
PRACE

**Instytutu Ceramiki
i Materiałów Budowlanych**

Scientific Works
of Institute of Ceramics
and Building Materials

Nr 16
(styczeń–marzec)

Prace są indeksowane w BazTech i Index Copernicus

ISSN 1899-3230

Rok VII

Warszawa–Opole 2014

LIDIA CIOŁEK*
JOANNA KARAS**
ANDRZEJ OLSZYNA***
EWA ZACZYŃSKA****
ANNA CZARNY*****

Badania właściwości fizykochemicznych i cytotoksyczności *in vitro* bioszkieł dotowanych Mg, Sr, Au

Słowa kluczowe: bioszkoło, metoda zol-żel, bioaktywność, cytotoksyczność.

W artykule przedstawiono wyniki badań wytworzonych bioszkieł w układzie CaO-SiO₂-P₂O₅ dotowanych Mg lub Sr, lub Au. W ramach przeprowadzonych badań określono morfologię otrzymanych bioszkieł, a także ich bioaktywność w warunkach *in vitro* oraz oddziaływanie cytotoksyczne na komórki L929. Ponadto, bioszkoło dotowane Au poddano badaniu przy użyciu mikroskopu transmisyjnego z analizą EDS. Stwierdzono, że wytworzone bioszkoła *in vitro* w kontakcie z symulowanym płynem fizjologicznym (SBF) są bioaktywne oraz nie oddziałują cytotoksycznie na komórki L929.

1. Wprowadzenie

Bioaktywne szkła i materiały szkło-ceramiczne stosowane są w chirurgii do wypełniania ubytków kostnych [1]. Ciągłe jednak poszukuje się nowych rozwiązań dla lepszej integracji biomateriału z tkanką kostną poprzez tworzenie apatytowej warstwy pośredniej, zapewniającej wiązanie z kością lub pełnej resorbowalności biomateriału i zastąpienia go nową tkanką kostną. Proces tworzenia warstwy apatytu, stanowiącej obszar przejściowy, inicjują uwalniane z biomateriałów

* Mgr inż., Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, l.ciolek@icimb.pl

** Mgr inż., Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, j.karas@icimb.pl

*** Prof. dr hab. inż., Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Materiałowej, aolszyna@meil.pw.edu.pl

**** Dr, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, ezacz@iitd.pan.wroc.pl

***** Dr, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, czarny@iitd.pan.wroc.pl

jony wapnia łączące się z anionami fosforanowymi obecnymi w płynie ustrojowym [2]. Obecność innych jonów w składzie biomateriału, w tym jonów fosforu, jest również korzystna.

Modyfikacja składu bioszkieł przez częściowe zastąpienie w sieci szkła jonów Ca jonami Mg lub Sr wpływa więc na wzrost reaktywności powierzchniowej bioszkieł, co podwyższa zdolność tworzenia hydroksyapatytu podczas kontaktu z płynem fizjologicznym. Obecność jonów Mg^{2+} w składzie biomateriału powoduje, że pod względem chemicznym powstająca warstwa apatytu jest podobna do apatytu biologicznego [3], a dodatkowo jony te pełnią ważną funkcję w procesach metabolicznych, stymulując produkcję blaszek kostnych. Zaś obecność w składzie biomateriału jonów strontu, działających osteoindukcyjnie, wpływa na lepszą proliferację komórek kostnych. Natomiast złoto [4] należy do grupy ultraelementów działających przeciwbakteryjnie oraz aktywuje procesy metaboliczne poprzez oddziaływanie na enzymy. Zastosowanie niektórych silanów jako reagentów do syntezy bioszkieł metodą zol-żel także może zwiększać ich bioaktywność [5]. Bioszkło z udziałem winylotrimetoksylanu (VS) [6] w testach *in vitro* wykazało mniejszy stopień toksyczności.

Z wymienionych względów podjęto badania dotyczące otrzymania zmodyfikowanych bioszkieł zawierających wybrane pierwiastki dla wytworzenia biomateriałów o podwyższonej bioaktywności, które mogłyby wspomagać przebieg procesów fizjologicznych kościotworzenia. Obecność nawet niewielkich ilości proponowanych pierwiastków powinna wpływać na aktywność enzymów związanych z działaniem komórek kostnych.

2. Materiały

Opracowano pięć składów chemicznych bioszkieł zawierających 65 % mas. SiO_2 , 5 % mas. P_2O_5 , 5 % mas. winylotrimetoksylanu (VS) oraz 23–25 % mas. CaO dotowanych Mg lub Sr, lub Au. Bioszkła wytworzono metodą zol-żel, używając jako zasadniczych substratów tetraetoksylan (TEOS), azotan wapnia czterowodny i fosforan trietylowy. Do wprowadzenia Mg i Sr użyto azotanów, zaś Au wprowadzono kwasem chlorozłotowym. Jako rozpuszczalnik zastosowano alkohol etylowy, a 2M HCl stanowił katalizator reakcji. Roztwory mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego, a następnie przetrzymywano w warunkach otoczenia. Po 20 h umieszczono roztwory w suszarce utrzymującej temperaturę 40°C, 60°C, 80°C i 120°C. Wysuszone żele złożono w tyglach alundowych i przeprowadzono wygrzewanie w piecu elektrycznym w temperaturze 600°C.

3. Metody badań

Otrzymane bioszkła poddano badaniom, których celem było określenie ich bioaktywności na podstawie zmian w obrazach mikroskopowych SEM powierzchni przed i po kontakcie z roztworem symulującym płyn fizjologiczny (SBF) oraz

cytotoksyczności. Próbkę bioszkieł dotowane złotem poddano dodatkowo badaniu przy użyciu mikroskopu transmisyjnego z analizą EDS.

Z otrzymanych proszków uformowano pastylki o wymiarach: średnica – 7 mm i wysokość – 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 bioszkieł. Inkubację bioszkieł w SBF prowadzono przez 28 dni w temperaturze 37°C. Próbkę do badań pobierano po 7 i 28 dniach, przemywano wodą destylowaną i suszono. Morfologię powierzchni otrzymanych w ten sposób bioszkieł badano przed i po kontakcie z SBF z użyciem wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego Nova NanoSEM 200 firmy FEI.

Badanie działania cytotoksycznego wytworzonych bioszkieł przeprowadzono zgodnie z PN-EN ISO 10993-5 – Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5: Badania cytotoksyczności: metody in vitro. Badania wykonano metodą bezpośredniego i pośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek L929 po 24 h, 48 h i 72 h. Zmiany ilościowe i morfologiczne komórek pod wpływem badanych bioszkieł oceniono w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu. Komórki martwe wybarwiły się na granatowo, co było spowodowane wnikaniem barwnika do wnętrza komórki poprzez uszkodzoną błonę komórkową. Żywe komórki pozostały opalizujące i niezabarwione.

Ocenę każdej próbki z udziałem bioszkieł w metodzie bezpośredniej lub jego eluatu w metodzie pośredniej wykonano w trzech powtórzeniach dla każdego materiału i przedstawiono reprezentatywne wyniki badań.

Do badań wykorzystano linię L929 komórek fibroblastopodobnych otrzymanych z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy (ATCC CCL 1). Hodowlę komórek L929 prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej przez 30 min w temperaturze 56°C surowicy cielejącej oraz 100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂. 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 płycie 24-dółkowej firmy Costar, zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości 1 x 10⁵/ml i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie płyn nad komórkami usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek zalano płynem hodowlanym w ilości 1 ml z dodatkiem 2% surowicy cielejącej. Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów i inkubowano przez 24, 48 oraz 72 h w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂. Badania przeprowadzono przy udziale bioszkieł 20 mg/ml, 10 mg/ml i 5 mg/ml.

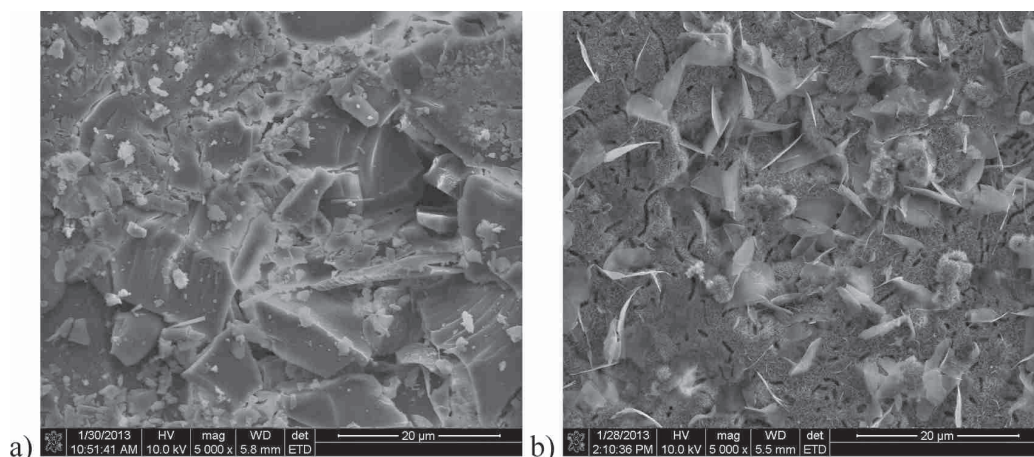
W metodzie pośredniej do przygotowania wyciągów użyto 30 mg bioszkieł w formie proszku, które zalano 6 ml płynu hodowlanego Eagle'a z surowi-

czą cielecą (2%) i dodatkiem 100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy. Tak przygotowane próbki badanych bioszkieł inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie wyciągi zebrano do jałowych probówek i wykonano badanie cytotoksyczności. Na płycie 24-dołkowej zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości 1 x 10⁵/ml i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie płyn znad komórek usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek L929 zalało się po 1000 µl płynem znad zawiesiny proszków i inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂.

4. Wyniki badań

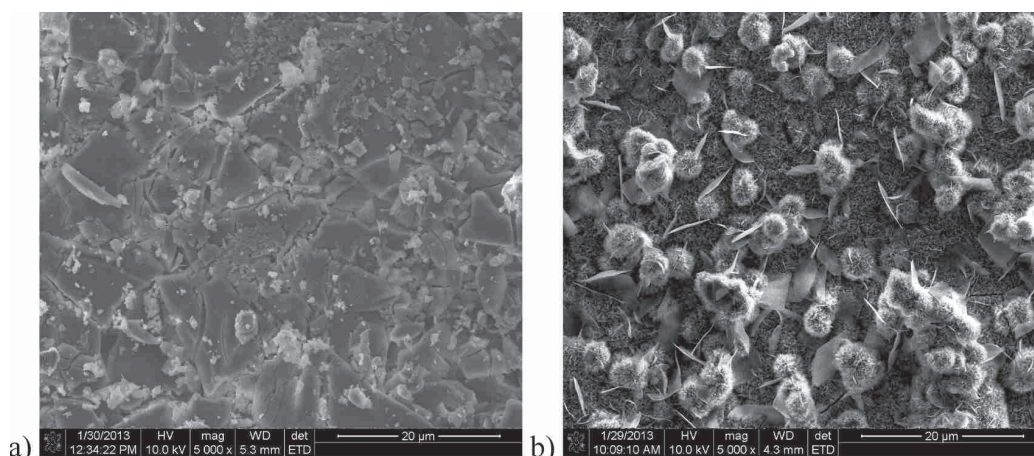
4.1. Wyniki morfologii powierzchni bioszkieł przed i po inkubacji w roztworze SBF dla oceny ich bioaktywności

Obrazy SEM bioszkieł przed zanurzeniem w SBF i po 28-dniowej inkubacji przedstawiają ryciny 1–4.



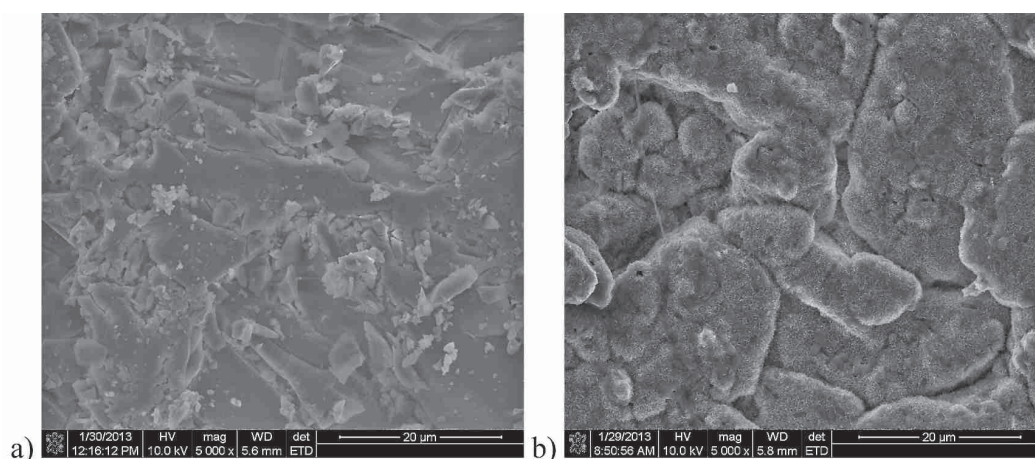
Źródło: Opracowanie własne.

Ryc. 1. Bioszkieło P5-VS: a) przed i b) po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF



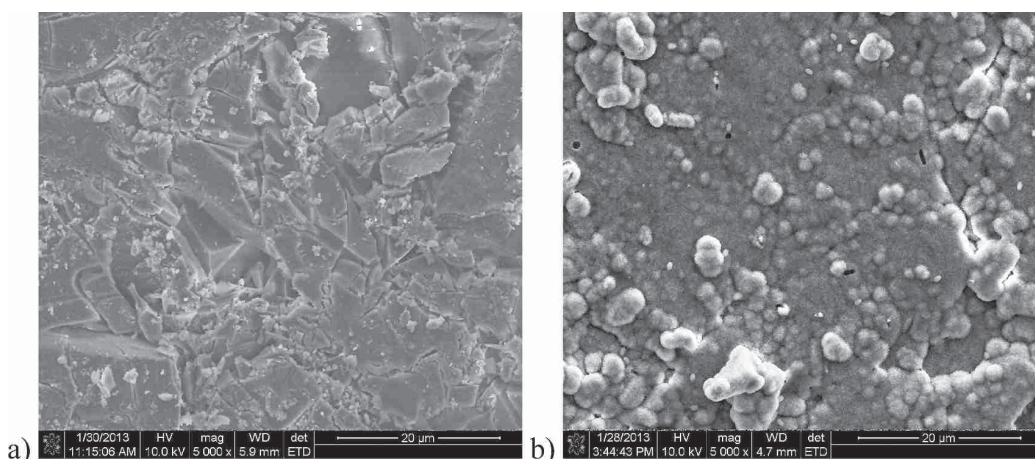
Źródło: Opracowanie własne.

Ryc. 2. Bioszkieło P5-VS-Mg: a) przed i b) po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF



Źródło: Opracowanie własne.

Ryc. 3. Bioszkoło P5-VS-Sr: a) przed i b) po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF

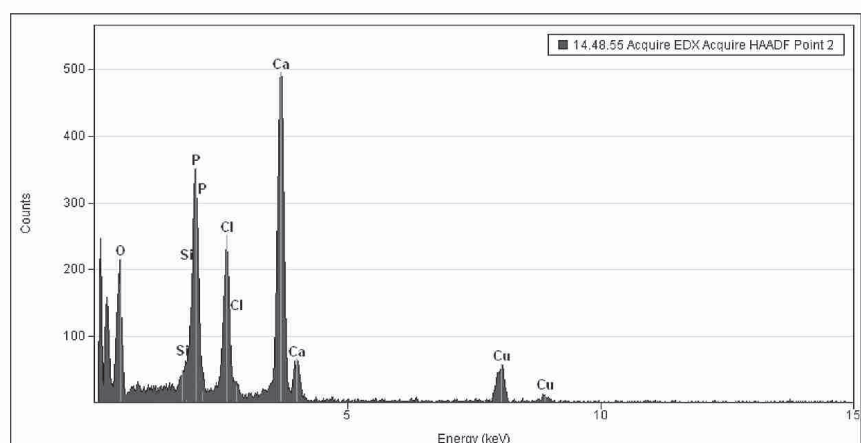
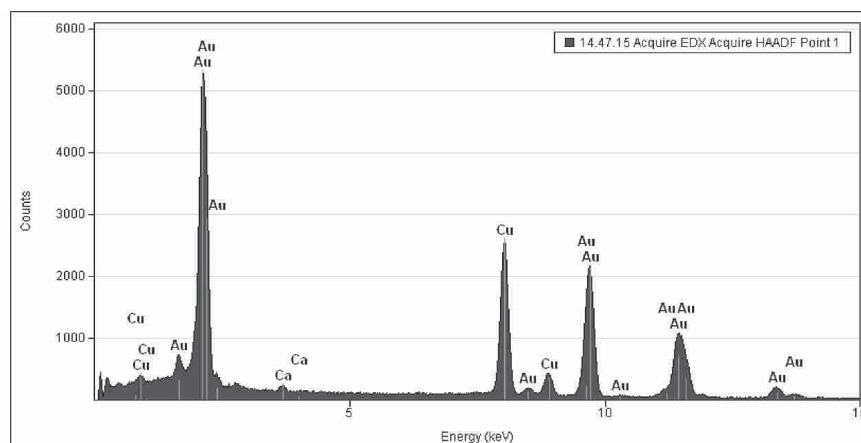
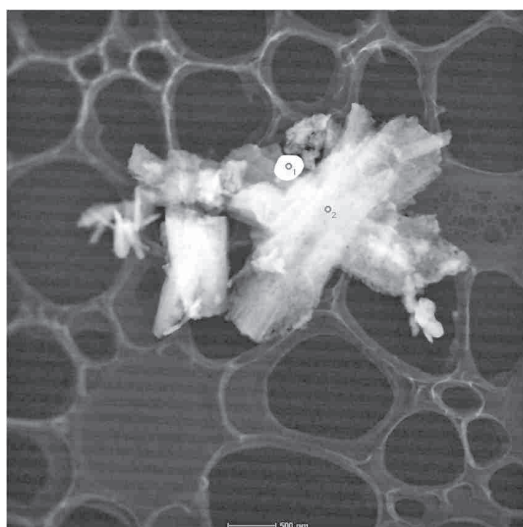


Źródło: Opracowanie własne.

Ryc. 4. Bioszkoło P5-VS-Au: a) przed i b) po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF

Po inkubacji w roztworze SBF na powierzchni wytworzonych bioszkieł tworzą się agregaty struktur typowych dla morfologii apatytu uzyskiwanego w sposób biomimetyczny. Przy czym na powierzchni próbek P5-VS i P5-VS-Mg powstał apatyt płatkowy.

4.2. Wyniki badań mikrostruktury bioszklą z udziałem Au przy użyciu mikroskopu transmisyjnego z analizą EDS



Ź r ó d ł o: Opracowanie własne.

Ryc. 5. Obraz HAADF cząstki bioszklą o symbolu P5-VS-Au oraz odpowiadające analizy EDS wykonane w zaznaczonych punktach

Wyniki otrzymane za pomocą TEM dla proszku P5-VS-Au przedstawiają bardzo drobne wydzielania (~ 10 nm) nierównomiernie rozłożone w matrycy oraz

niewielką ilość większych wydzieleni (~ 200 nm). Oba typy wydzieleni zidentyfikowano przy użyciu EDS jako Au, co przedstawia rycina 5 z odpowiadającą analizą punktową. Na obrazie HAADF mikrostruktury bioszkle P5-VS-Au widoczna jest morfologia płatkowa nośnika i regularna nanocząstek Au.

4.3. Wyniki badań cytotoksyczności *in vitro* wytworzonych bioszkieł

4.3.1. BADANIE CYTOTOKSYCZNEGO DZIAŁANIA METODĄ BEZPOŚREDNIEGO KONTAKTU

Wyniki badania metodą bezpośredniego kontaktu komórek z bioszkłami przy udziale 20 mg/ml, 10 mg/ml i 5 mg/ml przedstawiają tabele 1–2 oraz rycina 6.

W hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 przy bezpośrednim kontakcie z badanymi bioszkłami zmiany cytotoksyczne w silnym stopniu zależą od stężenia. Podczas kontaktu z bioszkłami przy udziale 20 mg/ml komórki L929 lepiej tolerowały bioszkle dotowane Mg, Sr i Au, przy czym najwyższą przeżywalność po 24 h zanotowano dla P5-VS-Sr, a po 72 h dla P5-VS-Au.

Tabela 1

Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w bezpośrednim kontakcie z bioszkłami przy udziale 20 mg/ml [%]

| Symbol próbki | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|---------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | udział komórek | | udział komórek | | udział komórek | |
| | martwe | żywe | martwe | żywe | martwe | żywe |
| P5-VS | 50 | 50 | 30 | 70 | 45 | 55 |
| P5-VS-Mg | 20 | 80 | 27 | 73 | 35 | 65 |
| P5-VS-Sr | 7 | 93 | 10 | 90 | 33 | 67 |
| P5-VS-Au | 15 | 85 | 18 | 82 | 25 | 75 |
| Kontrola L929 | 1 | 99 | 1 | 99 | 3 | 97 |

Źródło: Opracowanie własne.

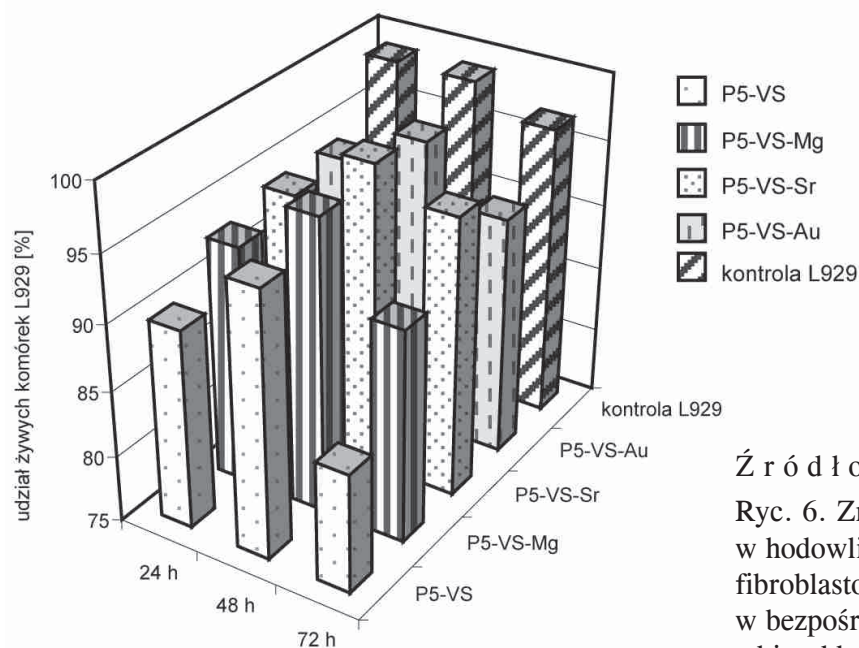
Podczas kontaktu z bioszkłami przy udziale 10 mg/ml najwyższą przeżywalność po 24 h zanotowano dla P5-VS-Mg, a po 72 h dla P5-VS. Przy udziale 5 mg/ml najwyższą przeżywalność komórek L929 zanotowano dla P5-VS-Sr, a najniższą dla bioszkle P5-VS bez udziału Mg, Sr, Au (ryc. 6).

Tabela 2

Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w bezpośrednim kontakcie z bioszklami przy udziale 10 mg/ml [%]

| Symbol próbki | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|---------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | udział komórek | | udział komórek | | udział komórek | |
| | martwe | żywe | martwe | żywe | martwe | żywe |
| P5-VS | 11 | 89 | 10 | 90 | 24 | 76 |
| P5-VS-Mg | 9 | 91 | 28 | 72 | 34 | 66 |
| P5-VS-Sr | 13 | 87 | 15 | 85 | 40 | 60 |
| P5-VS-Au | 11 | 89 | 14 | 86 | 30 | 70 |
| Kontrola L929 | 1 | 99 | 1 | 99 | 3 | 97 |

Źródło: Opracowanie własne.



Źródło: Opracowanie własne.

Ryc. 6. Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w bezpośrednim kontakcie z bioszklami przy udziale 5 mg/ml

4.3.2. BADANIE CYTOTOKSYCZNEGO DZIAŁANIA METODĄ POŚREDNIEGO KONTAKTU

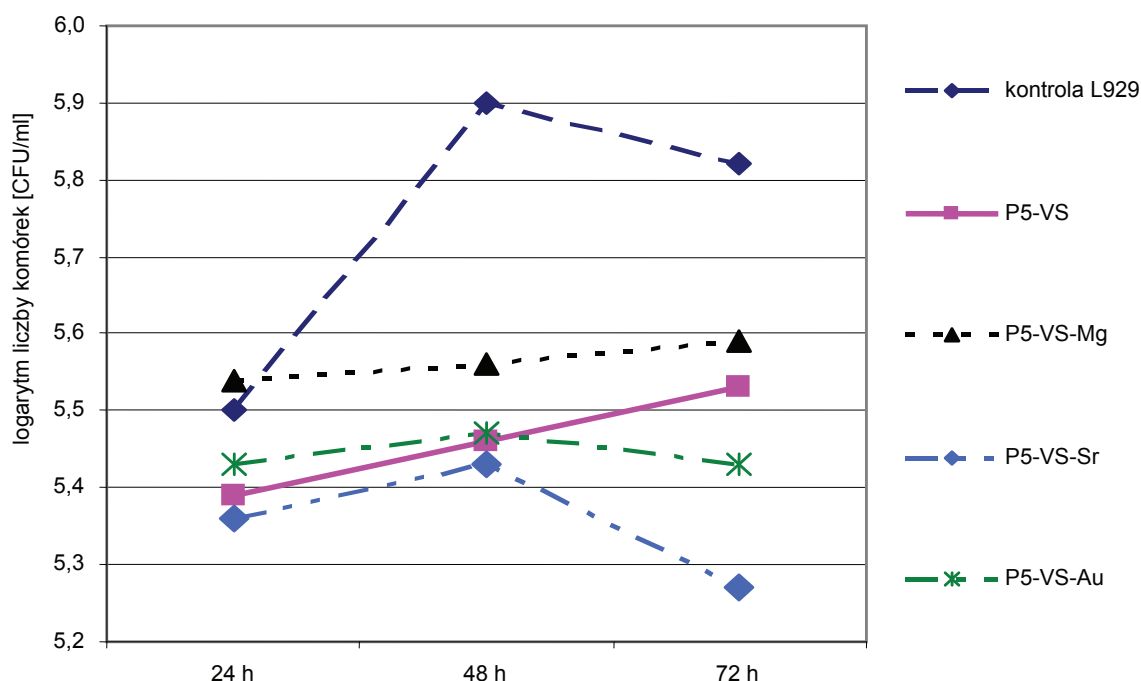
W metodzie pośredniej oznaczenie ilościowe żywych i martwych komórek (tab. 3) oraz ocenę ich proliferacji (ryc. 7) przeprowadzono po 24, 48 i 72 h inkubacji.

Tabela 3
Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w pośrednim kontakcie z bioszkiełami [%]

| Symbol próbki | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|---------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | udział komórek | | udział komórek | | udział komórek | |
| | martwe | żywe | martwe | żywe | martwe | żywe |
| P5-VS | 3 | 97 | 4 | 96 | 5 | 95 |
| P5-VS-Mg | 4 | 96 | 6 | 94 | 7 | 93 |
| P5-VS-Sr | 3 | 97 | 4 | 96 | 6 | 94 |
| P5-VS-Au | 2 | 98 | 3 | 97 | 4 | 96 |
| Kontrola L929 | 1 | 99 | 1 | 99 | 3 | 97 |

Źródło: Opracowanie własne.

Nie zanotowano istotnych różnic w przeżywalności komórek L929 podczas kontaktu z eluatami badanych bioszkieł. Udział procentowy żywych komórek był najwyższy po 24 h inkubacji i uległ tylko nieznacznej zmianie, gdyż po 72 h dla wszystkich próbek udział żywych komórek przekraczał 93%.



Źródło: Opracowanie własne.

Ryc. 7. Proliferacja komórek podczas kontaktu z eluatem badanych szkieł

Komórki L929 wykazały najwyższą proliferację podczas kontaktu z eluatem bioszklą P5-VS, gdyż po 72 h inkubacji logarytm ich liczby wzrósł do 5,53. Tendencja wzrostowa zanotowana została również dla komórek kontaktujących się z eluatem bioszklą P5-VS-Mg. Komórki L929 po 72 h kontaktu z eluatem bioszklą P5-VS-Sr i P5-VS-Au wykazały wzrost proliferacji jedynie po 48 h inkubacji, gdyż po 72 h wystąpiło zmniejszenie ich liczby.

Na obrazach mikroskopowych po kontakcie z eluatami badanych bioszkieł (tab. 4) obserwuje się komórki L929 nieobkurczone i rozpląszczone na podłożach. Obrazy morfologiczne hodowli komórkowych są prawidłowe, a proliferacja oznaczona po 48 h ma tendencję wzrostową.

Tabela 4

Morfologia komórek L929 po kontakcie z eluatami badanych bioszkieł

| | | | |
|---------------|--|--|--|
| P5-VS | | | |
| P5-VS-Mg | | | |
| P5-VS-Sr | | | |
| P5-VS-Au | | | |
| Kontrola L929 | | | |

Źródło: Opracowanie własne.

5. Podsumowanie i wnioski końcowe

W ramach prezentowanej pracy określono wpływ składu chemicznego bioszkieł z układu CaO-SiO₂-P₂O₅ dotowanych Mg, Sr i Au na bioaktywność *in vitro* oraz działanie cytotoksyczne. Wytworzone metodą zol-żel bioszkieła oznaczone symbolami: P5-VS, P5-VS-Mg, P5-VS-Sr oraz P5-VS-Au po wygrzaniu w 600°C miały formę proszków złożonych z cząstek o nieregularnych kształtach.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Otrzymane bioszkieła są bioaktywne po inkubacji w roztworze SBF, co potwierdzają badania przy użyciu SEM. Na powierzchni bioszkieł tworzą się agregaty struktur typowych dla morfologii apatytu uzyskiwanego w sposób biomimetyczny. Na powierzchni próbek P5-VS i P5-VS-Mg powstał apatyt płatkowy.

2. Badania *in vitro* działania cytotoksycznego wytworzonych bioszkieł pozwoliły stwierdzić brak efektu toksycznego na komórki L929:

– bioszkieła dotowane Mg lub Sr, lub Au, w metodzie bezpośredniej przy stężeniu 20 mg/ml, wykazały znacznie niższą cytotoksyczność w porównaniu do bioszkieła odniesienia P5-VS;

– przy kontakcie bezpośrednim na przeżywalność komórek miało wpływ stężenie, najlepsze wyniki uzyskano przy 5 mg/ml;

– obrazy morfologiczne hodowli komórkowych w metodzie pośredniej, po kontakcie L929 z eluatami badanych bioszkieł, są prawidłowe, a proliferacja oznaczona po 48 h ma tendencję wzrostową.

Literatura

[1] H e n c h L.L., *Bioceramics: From Concept to Clinic*, „Journal of the American Ceramic Society” 1991, Vol. 74, s. 1487–1510.

[2] *Biomateriały*, red. S. Błażewicz, L. Stoch, Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2003.

[3] G o r u s t o v i c h A.A. at al., *Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: A histomorphometric study in rats*, „Journal of Biomedical Material Research” 2010, Vol. 92A, s. 232–237.

[4] S i m o n S. at al., *Gold nanoparticles developed in sol-gel derived apatite – bioactive glass composites*, „Journal of Materials Science: Materials in Medicine” 2012, Vol. 23, s. 1193–1201.

[5] K i m Y., O h t s u k i Ch., K a w a c h i G., K a m i t a k a h a r a M., C h o S.B., *Preparation of bioactive microspheres of organic modified calcium silicates through sol-gel processing*, „Journal of Sol-Gel Science and Technology” 2008, Vol. 45, s. 43–49.

[6] Badanie wpływu składu chemicznego i fazowego na bioaktywność *in vitro* bioszkieł z układu CaO-SiO₂. Sprawozdanie z działalności statutowej ICiMB za rok 2011.

LIDIA CIOŁEK
JOANNA KARAŚ
ANDRZEJ OLSZYNA
EWA ZACZYŃSKA
ANNA CZARNY

STUDY ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND *IN VITRO*
CYTOTOXICITY OF BIOGLASSES DOPED WITH MG, SR, AU

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

This paper presents the results of research on bioglasses in the system $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ doped with Mg, Sr and Au. Within the study the morphology of the bioglasses and *in vitro* bioactivity and cytotoxic effect on L929 cells were determined. Au doped bioglass was examined using transmission electron microscopy with EDS analysis. It was found that the produced bioglasses were bioactive in contact with simulated body fluid (SBF) and were no toxic on L929 cells *in vitro* tests.