

po jego alloplastyce (RYS.3). W tym zakresie przeprowadzono analizę doświadczalną odkształceń i przemieszczeń metodami: tensometrii oporowej w wybranych przekrojach, elektronicznej interferometrii plamkowej i interferometrii holograficznej w rejonie dna koszyka [4].

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, iż wartości przemieszczeń i odkształceń koszyka mostkującego są na poziomie akceptowanym zarówno ze względu na współpracę z podłożem kostnym jak i na symulację mechaniczną otaczających tkanek.

Uwagi końcowe

Zastosowano nowe rozwiązania konstrukcyjne oraz przeprowadzono modernizację już istniejących zagranicznych stabilizatorów do przeszczepów allogenny przy wtórnej alloplastyce stawu biodrowego. Opracowano technologię ich wytwarzania wraz z wykonaniem serii prototypowych z biogodnego tytanu technicznego. Dla wybranych stabilizatorów - koszyków mostkujących przeprowadzono badania charakterystyki biomechanicznej układu sztuczna kość - implant przy obciążeniach modelowych oraz odniesiono wyniki badań do rzeczywistych warunków obciążeniowych w stawie biodrowym. Opracowano technologię i wykonano komplety instrumentarium specjalistycznych, mających zastosowanie przy wtórnej alloplastyce biodra z zastosowaniem przeszczepów kostnych i opracowanych stabilizatorów.

Podziękowania

Praca finansowana przez MNil grant nr 23/PBZ-KBN-082/T08/2002

Piśmiennictwo

- [1] Gaździk T., Wójcik B., Niedźwiecki L., Dec J.: Wymiana aseptycznie obluzowanych panewek cementowych stawu biodrowego. Chir. Narz. Ruchu i ortop. 1997. 62. 123-129.
- [2] Wójcik B., Jasiński J., Stodolnik B., Jeziorski L., Lubas M., Gaździk T.: System stabilizacji przeszczepu kostnego allogenicznego w protezoplastyce rekonstrukcyjnej i rewizyjnej panewek endoprotez stawu biodrowego. Inżynieria Biomateriałów nr 28, VI. 2003.

BADANIA CYTOTOKSYCZNOŚCI WŁÓKNISTYCH TWORZYW KOMPOZYTOWYCH

EWA ZACZYNSKA*, ANNA CZARNY*, BOGUMIŁA ŻYWICKA***,
EWA STODOLAK**, MARTA BŁAŻEWICZ**

*INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
WEIGLA 12, 53-114 WROCLAW

**KATEDRA BIOMATERIAŁÓW
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

***ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADAŃ BIOMATERIAŁÓW AM
PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCLAW

Streszczenie

Badaniu poddano serie próbek kompozytowych o podstawie polimerowej (terpolimer PTFE-PVDF-PP),

- holographic interferometry (in the bottom area of the basket).

According to the analysis it was stated that the displacement and strain values in the bridging basket are on the acceptable level respecting both collaboration with the bone base and mechanical simulation of the surrounding tissue.

Conclusions

Both the new constructional solutions and modernization of the present foreign stabilizers, which are applied for allogenic grafts during the second hip alloplasty, were made. Production technology of the implants was elaborated. Moreover, a prototype batch from biocompatible commercially pure titanium was made. For the chosen stabilizers - bridging baskets - biomechanical characteristics of the "artificial bone - implant" system working under the model load were tested. The test results were compared with the real load occurring in the hip joint. Both production technology and sets of specialist instrumentarium, which is used during the second hip alloplasty with the application of allogenic bone grafts and stabilizers, have been made.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the State Committee for the financial support. Project No 23/PBZ-KBN-082/T08/2002.

References

- [3] Jasiński J., Stodolnik B., Jeziorski L., Torbus R.: warstwa wierzchnia tytanu technicznego przeznaczona na implanty. Inżynieria Biomateriałów nr 37 r. VII. 2004.
- [4] Będziński R., Filipiak J., Marciniak J., Szostek S., Ściagała P.: Analiza doświadczalna odkształceń i przemieszczeń kosza stabilizującego panewki endoprotez stawu biodrowego. Prace Instytutu Konstrukcji i Eksploatacji Maszyn. Politechnika Wroclawska 2004.

THE STUDY OF CYTOTOXICITY OF FIBROUS COMPOSITE MATERIALS

EWA ZACZYNSKA*, ANNA CZARNY*, BOGUMIŁA ŻYWICKA***,
EWA STODOLAK**, MARTA BŁAŻEWICZ**

*INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
WEIGLA 12, PL-53-114 WROCLAW, POLAND

**DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS,
AGH-UST, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

***INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS
RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY,
PONIATOWSKIEGO 2, PL-50-326 WROCLAW, POLAND

Abstract

The series of polymer matrix composites (terpolymer PTFE-PVDF-PP) containing carbon fibers

zawierającej włókna węglowe. Próbkki kompozytowe różniły się sposobem rozprządzenia włókien w osnowie. Badano cytotoxycznosc polimeru oraz utworzonych z niego materialow kompozytowych, na ludzkiej linii komorek nablonkopodobnych raka pluc (ATCC CCL 185) - A549. Analizowano zmiany ilosciowe i morfologiczne komorek. W celu okreslenia ilosci martwych komorek zastosowano metode barwienia blykitem trypanu. Wykazano, ze zarowno polimer jak i jego kompozyty z wloknem wloknem, nie wykazuja toksycznego wplywu na komorki linii A549.

[Inzynieria Biomaterialow, 54-55,(2006),15-18]

Wstep

Postep w dziedzinie inzynierii biomaterialow, zwiazany jest z poszukiwaniem materialow, ktore posiadaja wlasciwosci pozwalajace na leczenie i uzupelnianie chorych tkanek. W leczeniu tkanki kostnej duze nadzieje wiaze sie z coraz szerszym wprowadzaniem do praktyki klinicznej, tworzyw kompozytowych. Stosowane powszechnie w dziedzinie osteosyntezy stopy metali, oprócz szeregu dogodnosci uwalniaja do tkanek toksyczne produkty degradacji, natomiast materialy ceramiczne, oprócz udokumentowanej biogodnosci z tkanką kostną charakteryzują się zbyt wysokim modulem sprężystości i niską odpornością na kruche pęknięcie [1].

Jak wiadomo, optymalne warunki do regeneracji kości występują jedynie w przypadku tworzyw implantacyjnych, które zapewniają komórkom kostnym, zbliżony do fizjologicznego, transfer naprężeń. Sytuacja taka ma miejsce, jedynie w przypadku tworzyw o parametrach mechanicznych, zbliżonych do tkanki kostnej oraz charakteryzujących się anizotropią parametrów mechanicznych podobną do kości. Dlatego w ostatnich latach, coraz większą uwagę poświęca się materiałom kompozytowym, które projektowane są w oparciu o mikrostrukturę tkanki kostnej [1-2]. Tkanica kostna jest kompozytem o wysokiej hierarchii struktury, zbudowanym z fazy organicznej i nieorganicznej. Kompozyty polimerowo-włókniste wydają się być aktualnie najlepszymi kandydatami, wśród tworzyw stosowanych do leczenia tkanki kostnej. Architektura zbrojaca kompozytu, utworzona z włókien (np. węglowych), pozwala na daleko idącą modyfikację parametrów mechanicznych oraz na uzyskanie biomimetycznej anizotropii parametrów mechanicznych. Łączenie ze sobą dwóch faz, takich jak polimer i włókna prowadzi do otrzymania tworzywa o odmiennych parametrach fizycznych i chemicznych, w porównaniu z wyjściowym polimerem. Od rozprządzenia włókien w osnowie polimerowej zależą nie tylko parametry mechaniczne tworzywa ale również właściwości powierzchniowe, takie jak energia powierzchniowa, chropowatość i inne. Wydaje się zatem konieczne aby przed rozpoczęciem prac związanych z opracowywaniem nowych tworzyw kompozytowych dla zastosowań medycznych, poddać badaniom wpływ jaki włókno wywiera na osnowę polimerową i określić czy kompozyty tworzone z osnową polimerową są materiałami nie toksycznymi dla żywych komórek [3-5].

Celem pracy była analiza cytotoxycznosci polimeru, oraz utworzonych z niego kompozytow z wloknem wloknem.

Materialy i metody

Materialy

Próbki do badań przygotowano stosując terpolimer PP-PVDF-PTFE (Aldrich Chemical Co., USA o gęstości $d=1600$ oraz włókna węglowe TORAYCA (1400) W celu otrzymania

have been examined. Composite samples had different spatial distributions of carbon fibres in their matrices. The cytotoxicity of polymer and its composites was examined with use of human line of epithelium-like cells of lung cancer (ATCC CCL 185) - A549. Quantitative and morphological changes of cells have been analyzed. The number of deceased cells was determined using the trypan blue dyeing method. It has been shown that neither polymer nor its composites have any toxic effects on cells of A549 line.

[Engineering of Biomaterials, 54-55,(2006),15-18]

Introduction

The progress in biomaterials engineering is mostly related to research on new materials, with properties allowing for curing and replenishment of diseased cells. In bone tissue treatment serious expectations are connected to broader application of composite materials to clinical practices. Metal alloys commonly used in the field of osteosynthesis, besides many advantages, have also drawbacks like the release of toxic degradation products. Ceramic materials present well documented biocompatibility with osseous tissue, however they have excessively high modulus of elasticity, and low resistance to brittle fracture [1].

It is known now that optimal conditions for bone regeneration occur only in the case of application of implant materials which can provide osseous cells with load transfer capability close to physiological values. Such situation may appear only when using implant materials with mechanical parameters similar to bone tissue and characterized by anisotropy of mechanical parameters similar to that existing in the bone. For these reasons in recent years much attention is given to composite materials designed on the basis of microstructural pattern of osseous tissue [1-3]. Bone tissue is a highly structured composite material made of both organic and inorganic phases. Among all materials used in osseous tissue treatment, fibrous polymer composites currently appear to be the best candidates. The reinforcing architecture of the composite made of fibers (e.g. carbon) allows for broad modifications of mechanical parameters as well as for achieving the biomimetic anisotropy of these parameters. Joining such two phases as polymer and fibers leads to formation of a new material with chemical and physical parameters different from those of initial polymer. The distribution of fibers in polymer matrix affects not only its mechanical parameters, but also the surface properties, such as surface energy, roughness, etc. It seems necessary to examine the effects of fibers on polymer matrix before commencing works on design of composite materials for medical applications. It is also important to define whether composites based on polymer matrix would not be toxic for living cells [4-6].

The aim of this work was the analysis of cytotoxicity of polymer and of composites made on its basis with carbon fibers.

Materials and methods

Materials

Samples for this study were made using the terpolymer PP-PVDF-PTFE (Aldrich Chemical Co., USA with density $d=1600$, and carbon fibres TORAYCA (1400). In order to prepare the samples from initial polymer, the solution was made consisting of 5 g PTFE/PVDF/PP and 50 ml of acetone (POCh SA. Gliwice, Poland, cat. no 102480111), which was poured on Petri dishes and left for evaporation. The same solution was used for preparation of two types of

nia próbek z wyjściowego polimeru sporządzono roztwór: stosując 5 g PTFE/PVDF/PP na 50 ml acetonu (POCh SA. Gliwice, Polska, cat. no 102480111), który następnie wyla- no na szalkę Petriego i pozostawiono do odparowania. Taki sam roztwór wykorzystano do wytworzenia dwóch rodza- jów kompozytów o zróżnicowanym ułożeniu włókien. W przypadku kompozytu oznaczonego jako CP5, połączono tkaninę węglową z roztworem polimeru. Druga z próbek kompozytowych powstała przez połączenie roztworu poli- meru z tym samym rodzajem włókien węglowych, jednak- że poddanych uprzednio fragmentacji (CP4).

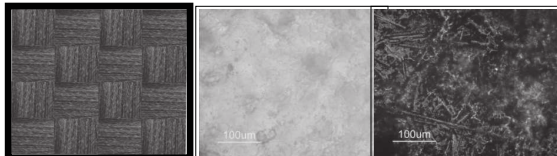
Metody

Próbki polimerowe oraz kompozyty poddano badaniom przy wykorzystaniu mikroskopu skaningowego, JSM - 5400, Jeol.

Badania cytotoksyczności wykonano w Instytucie Immu- nologii i Terapii Doświadczalnej - PAN we Wrocławiu zgod- nie z PN-EN ISO 10993-5 "Biologiczna (POCh SA. Gliwi- ce, Polska, cat. no 102480111) ocena wyrobów medyczn- ych - Część 5:"Badania cytotoksyczności: metody - in vi- tro". W tym celu wykorzystano linię komórkową A549 - linia komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc (ATCC CCL 185). Hodowlę komórek prowadzono w płynie hodow- lanym Dulbecco z dodatkiem 10% inaktywowanej (30min, 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny, 100µg/ml streptomycyny i 2mM/ml L-glutaminy i inkubowano w tem- peraturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki przeszczep- iano stosując roztwór 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2. Badania przeprowadzono metodą bezpo- średniego kontaktu biomateriałów z jednowarstwową ho- dowlą komórek A549 przez 24 oraz 72 godzinach. Na płyt- ce 24-dółkowej firmy Costar zakładano hodowlę komórek A549 o gęstości 1x10⁶/ml i inkubowano 24 godzin w tem- peraturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie usuwa- no supernatant, a jednowarstwową hodowlę komórek zale- wano 1 ml płynem hodowlanym z dodatkiem 2% surowicy cielęcej. Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów (w kształcie krążków o średni- cy 9,6 mm) i inkubowano 24, oraz 72 godziny w tempera- turze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Każdy materiał oceniano w 3 powtórzeniach (po 3 na każdy czas).

Wyniki

Na RYS. 1. przedstawiono obrazy mikroskopowe po- wierzchni próbek. Próbka z czystego polimeru ma gładką powierzchnię, natomiast na powierzchniach materiałów kompozytowych wyraźnie widoczne są włókna węglowe, pokryte warstwą polimeru. Jednakże mikrostruktura każdej z próbek jest odmienna, w pierwszej (CP5) włókna tworzą regularny układ wiązek przenikających się pod kątem 90°, natomiast druga z nich (CP4) ma powierzchnię na której



RYS. 1. Mikrostruktura próbek poddanych badaniom cytotoksyczności K1-kompozyt tkanina węglowa/polimer, K2- kompozyt krótkie włókna węglowe/polimer, K0 folia polimerowa.

FIG. 1. Microstructure of composite samples: K1- carbon fabric/polimer, K2- short carbon fibrous/ polimer, K0 - polymer foil.

composites with different spatial distribution of fibres. In the case of composite designated K-1, carbon fabric was com- bined with polymer solution. Second composite sample was made with short carbon fibres in polymer matrix (K-2)

Cell cultures: A549 cells (ATCC CCL185).The human adenocarcinoma lung cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium essential medium (DMEM) sup- plemented with 10% C.S., antibiotics (100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) and 2mM L-glutamine.

Methods

Polymer samples and composites were examined with use of scanning electron microscope Jeol JSM - 5400 (FIG.1). The morphologies of A549 cells after contact with biomaterials were observed in reversed phase-contrast microscope (FIG.2) and compared with A549 culture with- out materials tested.

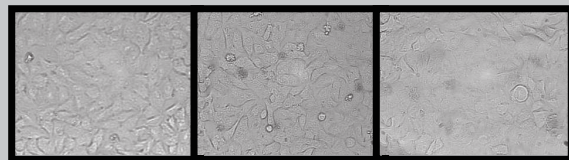
Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of the samples was determined in the hu- man cell line A549 For cytotoxicity test, the cells were seeded in the 24-well plate (Costar) 1 ml of 1x10⁶ cells/ml in the culture medium Dulbecco's with 2% calf serum, penicillin and streptomycin was deposited into each pleate. Samples of the tested biomaterials were added to prepared cells, which were then incubated for 24h, 72h at 37°C in the at- mosphere of 5% CO₂ in air. The degeneration of cells was assessed using inverted microscopy at 400x magnification.

Results

FIG. 1. shows photomicrographs of the surfaces of ob- served samples. The sample of pure polymer has smooth surface (K-0), whereas on the surfaces of composite mate- rials carbon fibres coated with polymer layer can be clearly seen. The microstructure of each sample is different; in K-1 fibres form regular pattern of bundles crossing at 90°, while on K-2 surface randomly distributed fibres of varying length can be observed.

The results of changes in cell morphologies after con- tact with the examined samples, also the results of changes in number of cells, are collected in TABLE 1. TABLE 1A presents the results after 24 hours incubation of cells A549 with the examined materials, and Table 1B shows the re- sults after 72 hours of cells contact with these biomaterials. Performed experiments and the evaluation of biomaterials cytotoxicity using the in vitro method show that none of these materials presents cytotoxic behavior. The number of de- ceased cells is very limited which, according to Standard PN-EN ISO 10993-5, indicates that these materials are sui- table for further experiments with living bodies.



RYS. 2. Morfologia komórek na powierzchniach badanych materiałów: K1-kompozyt tkanina węglowa/polimer, K2- kompozyt krótkie włókna węglowe/polimer, K0 folia polimerowa.

FIG. 2. Morphology of cells contacted with biomaterial surface: K1-carbon fabric/polimer, K2- short carbon fibrous/polymer, K0 - polymer foil.

samples	Change of morphology	Number of dead cells [%]	Number of live cells [%]	Totalny number of cells	Toxic degree
a) Cytotoxicity assessment of biomaterials contact with cells A549 after 24 hour					
K0	no effect	1	99	5,1x10 ⁶	no effect
K1	no effect	0	100	6,3 x10 ⁶	no effect
K2	no effect	0	100	6,5 x10 ⁶	no effect
kontrola		0	100	7,2 x10 ⁶	no effect
b) Cytotoxicity assessment of biomaterials contact with cells A549 after 72 hour					
K0	no effect	3	97	5,4x10 ⁶	no effect
K1	no effect	7	93	4,9 x10 ⁶	no effect
K2	no effect	5	95	5,8 x10 ⁶	o effect
kontrola		0	100	7,5 x10 ⁶	no effect

widoczne są przypadkowo rozmieszczone włókna o zróżnicowanych długościach.

Wyniki zmian morfologii komórek po kontakcie z badanymi próbkami, a także wyniki zmian ilości komórek zebrano w TABELI 1. W TABELI 1A znajduje się zestawienie wyników po 24 godzinnej inkubacji komórek A549 z badanym materiałem, natomiast w tabeli nr 1B. po 72 godzinny kontakcie komórek z tymi badanymi biomateriałami. Na podstawie przeprowadzonych badań, oceny cytotoxyczności biomateriałów metodą in vitro, wykazaliśmy, że każdy z tych materiałów nie wykazuje działania cytotoxycznego. Ilość martwych komórek jest bardzo mała, co wg normy PN-EN ISO 10993-5 wskazuje, że materiały te nadają się do dalszych badań kontaktu z żywymi organizmami. Morfologie komórek A549 po kontakcie z biomateriałami obserwowano w porównaniu do hodowli A549 (bez badanych materiałów) w odwróconym, kontrastowo-fazowym mikroskopie (RYS. 2).

Wnioski

Wszystkie próbki, zarówno polimer jak i utworzone z niego kompozyty z włóknem węglowym nie wykazują działania cytotoxycznego. Komórki linii A549 mają prawidłową morfologię (tzn. wrzecionowaty, wydłużony kształt oraz jednorodną cytoplazmę), przylegają do podłoża w postaci równomiernej warstwy .

TAB. 1. Zmiany morfologii komórek A549 na powierzchni materiałów kompozytowych (K1 i K2) oraz foli polimerowej (K0), po 24 godzinach (a) i po 72 godzinach (b).

TAB. 1. Performance of fibrous composite materials for humane cells A549.

Conclusions

None of the materials examined, neither polymer nor its composites with carbon fibers, show cytotoxic behavior. Cells of A549 line have correct morphology (extended fusiform and homogenous cyto-plasma), and they adhere to substrate surface as a uniform and even layer.

Piśmiennictwo

- [1] Gasser, B; About composite materials and their use in bone surgery Injury Volume: 31, Supplement 4, December, 2000, pp. D48-D53
- [2] S. Błażewicz, J. Chłopek, M. Błażewicz, E. Pamuła Biomateriały węglowe i kompozytowe, Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna t. IV, Biomateriały, wyd. Exit W-wa 2003
- [3] M. Błażewicz; Węgiel jako biomateriał, Prace Komisji Nauk Ceramicznych PAN, 63,2001
- [4] Szosland L., Pielka S., Paluch D., Staniszewska-Kuś J., Zywicka B., Solski L., Czarny A., Zaczynska E.: Biological properties of dibutyrylchitin and regenerated chitin. Agro Food Industry Hi-Tech., 2003, 14, 13-15.

References

- [5] Czarny A., Zaczynska E., Karpenko E., Vildalova R., Kolwzan B. Effect of Pseudomonas aeruginosa biosurfactants - alginate and rhamnolipids on human pulmonary cell line. Chemistry for Agriculture - vol. 5 pp 402-409. New Agrochemicals and Their Safe Use For Health and Environment. Edited by H. Górecki, Z. Dobrzański, P. Kafarski. 2004. Czech -Pol Trade, Prague, Brussels
- [6] Bet, M.R.; Goissis, G.; Vargas, S.; Selistre-de-Araujo, H.S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability Biomaterials Volume: 24, Issue: 1, January, 2003, pp. 131-137