

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-

cyjna [1]. Promieniowanie jonizujące może wpływać na niektóre właściwości poliuretanów, między innymi degradację oraz toksyczność [1-6].

O ile nam wiadomo, ilość informacji na temat wpływu dawki promieniowania jonizującego na biogodność poliuretanów in vitro jest ograniczona [1]. Odnotowano, iż rutynowo stosowana w przygotowaniu implantów dawka wynosząca 25kGy, nie ma wpływu na cytotoxyczność PURs [1].

W niniejszym doświadczeniu, w celu oceny wpływu dawki promieniowania jonizującego na biokompatybilność poliuretanów, zbadano żywotność oraz aktywność osteogenną ludzkich osteoblastów in vitro.

Materiały i metody

Lite, poliuretanowe próbki (PUR4PCL1250) o wymiarach $h=2\text{mm}$ i $r=3\text{mm}$ zsyntetyzowano z użyciem: 4,4'-metylenobis (cykloheksylo izocyjanianu) (HMDI), polikaprolaktono diolu (PCL diolu) $M_n \sim 1250$ oraz glikolu etylenowego (EG). Synteza została poprowadzona z zastosowaniem metody prepolimerowej. Otrzymane poliuretany zostały wysterylizowane w akceleratorze liniowym LAE strumieniem elektronów o energii 10 MeV. Użyto dwóch dawek promieniowania: 25kGy oraz 75kGy, w wyniku czego powstały dwa rodzaje materiałów: PUR4PCL1250 25kGy i PUR4PCL1250 75kGy. Następnie, próbki polimerowe zostały umieszczone w studzienkach polistyrenowej płytki hodowlanej (TCPS). W czasie doświadczenia zbadano nie tylko efekt dawki promieniowania ale także wpływ długości okresu po sterylizacji na biokompatybilność zsyntetyzowanych PURs. W tym celu, eksperymenty rozpoczęto w siódmym (Eks.I) i czternastym drugim (Eks.II) dniu po sterylizacji.

Osteoblasty użyte w tym doświadczeniu 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_2 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 próbki poliuretanowe.

Doświadczenie przeprowadzono w 96 studzienkowej polistyrenowej płytce hodowlanej. Zawiesinę osteoblastów ludzkich ($1,5 \times 10^3$ komórek/próbkę) powoli naniesiono na powierzchnię rusztowania. Po 24 godz. inkubacji w 37°C , pożywkę zmieniono na świeżą, wzbogaconą dodatkowo deksametazonem (10nM) (Sigma) oraz witaminą D_3 (10nM) (Sigma). Przez następne sześć dni osteoblasty hodowano w inkubatorze w standardowych warunkach. Tą samą procedurę, z wyjątkiem użycia próbek poliuretanowych, zastosowano dla komórek kontrolnych, którymi były osteoblasty naniesione bezpośrednio na dno studzienek płytki hodowlanej (TCPS).

Siódmego dnia, żywotność/przeżywalność komórek zbadano za pomocą testu XTT. Test XTT jest standardowo używany 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 badanych PURs porównano z komórka-

fluence some properties of polyurethanes, including degradation and toxicity [1-6].

To the best of our knowledge, there is little information about the influence of the dose of irradiation on polyurethanes biocompatibility in vitro [2]. It was found that the dose of ?-irradiation - 25kGy, routinely used in medical implants preparation - does not affect cytotoxicity of PURs [2].

In this study, in order to evaluate the influence of dose of ionising irradiation on biocompatibility of polyurethanes, we examined the viability and osteogenic activity of Human Bone Derived Cells (HBDCs) in vitro.

Materials and methods

Solid polyurethane samples (PUR4PCL1250) with the dimensions $h=2\text{mm}$ $r=3\text{mm}$ were synthesized by using 4,4'-methylenebis (cyclohexyl isocyanate) (HMDI), polycaprolactone diol (PCL diol) $M_n \sim 1250$ and ethylene glycol (EG). The synthesis was performed with the prepolymer method. Subsequently, the obtained polyurethanes were sterilised in linear accelerator LAE by 10 MeV electrons. Two different doses of radiation were used: 25kGy and 75kGy, which led to the creation of two types of materials: PUR4PCL1250 25kGy and PUR4PCL1250 75kGy. After that, polyurethane samples were placed into the wells of tissue culture polystyrene (TCPS) plate.

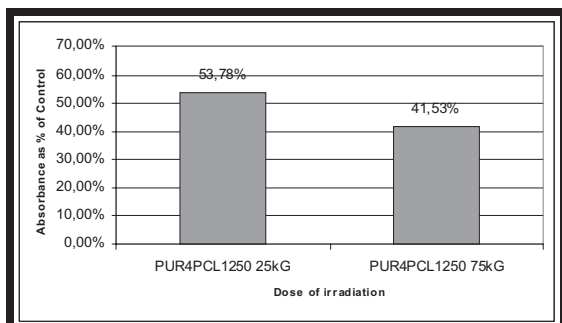
We examined not only the effect of the irradiation dose, but also the influence of the time period after sterilisation on the biocompatibility of synthesized PURs. To achieve this goal, experiments were started on the 7th (Exp.I) and 42nd (Exp.II) day after sterilisation.

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_2). Medium, based on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), supplemented with heat-inactivated foetal bovine serum (10%v/v) (FBS) (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 polyurethane samples.

The experiment was performed in a 96-well TCPS plate. HBDC suspension ($1,5 \times 10^3$ cells/scaffold) was slowly dispersed over the top surface of the PURs samples. After 24 hours of incubation at 37°C , the medium was replaced by fresh medium, supplemented with dexamethasone (Sigma) at concentration of 10nM and $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol (vitamin D_3)(Sigma) at concentration of 10nM. For the next six days HBDCs were maintained in culture medium at 37°C in a humidified atmosphere. The same procedure, except using polyurethane scaffolds was used for control cells, which were seeded just on the bottom of the TCPS plate wells.

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-sulfophenyl)-5-[(phenyloamino) 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 examined PURs were compared to the cells cultured on TCPS and expressed as percent of the control.

On the eighth day of the culture, ALP activity was evaluated by means of an ALP SIGMA Diagnostic Kit. The amount of the final product was determined by the absorbance level at 405nm wavelength using the ELISA reader. The results for examined materials were related to the ALP activity in



RYS. 1. Wyniki testu XTT z Eks.I. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej. FIG. 1. The results of XTT assay from Exp.I. Data is presented in percent of positive control.

mi hodowanymi na TCPS i wyrażono jako procent kontroli. Ósmego dnia hodowli, aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) została zmierzona za pomocą ALP SIGMA Diagnostic Kit. Ilość ostatecznego produktu tej reakcji została określona spektrofotometrycznie w czytniku ELISA przy długości fali 405nm. Wyniki dla badanych materiałów odniesiono do aktywności ALP komórek hodowanych na TCPS i wyrażono jako procent kontroli.

Wyniki

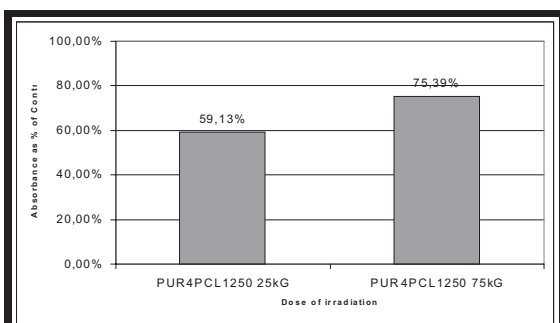
Wyniki testu XTT z eksperymentu I oraz II są przedstawione, odpowiednio, na RYS.1 i RYS.2.

Poziom absorbancji dla PURs sterylizowanych przy użyciu wyższej dawki promieniowania był niższy niż w przypadku PURs poddanych działaniu dawki 25kGy. Tendencja ta była zauważalna w doświadczeniach przeprowadzonych w obu punktach czasowych, jednakże wyniki dla próbek zbadanych 7 dni po napromieniowaniu (RYS.1) były wyższe niż w przypadku PURs zbadanych po 42 dniach (RYS.2).

Na RYS.3 i RYS.4, przedstawiono wyniki aktywności ALP z doświadczenia I i II. Wyniki dla poliuretanów sterylizowanych dawką 75kGy były wyższe niż dla materiałów napromieniowanych dawką 25kGy. Podobną zależność odnotowano w obu zbadanych punktach czasowych, jednakże poziom absorbancji w Eks.I był niższy niż w Eks.II.

Dyskusja

Jak można ocenić na podstawie testu XTT, żywotność/przeżywalność ludzkich osteoblastów była zależna od dawki promieniowania jonizującego użytego do sterylizacji badanych próbek poliuretanowych.



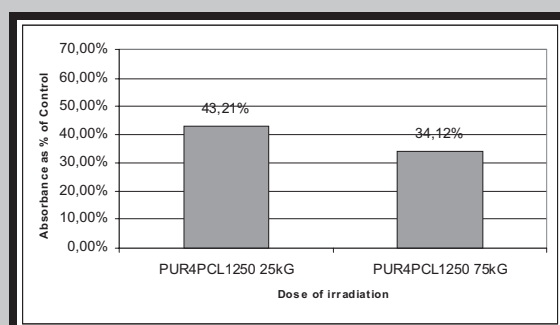
RYS. 3. Wyniki testu ALP z Eks.I. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej. FIG. 3. The results of ALP activity assay from Exp.I. Data is presented in percent of positive

cells seeded on TCPS, and are expressed as percent of positive control.

Results

The results of XTT assays from Exp.I and Exp.II are presented in FIG.1 and FIG.2, respectively. The absorbance level for PURs sterilised with a higher dose of irradiation was lower than in the case of PURs sterilised with 25kGy. This tendency was observed for experiments performed at both time points. However, the results for samples examined 7 days after the irradiation (FIG.1) were higher than in the case of PURs investigated after 42 days (FIG.2).

In FIG.3 and FIG.4, the results of ALP activity assay for Exp.I and Exp.II are presented. The results for PURs sterilised with 75kGy dose were higher than in the case of material irradiated with 25kGy. A similar relationship was detected at the two examined time points, though the absorbance level in Exp.I was lower than in the case of Exp.II.

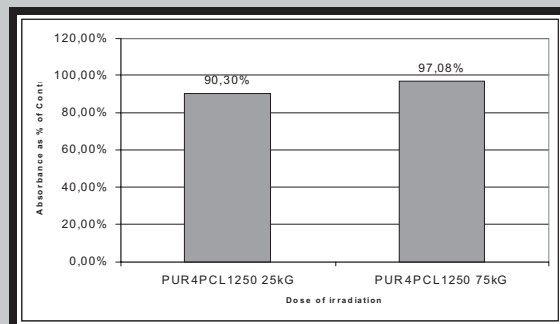


RYS. 2. Wyniki testu XTT z Eks.II. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej. FIG. 2. The results of XTT assay from Exp.II. Data is presented in percent of positive control.

Discussion

As can be judged on the basis of XTT assay, viability of HBDC was dependent on the dose of ionising radiation used for sterilisation of the examined polyurethane samples. It was found that a higher absorbed dose decreases the viability of cells cultured on the surface of PURs.

There was also a post-sterilisation-time dependence in the reaction of HBDC. If the biocompatibility study was performed in a few weeks after sterilisation, cells were less viable than in the case when the experiment was done in a few days after irradiation.



RYS. 4. Wyniki testu ALP z Eks.II. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej. FIG. 4. The results of ALP activity assay from Exp.II. Data is presented in percent of positive control.

Odnotowano, iż wyższa dawka pochłonięta promieniowania obniża żywotność komórek hodowanych na powierzchni PURs.

Zaobserwowano również zależność reakcji osteoblastów ludzkich od długości okresu po sterylizacji. Jeżeli badanie biogodności wykonywano kilka tygodni po sterylizacji komórki były mniej żywotne niż w przypadku gdy doświadczenie przeprowadzano kilka dni po napromieniowaniu.

Aktywność osteogeniczna ludzkich osteoblastów została określona na podstawie pomiarów aktywności ALP. Była ona zależna zarówno od dawki promieniowania, jak i okresu jaki minął od sterylizacji. W przeciwieństwie do żywotności, aktywność osteogeniczna komórek wzrastała wraz ze wzrostem dawki promieniowania, i była najwyższa dla PURs wysterylizowanych dawką 75kGy i zbadanych po 42 dniach od sterylizacji.

Wnioski

Dawka promieniowania elektronowego wykorzystana do sterylizacji próbek poliuretanowych użytych w tym doświadczeniu wpłynęła na żywotność/przeżywalność ludzkich osteoblastów hodowanych na powierzchni tych materiałów.

Próbki poliuretanowe sterylizowane niższą dawką promieniowania jonizującego są lepiej tolerowane przez ludzkie osteoblasty niż próbki sterylizowane z użyciem wyższej dawki.

Osteogeniczna aktywność ludzkich osteoblastów oszacowana na podstawie pomiarów aktywności ALP była wyższa na poliuretanach sterylizowanych wyższą dawką promieniowania.

Reakcja ludzkich osteoblastów hodowanych na powierzchni badanych poliuretanów zależała od czasu jaki upłynął od sterylizacji.

Poliuretany badane siedem dni po sterylizacji były bardziej biokompatybilne niż próbki oceniane po czterdziestu dwóch dniach od napromieniowania. Jednakże, poziom aktywności osteogenicznej ludzkich osteoblastów, oceniany na podstawie aktywności ALP, był wyższy w przypadku poliuretanów badanych 42 dni po sterylizacji.

Powyższe wyniki doświadczeń wstępnych wymagają potwierdzenia i dalszej wnikliwej analizy w celu wyjaśnienia czynników odpowiedzialnych za obserwowane zjawiska.

Podziękowania

Niniejsza praca została sfinansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002, i 4 TO8E 01824) oraz Akademii Medycznej w Warszawie (NZME/W2).

Piśmiennictwo

- [1] Lamba NMK, Woodhouse KA, Cooper SL. Polyurethane Processing and Survey of Biomedical Polyurethanes-Sterilization. In: Polyurethanes in Biomedical Applications. Washington, DC: CRS Press; 1998. p. 36-43.
- [2] Sheikh N. The effect of radiosterilization on cytotoxicity of polyurethane film. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2003;208:215-219.
- [3] Shintani H. Formation and elution of toxic compounds from sterilized medical products: methylenedianiline formation in polyurethane. J Biomater Appl 1995;10(1):23-58.

The osteogenic activity of HBDCs, which was estimated on the basis of ALP activity measurement, depended on both the irradiation-dose as well as the post-sterilisation-time. In contrary to the viability, the osteogenic activity of cells increased with the radiation dose, and was the highest for PURs sterilised with 75kGy and examined 42 days after irradiation with electron beam.

Conclusions

The dose of ionising radiation used for sterilisation of polyurethane samples used in this study influenced the viability and differentiation of Human Bone Derived Cells cultured on the surface of this material.

Polyurethane samples sterilised with a lower dose of irradiation are better tolerated by Human Bone Derived Cells than samples irradiated with a higher dose.

The osteogenic activity of Human Bone Derived Cells estimated on the basis of ALP activity measurement was higher in the case of polyurethanes sterilised with a higher dose of radiation.

There was a post-sterilisation-time dependence in the reaction of Human Bone Derived Cells cultured on the examined polyurethane samples.

Polyurethanes examined seven days after sterilisation were more biocompatible in Human Bone Derived Cells culture than polyurethanes evaluated forty-two days after irradiation. Although the level of osteogenic activity of Human Bone Derived Cells, estimated on the basis of ALP activity measurement, was higher in the case of polyurethanes studied forty-two days after sterilisation.

There is a need of further investigations in order to confirm the reported preliminary study, as well as to explain the factors responsible for the observed phenomena.

Acknowledgements

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002 and 4 TO8E 01824) and by the Medical University of Warsaw (NZME/W2).

References

- [4] Gorna K, Gogolewski S. The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of biodegradable polyurethanes for medical applications. Polymer Degradation and Stability 2003;79(3):465-474.
- [5] Shintani H. The relative safety of gamma-ray, autoclave, and ethylene oxide gas sterilization of thermosetting polyurethane. Biomed Instrum Technol 1995;29(6):513-9.
- [6] Shintani H, Nakamura A. Formation of 4,4'-methylenedianiline in polyurethane potting materials by either gamma-ray or autoclave sterilization. J Biomed Mater Res 1991;25(10):1275-86.