bioszkieł P0-MPS i P0-VS oraz łagodną bioszkieła P-0. Natomiast wyniki uzyskane z badań metodą pośrednią (TABELA 2) wskazują na brak efektu cytotoksycznego. Bioszkieło P0-MPS, w którym zastosowano trimetoksylilometakrylan propylowy wykazało niższy udział martwych komórek w hodowli w porównaniu do bioszkieła P0-VS, do którego wytworzenia użyto winylotriethoxysilanu. Najwyższy udział martwych komórek po 24 h i 48 h kontaktu zanotowano dla bioszkieła P-0, odpowiednio 2% i 5%.

Cell viability was assessed by trypan blue staining. For this purpose, suspension of L929 cells and the tested material was collected in quantity of 100 μl to Eppendorf tubes, then 100 μl of 0.4% trypan blue was added and incubated for 15 min. at room temperature. After this time, a drop of the liquid was applied on Burkera camera under a light microscope and the number of living cells was counted. Dead cells changed colour to navy, which is caused by the penetration of the dye into the cell through the damaged cell membrane. Viable L929 cells remained not colouring.

In the case of the indirect method obtained bioglasses in powder form were covered with Eagle culture medium without calf serum (0%), with the addition of 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 2 mM/ml L-glutamine. The samples prepared in this manner, with concentration of 1 mg of the tested bioglasses per 1 ml of fluid were incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO_2 . After this time the extracts were collected into sterile tubes and cytotoxicity was tested.

Using a 24-well plate an L929 cell culture was established, with density of $1 \times 10^5/\text{ml}$, and was incubated for 24 h at 37°C in 5% CO_2 . After this time the fluid was removed from above the cells, and the L929 cell monolayer was covered with 1000 μl liquid from above the powder suspension and incubated for 24 h at 37°C in 5% CO_2 . Further treatment as described above in the assessment of cell viability.

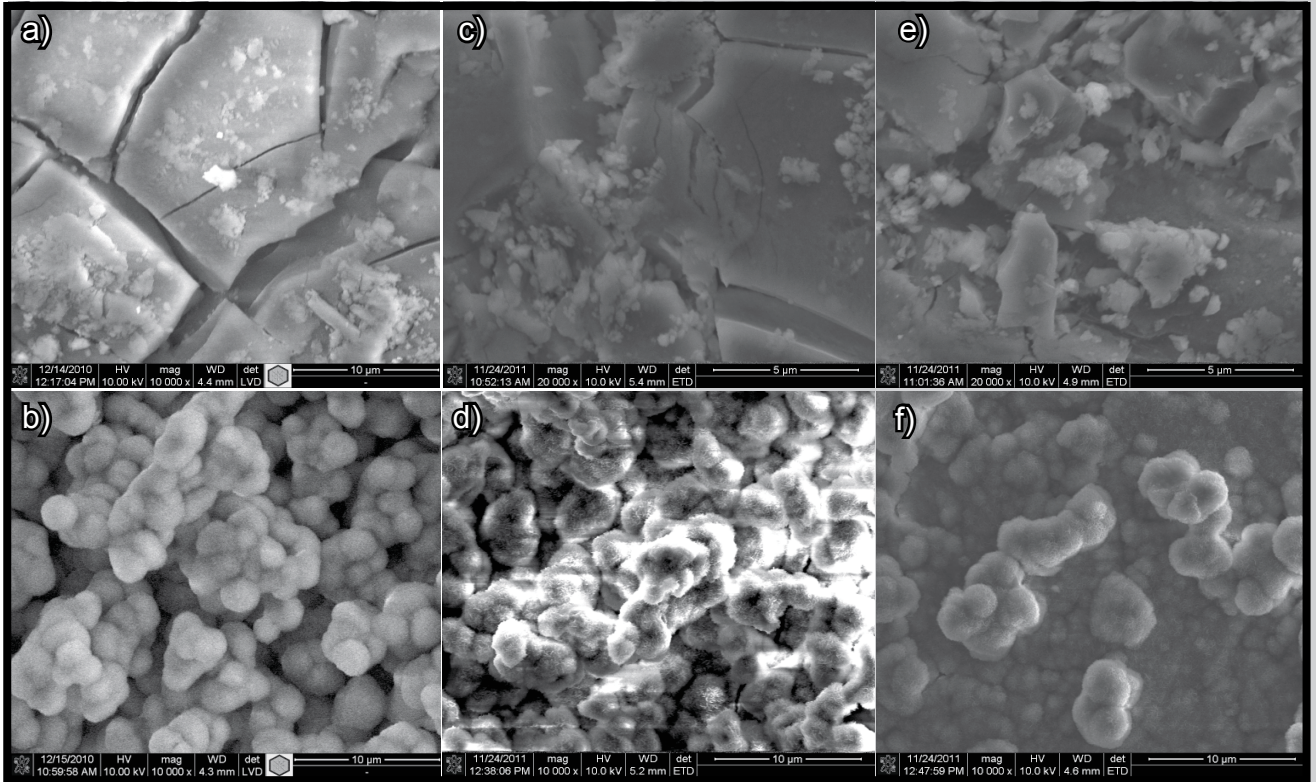
The assessment of each biomaterial was performed using three replicates and representative results were demonstrated.

Results and Discussions

On the surface of all tested bioglasses after immersion in SBF for 7 days (FIG. 1) and 28 days spherical structures were observed, which according to information presented in the literature [5] are typical of the morphology of the apatite obtained in a biomimetic manner, and whose presence was not found on the surface of bioglasses before contact with SBF.

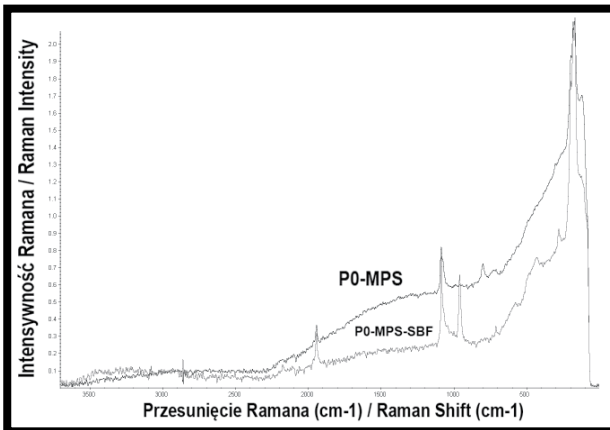
Results of FTIR analysis of the surface of bioglasses before contact with SBF and after 28 days of incubation (FIG. 2 and 3) confirm the presence of hydroxyapatite on the surfaces of bioglasses incubated in SBF. In the spectra of samples P0-MPS-SBF and P0-VS-SBF the band at 960 cm^{-1} characteristic for hydroxyapatite (HA) is visible, which is attributed to the symmetric stretching vibrations of the PO_4^{3-} group [6,7]. In the spectra of these samples also weak bands at 430 cm^{-1} originating from the bending vibration of PO_4^{3-} could be visible. This indicates that structure of hydroxyapatite appeared after contact of samples P0-VS-SBF and P0-MPS-SBF with SBF solution. Bands characteristic of hydroxyapatite are not in the spectra of samples P0-VS and P0-MPS. The intensity of the characteristic oscillation is higher in the case of sample P0-MPS-SBF indicating a greater amount of hydroxyapatite on the surface of sample with MPS addition.

The results of the in vitro cytotoxicity tests according to the criteria of ISO 10993-5 performed according to the direct method with concentration of 0.25 mg/ml after 24 h and 48 h of incubation (TABLE 1) indicate a slight cytotoxicity of P0-MPS and P0-VS bioglasses and mild cytotoxicity of P-0. However, the results obtained from tests utilising the indirect method (TABLE 2) indicate no cytotoxic effect. Bioglass P0-MPS in which (trimetoxysilyl)propyl methacrylate was introduced demonstrated a lower share of dead cells in the culture, compared to bioglass P0-VS, which was produced using vinyltriethoxysilane. The highest share of dead cells after 24 h and 48 h of contact was recorded for bioglass P0 - 2% and 5%, respectively.



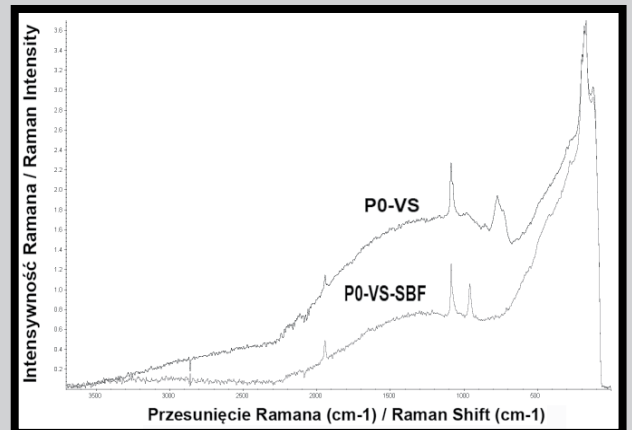
RYS. 1. Bioszklá przed zanurzeniem w roztworze SBF i po 7 dniach inkubacji: a) P-0 przed kontaktem z SBF, b) P-0 po 7 dniach zanurzenia w SBF, c) P0-MPS przed kontaktem z SBF, d) P0-MPS po 7 dniach zanurzenia w SBF, e) P0-VS przed kontaktem z SBF, f) P0-VS po 7 dniach zanurzenia w SBF.

FIG. 1. Bioglasses before immersion in SBF solution, and after 7 days of immersion: a) P-0 before contact with SBF, b) P-0 after 7 days of immersion in SBF, c) P0-MPS before contact with SBF, d) P0-MPS after 7 days of immersion in SBF, e) P0-VS before contact with SBF, f) P0-VS after 7 days of immersion in SBF.



RYS. 2. Wyniki FTIR próbki P0-MPS przed zanurzeniem w SBF i próbki P0-MPS-SBF po kontakcie z SBF przez 28 dni.

FIG. 2. FTIR results of P0-MPS sample before immersion in SBF and P0-MPS-SBF sample after contact with SBF during 28 days.



RYS. 3. Wyniki FTIR próbki P0-VS przed zanurzeniem w SBF i próbki P0-VS-SBF po kontakcie z SBF przez 28 dni.

FIG. 3. FTIR results of P0-VS sample before immersion in SBF and P0-VS-SBF sample after contact with SBF during 28 days.

TABELA 1. Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w bezpośrednim kontakcie z bioszklami.

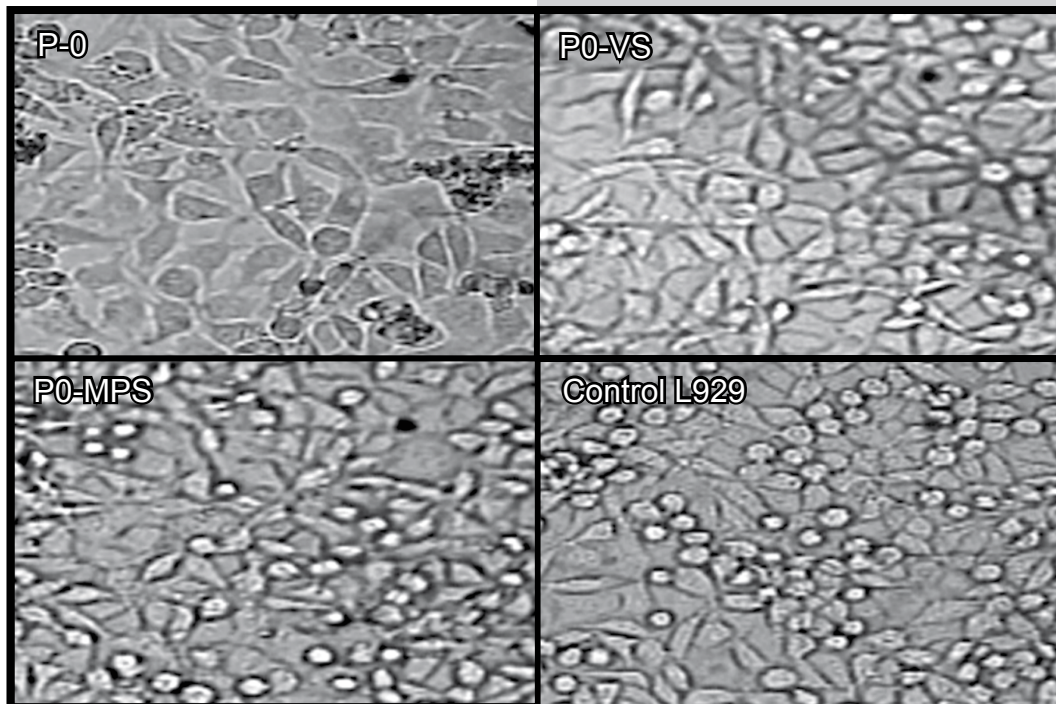
TABLE 1. Cytotoxic changes in culture of L929 fibroblast cells in direct contact with bioglasses.

Czas zanurzenia Immersion time [h]	Symbol materiału Symbol of material	Liczba lub udział procentowy komórek Number or percentage share of cells			Stopień toksyczności Extent of toxicity
		Martwe / Dead [%]	Żywe / Viable [%]	Ogółem / Total [CFU/ml]	
24	P-0	50	50	7.6×10^4	2
	P0-VS	14	86	2.3×10^5	1
	P0-MPS	20	80	1.2×10^5	1
	Kontrola L929 Control culture L929	2	98	5.5×10^5	0
48	P-0	46	54	1.2×10^5	2
	P0-VS	18	82	3.6×10^5	1
	P0-MPS	18	82	1.4×10^5	1
	Kontrola L929 Control culture L929	1	99	7.5×10^5	0

TABELA 2. Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w kontakcie z wyciągami badanych bioszkieł.

TABLE 2. Cytotoxic changes in culture of L929 fibroblast cells in contact with extracts of the tested bioglasses.

Czas zanurzenia Immersion time [h]	Symbol materiału Symbol of material	Liczba lub udział procentowy komórek Number or percentage share of cells			Stopień toksyczności Extent of toxicity
		Martwe / Dead [%]	Żywe / Viable [%]	Ogółem / Total [CFU/ml]	
24	P-0	2	98	5.6×10^5	0
	P0-VS	1	99	7.5×10^5	0
	P0-MPS	0	100	6.9×10^5	0
	Kontrola L929 Control culture L929	0	100	7.9×10^5	0
48	P-0	5	95	5.9×10^5	0
	P0-VS	1	99	8.3×10^5	0
	P0-MPS	0	100	7.8×10^5	0
	Kontrola L929 Control culture L929	0	100	8.7×10^5	0



RYS. 4. Obrazy hodowli komórek L929 w kontakcie z wyciągami badanych bioszkieł po 48 h inkubacji.

FIG. 4. Images of cultures of L929 cells in contact with extracts of the tested bioglasses after 48 h of incubation.

Obrazy hodowli w kontakcie z wyciągami badanych bioszkieł po 48 h inkubacji (RYS. 4) przedstawiają komórki L929 o wrzecionowatym kształcie, przylegające do podłoża w równomiernej, jednolitej warstwie. Komórki są rozplaszczane, co świadczy o korzystnym oddziaływaniu badanych bioszkieł.

Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań bioaktywności i cytotoksyczności in vitro bioszkieł z układu $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ pozwalają stwierdzić, że:

1. Otrzymane bioszkieła są bioaktywne w kontakcie z roztworem SBF, na co wskazuje obecność na powierzchni bioszkieł sferycznych struktur typowych dla morfologii apatytu.

2. Wyniki FTIR potwierdzają obecność hydroksyapatytu na powierzchni bioszkieł po kontakcie z SBF i wskazują na wyższy udział HA w próbce z dodatkiem MPS.

3. Wyniki badań in vitro cytotoksyczności metodą bezpośrednią, mimo nieznacznej cytotoksyczności P0-MPS i P0-VS oraz łagodnej P-0, potwierdzają zdolność komórek L929 do proliferacji w kontakcie z wytworzonymi bioszkiełami.

4. Badania in vitro cytotoksyczności metodą pośrednią wszystkich wytworzonych bioszkieł pozwoliły stwierdzić brak efektu toksycznego wyekstrahowanych substancji na komórki L929.

Podziękowania

Praca nr 02/I/007/11 realizowana w roku 2011 i finansowana ze środków statutowych ICiMB.

Images of cultures in contact with extracts of the obtained bioglasses after 48 h of incubation (FIG. 4) show L929 cells being spindle-shaped, adhering to the substrate in an even and uniform layer. The cells are flattened, which indicates favourable impact of the tested bioglasses.

Conclusions

Results of the study of bioactivity and cytotoxicity in vitro of $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ system bioglasses allow to conclude that:

1. The obtained bioglasses are bioactive in contact with SBF solution, as indicated by the presence on the surface of spherical structures typical for morphology of the apatite.

2. FTIR results confirm the presence of hydroxyapatite on the surface of bioglasses after contact with SBF and show a higher content of HA in the sample with MPS addition.

3. Test results of in vitro cytotoxicity by the direct method, although showing slight cytotoxicity P0-MPS and P0-VS and mild P-0, confirm the ability of cells L929 to proliferate in contact with produced bioglasses.

4. Indirect method in vitro cytotoxicity tests involving all produced bioglasses revealed no toxic effect of extracted substances on L929 cells.

Acknowledgements

The work no. 02/I/007/11 was carried out in 2011 and financed by statutory funds of ICiMB.

Piśmiennictwo

- [1] Ravarian R., Moztaarzadeh F., Hashjin M., Solati Rabiee S.M., Khoshakhlagh P., Tahiri M.: Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International* 36 (2010) 291-297.
- [2] Fathi M. H., Mortazavi V., Doostmohammadi A.: Bioactive glass nanopowder for the treatment of oral bone defects. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Science* 4 (2007) 115-122.
- [3] Juhasz J. A., Best S. M.: bioactive ceramics: processing, structures and properties. *Journal of Materials Science* 47 (2012) 610-624.
- [4] Kim Y., Ohtsuki Ch., Kawachi G., Kamitakahara M., Cho S. B.: Preparation of bioactive microspheres of organic modified calcium silicates through sol-gel processing. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 45 (2008) 43-49.

References

- [5] Vallet-Regi M., Romero A. M., Ragel C.V., LeGeros R. Z.: XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* 44 (1999) 416-421.
- [6] Koutsopoulos S.: Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research* 62 (2002) 600-612.
- [7] Pasteris J.D., Wopenka B., Freeman J.J., Rogers K., Valsami-Jones E., Van Der Houwen J.A.M., Silva M.J.: Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25 (2004) 229-238.