

· Nadsprężyste pierścienie i sprężyny deformowane przez zginanie działają ze stałą siłą w pożądanym zakresie odkształceń.

· Opracowano nową metodę przygotowania nadsprężystych pierścieni z użyciem umocnienia wydzieleniowego wstępnie kształtowanych drutów NiTi o wyższej zawartości niklu niż w stanie równoatomowym.

## OCENA WPŁYWU WYBRANYCH MATERIAŁÓW CERAMICZNYCH NA FIBROBLASTY I OSTEObLASTY W HODOWLI IN VITRO

ANNA CHRÓŚCICKA\*, PIOTR WOŹNIAK\*, RADOŚLAW OŁKOWSKI\*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA - SZUMIEŁ\*, SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI\*\*, ZBIGNIEW JAEGERMANN\*\*, JOANNA KARAS\*\*

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

\*\*INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI W WARSZAWIE

*[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 39-41]*

### Wstęp

Uzyskanie materiału odpowiedniego do stworzenia trójwymiarowego nośnika dla żywych komórek i jego wykorzystanie w inżynierii tkankowej jest celem wielu aktualnie prowadzonych badań. Wiadomo, że materiał taki powinien umożliwiać przyleganie, odpowiedni wzrost, proliferację i różnicowanie komórek. Duże zainteresowanie budzą nośniki ceramiczne oparte na węglanie wapnia. Z pierwszych prób wykonanych zarówno na materiałach naturalnych będących aragonitowymi szkieletami koralowców madreporynych, jak i syntetycznie otrzymanych materiałach kalcytowych wynika, że są one nie tylko biozgodne i resorbowalne, ale również bardzo dobrze tolerowane przez tkankę kostną [1-3]. Obecnie możliwe jest uzyskanie wysokoporowatych tworzyw kalcytowych w postaci pianek o różnej porowatości i wielkości porów. Taka tekstura biomateriału umożliwi łatwe zasiedlenie nośnika komórkami, a w warunkach in vivo także powstanie odżywczych naczyń krwionośnych [4].

Celem niniejszej pracy było zbadanie zachowania się komórek w kontakcie z wybranymi biomateriałami ceramicznymi. W doświadczeniu użyto kilku odmian materiałów kalcytowych o różnej porowatości i różnym udziale procentowym węgla wapnia. Badano wpływ tych materiałów na ludzkie komórki (fibroblasty i osteoblasty) w hodowli in vitro.

### Materiały i metody

Wszystkie użyte do doświadczeń materiały kalcytowe zostały wytworzone w Zakładzie Badawczo-Produkcyjnym Bioceramiki Instytutu Szkła i Ceramiki w Warszawie. Do

and Technologies. 2 (2001) 85.

[4] H. Morawiec, Z. Lekston, J. Drugacz, Proceedings of the Materials and Processes for Medical Devices Conference, Anaheim, California, USA, 8-10 September, 2004, 444, Ed. by Sanjay Shrivastava.

[5] Z. Lekston, H. Morawiec, J. Drugacz, Mat. Sci. and Eng. (2004) 1737.

## HUMAN FIBROBLASTS AND OSTEObLASTS IN CONTACT WITH CALCIUM CARBONATES

ANNA CHRÓŚCICKA\*, PIOTR WOŹNIAK\*, RADOŚLAW OŁKOWSKI\*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA - SZUMIEŁ\*, SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI\*\*, ZBIGNIEW JAEGERMANN\*\*, JOANNA KARAS\*\*

\*DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

\*\*INSTITUTE OF GLASS AND CERAMICS, WARSAW

*[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 39-41]*

### Introduction

There is a growing interest in three dimensional scaffolds for transplantation of viable cells. It is well known that the material which could serve as a scaffold should allow for adherence, growth, proliferation and differentiation of the cells growth. One of the candidate materials are ceramic scaffolds based upon calcium carbonate.

The first studies of natural materials and artificially obtained calcium carbonate show that both of them are not only biocompatible and resorbable but well tolerated by the bone tissue as well [1-3]. It is now possible to obtain greater porosity calcium carbonate materials in a form of sponge with variable porosity and size of individual pores. Such a structure of the biomaterial allows easy inhabitation of cells within the scaffold allowing also for development of blood vessel [4].

The purpose of the study presented here was to elucidate the behavior of human cells in contact with different calcium carbonate materials. Five biomaterials with different porosity and different content of calcium carbonate were used in to determine their influence on human cells (fibroblasts and osteoblasts) culture in vitro.

### Materials and methods

All calcite materials were made in Institute of Glass and Ceramics in Warsaw. Calcites of five types, each having different porosity and size were used. In addition materials varied in pore structure. Specification of the materials presents as follows: 2 calcites profiles (material "1" - 99% CaCO<sub>3</sub>+1% LiF; material "2" - 95% CaCO<sub>3</sub>+5% LiF) and 3 in the form of sponge (material "3" - 95% CaCO<sub>3</sub>+5% LiF; material "4" - 99% CaCO<sub>3</sub>+1% LiF; material "5" - 99%

doświadczeń użyto 5 rodzajów tworzyw różniących się m. in. porowatością i wielkością porów: 2 w formie kształtek prasowanych (materiał "1" - 99% CaCO<sub>3</sub>+1% LiF; materiał "2" - 95% CaCO<sub>3</sub>+5% LiF) oraz 3 w postaci pianek (materiał "3" - 95% CaCO<sub>3</sub> + 5% LiF; materiał "4" - 99% CaCO<sub>3</sub>+1% LiF; materiał "5" - 99% CaCO<sub>3</sub>+1% LiF. Materiały "4" i "5" różniły się sposobem przygotowania).

Wszystkie doświadczenia prowadzono w standardowych 24-studzienkowych płytkach polistyrenowych do hodowli komórkowych. Jako pożywkę hodowlaną użyto roztworu DMEM z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), L-glutaminy (2mM) i antybiotyku (1%). Pożywka do hodowli osteoblastów dodatkowo zawierała witaminę C. Hodowle prowadzono w inkubatorze zapewniającym stałą temperaturę (37°C), wysoką wilgotność (90%) oraz atmosferę 5% CO<sub>2</sub>. W grupie kontrolnej komórki hodowano na standardowym podłożu do hodowli komórkowych. Przeprowadzono 2 doświadczenia:

1) Badano równolegle wpływ 5 wybranych materiałów kalcytowych na hodowlę fibroblastów i osteoblastów. Materiały przyklejono acetonom do dna studzienek i wysiano na nie komórki. W czasie eksperymentu prowadzono obserwacje morfologiczne w odwróconym mikroskopie (Nikon Eclipse TE 2000-U), zaś po 9 dniach hodowli wykonano test aktywności mitochondrialnej komórek (XTT) oraz barwienie fioletem krystalicznym (FK).

2) Wybrano próbki tworzyw kalcytowych w postaci pianek oznaczone "3", "4" i "5". Próbkę zalano buforowaną pożywką (HEPES) i wytrząsano w celu usunięcia powietrza zamkniętego w porach materiału. Następnie usunięto pożywkę i na tak przygotowanych podłożach wysiano komórki. Po 3 dniach pożywkę wymieniono. W czasie eksperymentu prowadzono obserwacje morfologiczne, a następnie wykonano test XTT oraz FK. Celem uwidocznienia komórek w porach materiału do doświadczenia użyto osteoblastów zabarwionych fluorescencyjnie (CFSE).

Materiały Materials	Doświadczenie 1 Experiment 1		Doświadczenie 2 Experiment 2	
	Fibroblasty Fibroblasts	Osteoblasty Osteoblasts	Osteoblasty niezabarwione Osteoblasts	
	XTT	FK	XTT	FK
(% kontroli) / (% of control)				
„1”	28,95	10,02	—	—
„2”	38,46	3,10	—	—
„3”	22,08	14,67	57,78	115,91
„4”	17,12	21,18	1,78	18,26
„5”	41,82	149,40	32,49	269,24

**TABELA 1. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Wartości są przedstawione w procentach w stosunku do kontroli.**

**TABLE. 1 Results of the experiments. The values are shown as a percentage of control.**

## Wyniki

W czasie obserwacji morfologicznych prowadzonych podczas pierwszego doświadczenia stwierdzono, że większość komórek nie rozpląszcza się w kontakcie z biomateriałami, duża ich część była martwa. Obraz morfologiczny części komórek odpowiadał zmianom zachodzącym w pro-

CaCO<sub>3</sub>+1% LiF were used. The materials "4" and "5" had a different kind of preparation).

All experiments were prepared in a standard polystyrene, 24-wells culture plates. The cells were cultured in DMEM modified with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2mM), antibiotic (1%), at standard conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub> in humidified atmosphere). The culture of osteoblasts medium was supplemented with L-ascorbic acid. Simultaneously the control cells were seeded on the standard polystyrene cell culture surface.

The experiment consisted of two parts:

1) The influence of the 5 above described biomaterials on the culture of osteoblasts and fibroblasts was examined. The cells were seeded on the materials previously attached to the wells. The cell morphology was examined during the study using a microscope (Nikon Eclipse TE 2000-U). After 9 days two tests were performed, i.e.: XTT test, which indicates viability of cells in culture and crystal violet staining (FK).

2) 3 sponge materials ("3", "4" and "5" of the ones described above) were chosen for further observation. A buffer medium (HEPES) has been poured over the samples. It was further shaken in order to remove air from the pores of materials and removed. Cells were then seeded upon such prepared scaffold. After 3 days the medium was changed. During that study the cell morphology was observed and after 9 days two tests were performed (XTT and FK). Fluorescent (CFSE) labeled osteoblasts were used in order to make observation of the cells in the pores of the materials possible.

## Results

Morphological observation, which was made during the first experiment, shows that the majority of the cells were not spread around the biomaterials. Many cells were dead. Morphological picture of these cells corresponded with the characteristic image of apoptotic cells.

In the second experiment, where plates with biomaterials were shaken, the morphological observation shown much fewer cells around the material "3" as compared to the control. The cells were not spread. On the contrary, there were a lot of cells spread in the contact with material "5". The CFSE labeled cells penetrated deeply into the pores of the materials as visualized in fluorescent microscopy.

Results of the tests are shown in TABLE 1.

## Discussion

Results of experiments conducted on chosen calcite materials, prove that the way the cells are seeded upon the 3D scaffolds, strongly influences behavior of the cells in the culture. Results of the experiments performed were compared on a basis of the cell amount determined by means of FK test.

Low cell viability observed in the first experiment, was most likely caused by a high alkalization of the media and entrapment of high amount of the air within pores of the materials. Change of the methodology of the medium application to the material resulting in the air removal and use of the buffered medium positively influenced cell in culture as can be judged on the basis of cell morphology. Among calcite materials used in the study, the "5-th" ones seems the most promising (the highest number of cells present on its surface, the best spreading and adherence of the cells). It should be mentioned that low XTT test results may indicate handicapped mitochondrial activity of the cells or the

cesie apoptozy.

W doświadczeniu drugim, w którym zastosowano wytrząsanie płytek z biomateriałami, w czasie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że w otoczeniu materiału "3" komórki nie rozplaszczają się i jest ich dużo mniej niż w kontroli. Na materiale "5" było dużo rozplaszczonych komórek. W mikroskopie fluorescencyjnym uwidoczniło się zabarwienie CFSE komórki w porach materiału.

Wyniki wszystkich przeprowadzonych testów zostały przedstawione w TABELI 1.

## Dyskusja i wnioski

Wyniki badań prowadzonych na wybranych tworzywach kalcytowych udowadniają, że sposób przesycania trójwymiarowego rusztowania medium hodowlanym ma istotny wpływ na odpowiedź komórek w hodowli. Podstawą porównania otrzymanych wyników była liczebność komórek określona na podstawie wyniku testu FK. Niska przeżywalność komórek zaobserwowana w pierwszym doświadczeniu, które miało charakter wstępny, była prawdopodobnie spowodowana silną alkalizacją środowiska i zamknięciem dużych ilości powietrza wewnątrz porów materiału. Z obserwacji morfologii komórek wynika, iż zmiana sposobu osadzania próbek umożliwiającą usunięcie pęcherzyków powietrza, użycie innego medium hodowlanego oraz jego wymiana w trakcie doświadczenia ma korzystny wpływ na hodowlę komórkową. Spośród badanych biomateriałów kalcytowych wyraźnie wyróżnia się materiał "5", który może okazać się najlepszym podłożem do hodowli komórek *in vitro* (najwyższa liczebność komórek, najlepsze przyleganie i rozplaszczanie się komórek). Co prawda wyniki testu XTT w populacji komórek hodowanych na podłożu tego materiału są niskie, co mogłoby wskazywać na upośledzoną aktywność mitochondrialną komórek lub też mniejszą liczbę żywych komórek pozostających w kontakcie z tym materiałem. Nie zgadza się to jednak z obrazem morfologicznym wskazującym na bardzo dobrą tolerancję komórek względem tego materiału. Wydaje się, że wyniki testu XTT mogą być obciążone wysokim błędem wynikającym z trójwymiarowej struktury materiału. Trwają prace nad dostosowaniem tej metody do specyficznych warunków hodowli w trójwymiarowym rusztowaniu.

Fluorescencyjne znakowanie komórek w doświadczeniu drugim umożliwiło obserwację ich wnikania do wnętrza próbek kalcytowych. Potwierdza to skuteczność zastosowanej techniki osadzania komórek w trójwymiarowym rusztowaniu ceramicznym.

Przedstawione tu wyniki są bardzo zachęcające, mają jednak wstępny charakter i wymagają potwierdzenia. Planuje się dalsze prace nad oceną biomateriałów kalcytowych jako potencjalnych nośników dla komórek w inżynierii tkankowej.

## Podziękowania

Praca finansowana przez KBN w ramach projektu badawczego zamawianego Nr 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06.

lower number of viable cells in contact with the material. However, it is accompanied by a good spreading of cells in contact with the material as visualized under the microscope. This would indicate a good biocompatibility of this calcite material. XTT test results might be misleading as a consequence of the 3D structure of the material. XTT method is now being adjusted to the specific condition of the 3D scaffolds.

Fluorescent labeling of the cells in the second experiment allowed their observation upon the entry inside calcite samples. It proves that the seeding method used in the second experiment enables cell migration into 3D ceramic scaffolds.

The results presented seems promising. They are however only preliminary and further works on the valuation of the calcite biomaterials as potential scaffolds in the tissue engineering will be conducted.

## Acknowledgements

Conducted work was supported by KBN grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06.

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Ohgushi, H., et al., Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*, 26(7), (1992), p. 885-95.
- [2] Guillemin, G., et al., Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. *J Biomed Mater Res*, 23(7), (1989), p. 765-79.
- [3] Guillemin, G., et al., The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res*, 21(5), (1987), p. 557-67.
- [4] Jaegermann, Z., J. Karaś, and S. Michałowski, Porous structures of ceramic materials used as scaffolds for living cells for application in tissue engineering. *Engineering of Biomaterials*, (2003), p. 12-14.