

1. Materiały gipsowe ulegały resorpcji w czasie do 1 miesiąca po implantacji, ale drobne ich fragmenty obecne były w tkance kostnej w 3 miesiącu po wszczępieniu.
2. Resorpcji tworzyw gipsowych 1 miesiąc po implantacji towarzyszył nieswoisty proces zapalny i osteolityczny, mocno nasilony po implantacji gipsu z poli(alkoholem winylu), słabiej po wszczępieniu kontrolnego tworzywa gipsowego i najmniej nasilony w miejscu wszczępienia gipsu z fosforanem wapnia.
3. W 3 miesiącu po implantacji wysoką osteointegrację wykazywały wszczępy gipsu z fosforanem wapnia oraz tworzywa kontrolnego, słabszą implanty gipsu z poli(alkoholem winylu).

### Podziękowania

Badania wykonane zostały w ramach realizacji projektu celowego Nr 6 T08 0122 2002 C/05848 finansowanego przez Ministra Nauki i Informatyzacji.

Część badań wykonana w ramach projektu badawczego nr 1064 w ramach badań własnych Akademii Medycznej we Wrocławiu.

### Piśmiennictwo

- [1] Barrack RL: Bone graft extenders, substitutes, and osteogenic proteins. *J Arthroplasty*. 2005 Jun;20(4 Suppl 2):94-7.
- [2] Guarnieri R, Pecora G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Orsini G, Piattelli A: Medical grade calcium sulfate hemihydrate in healing of human extraction sockets: clinical and histological observations at 3 months. *J Periodontol*. 2004 Jun;75(6):902-8.

those materials were still present after 3 months.

2. The resorption of gypsum materials was accompanied by nonspecific osteolytic and inflammatory process which increased after implantation of gypsum containing poly(alcohol-vinyl), less visible after implantation of control gypsum material and of small degree after implantation of gypsum with calcium phosphate.

3. After 3 months since implantation the high osteocompatibility was shown by gypsum implants with calcium phosphate and control materials, being of smaller degree in the instance of implants containing poly(alcohol- vinyl).

### Acknowledgments

The presented investigations were made possible by granted demanded project of Minister of Science and Information Society Technologies Nr 6 T08 0122 2002 C/05848.

The Part of the investigation was supported by the project number 1064 of the Wrocław Medical University.

### References

- [3] Robinson D, Alk D, Sandbank J, Farber R, Halperin N.: Inflammatory reactions associated with and calcium sulfate bone substitute. *Ann Transplant*. 1999;4(3-4):91-7.
- [4] Strocchi R, Orsini G, Iezzi G, Scarano A, Rubini C, Pecora G, Piattelli A.: Bone regeneration with calcium sulfate: evidence handicap increased angiogenesis in rabbits. *J Oral Implantol*. 2002;28(6):273-8.

## TECHNIKA OSADZANIA KOMÓREK - KLUCZOWY CZYNNIK W TRÓJWYMIAROWEJ HODOWLI KOMÓREK IN VITRO

PIOTR WOŹNIAK, ANNA CHRÓŚCICKA, RADOSŁAW OŁKOWSKI, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL

AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE,  
ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,  
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA;  
PWOZNIAK@AMWAW.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),190-193*]

### Wstęp

Technika osadzania komórek jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na trójwymiarową hodowlę komórek in vitro [1,2].

Zawiesina komórek może być наносzona na rusztowanie 3-D z zastosowaniem metody statycznej lub dynamicznej. Pomimo tego, że pierwsza jest wciąż najbardziej popularna w laboratoriach inżynierii tkankowej, metody dynamicznego osadzania komórek zdobywają coraz więcej nowych

## CELL SEEDING TECHNIQUE - THE KEY FACTOR AFFECTING 3-D CELL CULTURE IN VITRO

PIOTR WOŹNIAK, ANNA CHRÓŚCICKA, RADOSŁAW OŁKOWSKI, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,  
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAW, POLAND;  
PWOZNIAK@AMWAW.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),190-193*]

### Introduction

Cell seeding technique is one of the most important factors affecting 3-D cell culture in vitro [1,2].

Generally, cell suspension might be supplied into the scaffold with the use of static or dynamic seeding technique. Although, the first one is still the most popular in tissue engineering laboratories, the group of supporters of the second technique is growing fast.

Dynamic seeding techniques involve using special facilities called bioreactors. There are different types of bioreactors including: spinner flasks, rotating wall vessels and flow

zwoleńników.

Techniki związane z dynamicznym nanoszeniem komórek wymagają użycia specjalnych urządzeń zwanych bioreaktorami. Można wyróżnić różne typy bioreaktorów, między innymi: butelki z mieszadłem magnetycznym, naczynia z obracającymi się ścianami oraz bioreaktory z przepływem płynów [3,4].

Użycie tych nowych systemów hodowlanych pozwala na uzyskanie lepszej dystrybucji komórek wewnątrz trójwymiarowej struktury rusztowania [2,5,6].

W niniejszym doświadczeniu, w celu zbadania wpływu techniki osadzania komórek na zakładanie trójwymiarowej hodowli ludzkich osteoblastów na rusztowaniach korundowych porównano ze sobą metodę statyczną i dynamiczną (butelka z mieszadłem magnetycznym).

## Materiały i metody

W przedstawionym eksperymencie wykorzystane zostały rusztowania korundowe o indeksie porowatości 60ppi (porów na cal) i wymiarach 10x10x3mm. Tuż przed nanoszeniem komórek, w celu pozbycia się powietrza z porów, rusztowania poddano działaniu podciśnienia a następnie umieszczono w 24 studzienkowej polistyrenowej płytce hodowlanej (TCPS- ang. Tissue Culture Polystyrene). Następnie, próbki zostały zalane pożywką hodowlaną i pozostawione w niej w celu namoczenia aż do następnego dnia.

Osteoblasty użyte w tym oświadczeniu były komórkami ludzkimi, wyizolowanymi z tkanki kostnej amputowanej w czasie zabiegów operacyjnych.

Przed eksperymentem komórki były hodowane w inkubatorze, w temp. 37°C, przy wilgotności 90%, w atmosferze CO<sub>2</sub> o stężeniu 5% z zastosowaniem medium hodowlanego na bazie Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), wzbogaconego inaktywowanym płodowym serum bydlęcym (FBS) (10% v/v), l-glutaminą (1%) (Gibco), mieszaniną antybiotyk-substancja grzybobójcza (1%) (Gibco) oraz witaminą C (100 mM) (Sigma). Po osiągnięciu konfluencji, komórki zostały oderwane poprzez trypsynizację (0,05% trypsyna) (Gibco), policzone, a następnie naniesione na rusztowania korundowe.

Zastosowano dwie metody osadzania komórek: 1) statyczną oraz 2) dynamiczną, z użyciem butelki z mieszadłem magnetycznym.

W pierwszej, statycznej, 100µl zawiesiny komórek (9x10<sup>5</sup> komórek/próbkę) powoli naniesiono na rusztowanie za pomocą mikropipety. Próbki przeniesiono do inkubatora (37°C) na 1,5godz. Po tym czasie, aby zakryć rusztowanie, do każdej studzienki dodano dodatkowe 1,9ml pożywki. Płytki zostały wtedy ponownie umieszczone w inkubatorze i pozostawione tam na 24godz. Następnie rusztowania przeniesiono do nowej 24 studzienkowej płytki hodowlanej, pokryto świeżą pożywką i hodowano przez następne 6 dni. Tą samą procedurę, z wyjątkiem użycia próbek korundowych, zastosowano dla komórek kontrolnych, którymi były osteoblasty naniesione bezpośrednio na dno studzienek płytki hodowlanej (TCPS).

W drugiej metodzie, dynamicznej, rusztowania umieszczono w specjalnym koszyku wykonanym ze stali nierdzewnej. Został on przymocowany do uszczelki korka 250ml butelki z mieszadłem. Do butelki dodano 250ml pożywki zawierającej 9x10<sup>5</sup> komórek na próbkę a następnie poddano mieszaniu (50rpm) przez 24 godz. w 37°C. Po tym czasie, rusztowania przeniesiono do 24 studzienkowej płytki polistyrenowej (TCPS) i hodowano przez 6 dni w standardowych warunkach.

Siódmego dnia, żywotność/przeżywalność komórek zbadano za pomocą testu XTT. Test XTT jest standardowo uży-

perfusion bioreactors [3,4]. Using those new systems it is possible to obtain better cell distribution throughout the 3-D structure of the scaffold [2,5,6].

In this study, in order to investigate the role of the seeding technique in establishing a three-dimensional culture of Human Bone Derived Cells (HBDCs) on alumina scaffolds static and spinner flask seeding methods were compared.

## Materials and methods

In the presented study alumina scaffolds with a porosity index 60ppi (pore per inch) with dimensions of 5x5x3mm were used. Before seeding, to eliminate air from pores, the scaffolds were vacuumed and placed into 24-well tissue culture polystyrene (TCPS) plates. They were pre-wet in culture medium overnight.

Human Bone Derived Cells used in this experiment were harvested from bone chips which otherwise would be discarded. Prior to the experiment, cells isolated from tissue samples were cultured in an incubator under the standard conditions (temperature 37°C, 90% humidity, 5% CO<sub>2</sub>). Medium, based on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), supplemented with heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (10%v/v) (Gibco), l-glutamine (1%) (Gibco), antibiotic-antimycotic mixture (1%) (Gibco) and L-ascorbic acid 2-phosphate (100 mM) (Sigma) was used. After reaching a confluence, HBDCs were detached by trypsinisation (0.05% trypsin) (Gibco), counted and seeded on the alumina scaffolds.

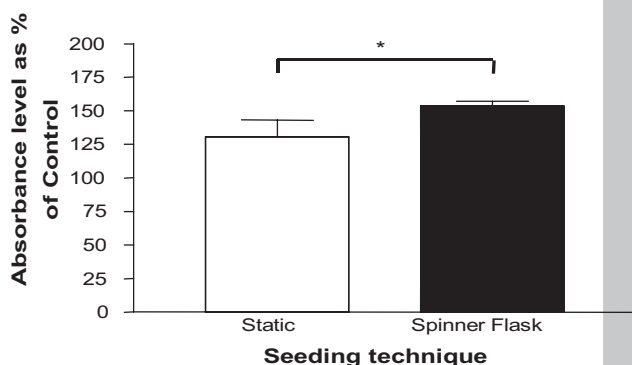
We used two seeding methods: 1) Static and 2) Spinner flask technique.

In the static procedure, 100µl of cell suspension (9x10<sup>5</sup> cells/scaffold) was slowly dispersed over the top surface of the scaffold with a micropipette. The seeded scaffolds were transferred to a 37°C incubator for 1.5hours, and subsequently an additional 1.9ml of medium was slowly added along the side of the well to cover the scaffold. Then plates were placed back into the incubator and the constructs were cultured statically for 24 hours. Next, the scaffolds were transferred to a new 24-well culture plate, covered with fresh medium and incubated for an additional 6 days. The same procedure, except using alumina scaffolds was used for control cells, which were seeded just on the bottom of the TCPS plate wells.

In the spinner flask method, scaffolds were placed into a special stainless steel basket which was affixed into the silicone stopper at the top of the 250ml spinner flask. 250ml of the medium containing 9x10<sup>5</sup> cells per scaffold were added to the flask and stirred at 50rpm for 24 hours at 37°C. Then, the scaffolds were removed from the flask, placed into a 24-well culture plate, and incubated in standard conditions for 6 days.

On the seventh day, HBDC viability was examined with XTT assay. This test is used in toxicology and is based on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzymes present in living cells for converting the XTT substrate (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carboxyl]-2Htetrazolium hydroxide) into a water-soluble formazan product. The final product of the reaction is measured by the ELISA reader at 450nm. The results for static and dynamic conditions were compared to the cells cultured on TCPS and expressed as percent of the control.

To evaluate cell distribution within the 3-D structure of the scaffolds, HBDCs were stained with Hoechst dye specific to DNA. Cells were visualised using a fluorescence microscope (Nikon ECLIPSE TE 2000-U).



**RYS. 2.** Seria zdjęć wykonanych z użyciem techniki fluorescencyjnej. Osteoblasty osadzone metodą statyczną uwidocznione wewnątrz rusztowań korundowych. Wszystkie zdjęcia wykonano w tym samym miejscu, przy tym samym powiększeniu, ale przy różnych ustawieniach ostrości. Jednostka 1 mm.

**FIG. 2.** The set of pictures using the fluorescence technique. HBDCs are visualised within statically seeded alumina scaffolds. All photos were taken in the same place, in the same magnification, but with different focus settings. Bar 1 mm.

wany w toksykologii. Opiera się on na przemianie soli tetrazolowych (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyloamino) carboxyl]-2Htetrazolium hydroxide) w rozpuszczalne w wodzie formazany przez dehydrogenazę bursztynianową w mitochondriach żywych komórek. Ilość końcowego produktu powstającego w tej reakcji jest mierzona spektrofotometrycznie w czytniku ELISA przy długości fali 450nm. Wyniki dla obu metod osadzania komórek porównano z komórkami hodowanymi na TCPS i wyrażono jako procent kontroli.

W celu oceny rozmieszczenia komórek wewnątrz trójwymiarowej struktury rusztowania, osteoblasty zostały zabarwione barwnikiem Hoechst, który jest specyficzny do DNA. Komórki zostały uwidocznione z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon ECLIPSE TE 2000-U).

## Wyniki

Wyniki testu XTT przedstawiono na RYS.1. Poziom absorbancji dla dynamicznej techniki osadzania komórek był znacząco statystycznie wyższy niż w przypadku metody statycznej. Ponadto, wyniki dla obu metod były wyższe niż w kontroli (komórkach hodowanych na TCPS).

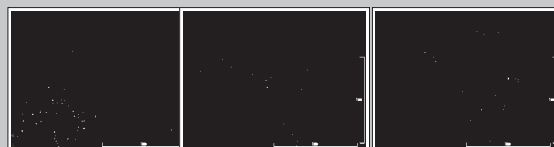
Podczas obserwacji mikroskopowych, komórki zostały uwidocznione wewnątrz porów rusztowań korundowych (RYS.2, RYS.3). Wykonując serie zdjęć przy różnych ustawieniach ostrości umożliwiło dokładne obejrzenie porów rusztowania. Więcej, lepiej rozmieszczonych osteoblastów zaobserwowano w porach próbek, na których komórki osadzano z użyciem butelki z mieszadłem.

## Dyskusja

Wpływ metody osadzania komórek na żywotność ludzki

**RYS.1.** Wyniki testu XTT dla statycznej i dynamicznej metody osadzania komórek. Dane są przedstawione jako procent kontroli (średnia±SD). Gwiazdka oznacza istotną statystycznie różnicę pomiędzy badanymi grupami przy  $P < 0.05$  (niezparowany t test z korekcją Welch'a).

**FIG.1.** The results of XTT assay for static and dynamic seeding technique. The data is presented in percent of positive control as mean±SD. Asterisk shows a significant difference between the values for the experimental groups at  $*P < 0.05$  by unpaired t test with Welch's correction.



**RYS. 3.** Seria zdjęć wykonanych z użyciem techniki fluorescencyjnej. Osteoblasty osadzone metodą dynamiczną uwidocznione wewnątrz rusztowań korundowych. Wszystkie zdjęcia wykonano w tym samym miejscu, przy tym samym powiększeniu, ale przy różnych ustawieniach ostrości. Jednostka 1 mm.

**FIG. 3.** The set of pictures using the fluorescence technique. HBDCs are visualised within dynamically seeded alumina scaffolds. All photos were taken in the same place, in the same magnification, but with different focus settings. Bar 1 mm.

## Results

The results of XTT assay are presented in FIG.1. The absorbance level for dynamic seeding technique was significantly higher than in the case of the static method. Moreover, the results for both techniques were higher than in the control (cells cultured on TCPS).

In microscopy examination of HBDCs, cells were visualised into the pores of alumina scaffolds (FIG.2; FIG.3). Taking sets of images with different focus settings we were able to look inside the pores of the scaffolds. There were more HBDCs and they were better visible in the pores of scaffolds seeded using spinner flask than in the case of samples seeded statically.

## Discussion

To evaluate the influence of the seeding technique on the viability of Human Bone Derived Cells, XTT assay was performed. The result of this quantitative study indicates that Human Bone Derived Cells seeded using spinner flask bioreactor were significantly more viable - more metabolically active - than cells seeded statically [2,6].

During microscopy evaluation, we examined the penetration of the scaffold by HBDC. Cells were visualised on the surface of the alumina material as well as inside the pores. As can be judged on the basis of FIG.2 and FIG.3 cells were better distributed after dynamic seeding. This observation corresponds with other studies [2,6].

The above observations confirmed that the cell seeding method might be one of the crucial factors affecting the 3-D cell culture in vitro [4].

osteoblastów oceniono za pomocą testu XTT. Wyniki tego ilościowego testu wskazują, iż osteoblasty ludzkie nanoszone przy użyciu butelki z mieszadłem magnetycznym były statystycznie bardziej żywotne, czyli bardziej aktywne metabolicznie niż komórki osadzone metodą statyczną [2,6]. Podczas badań mikroskopowych zbadano penetrację rusztowania przez ludzkie osteoblasty. Komórki uwidoczono na powierzchni próbek korundowych jak i wewnątrz porów. Na podstawie RYS.2 oraz RYS.3 można stwierdzić, iż komórki były lepiej rozmieszczone po zastosowaniu osadzenia dynamicznego. Obserwacja ta nawiązuje do wyników innych doświadczeń [2,6]. Powyższe obserwacje potwierdzają, iż metoda osadzania komórek może być jednym z kluczowych czynników wpływających na efektywność trójwymiarowej hodowli komórek in vitro [4].

## Wnioski

Techniki osadzania komórek użyte w tym doświadczeniu wpływały na żywotność i dystrybucję ludzkich osteoblastów hodowanych na trójwymiarowych rusztowaniach korundowych.

Metoda dynamicznego osadzania komórek (butelka z mieszadłem) użyta w tym eksperymencie poprawiała efektywność hodowli ludzkich osteoblastów.

Do przyszłych doświadczeń związanych z optymalizacją metod hodowli komórek dla inżynierii tkankowej kości rekomendowane są dynamiczne metody osadzania komórek.

## Podziękowania

Niniejsza praca została sfinansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002) oraz Akademii Medycznej w Warszawie (NZME/W2).

## WPŁYW STERYLIZACJI RADIACYJNEJ NA BIOKOMPATYBILNOŚĆ POLIURETANÓW - DOŚWIADCZENIE WSTĘPNE

PIOTR WOŹNIAK\*, MONIKA BIL\*\*, ANNA CHRÓŚCICKA\*, RADOŚLAW OŁKOWSKI\*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK\*\*\*, JOANNA RYSZKOWSKA\*\*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ\*

\*AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE, ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,

CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA;

\*\*POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WOŁOSKA 141, WARSZAWA, 02-507, POLSKA;

\*\*\*INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,  
DORODNA 16, 03-195 WARSZAWA,

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),193-196]

## Wstęp

Poliuretany (PURs), podobnie jak inne biomateriały wykorzystywane w medycynie wymagają zastosowania sterylizacji w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia infekcji. Jedną z najlepszych metod sterylizacji jest technika radia-

## Conclusions

193  
•••••

Cell seeding techniques used in this study influence the viability and distribution of Human Bone Derived Cells cultured on 3-D alumina scaffolds.

Spinner flask seeding method used in this experiment enhance the effectiveness of cell culture.

In the further research on optimal cell culture method for bone tissue engineering, dynamic seeding techniques are recommended.

## Acknowledgements

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002) and Medical University of Warsaw (NZME/W2).

## Piśmiennictwo

## References

- [1] D. Wendt, A. Marsano, M. Jakob, M. Heberer, I. Martin, *Biotechnol Bioeng* 84, 205-14 (Oct 20, 2003).
- [2] G. Vunjak-Novakovic et al., *Biotechnol Prog* 14, 193-202 (Mar-Apr, 1998).
- [3] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, R. L. Reis, *Macromol Biosci* 4, 743-65 (Aug 9, 2004).
- [4] J. S. Temenoff, A. G. Mikos, *Biomaterials* 21, 431-40 (Mar, 2000).
- [5] I. Martin, D. Wendt, M. Heberer, *Trends Biotechnol* 22, 80-6 (Feb, 2004).
- [6] X. Qi, J. G. Liu, Y. Chang, X. X. Xu, *Chin Med J (Engl)* 117, 576-80 (Apr, 2004).

## THE INFLUENCE OF RADIOSTERILISATION ON BIOCOMPATIBILITY OF POLYURETHANES-PRELIMINARY STUDY

PIOTR WOŹNIAK\*, MONIKA BIL\*\*, ANNA CHRÓŚCICKA\*, RADOŚLAW OŁKOWSKI\*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK\*\*\*, JOANNA RYSZKOWSKA\*\*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ\*

\*MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,  
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAW, POLAND;

\*\*WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,  
WOŁOSKA 141, WARSZAW, 02-507, POLAND;

\*\*\*INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,  
DORODNA 16, 03-195 WARSZAW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),193-196]

## Introduction

Medical application of biomaterials, including polyurethanes (PURs), required the use of sterilisation to minimize the risk of infection. One of the best methods of sterilisation is irradiation [1]. Ionising radiation process may in-