

PRZYDATNOŚĆ KOMPOZYTU WĘGIEL- ŻYWICA EPOKSYDOWA JAKO MATERIAŁU DO ZESPOLEŃ KOŚCI - PRACA DOŚWIADCZALNA

GRZEGORZ BAJOR*, ZBIGNIEW PASZENDA**

*KATEDRA I ODDZIAŁ KLINICZNY CHIRURGII DZIECIĘCEJ ŚLĄSKIEJ
AKADEMII MEDYCZNEJ W BYTOMIU

**INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH
POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ W GLIWICACH

Streszczenie

Badania przeprowadzono na ośmiu królikach, którym wszczepiono do światła kanału szpikowego grot z kompozytu węgiel-żywica epoksydowa pokryty hydroksyapatytem /C-ep-Hap/. Przeprowadzono badania strefy rozdziału pomiędzy implantem C-ep-Hap, a tkanką kostną oraz powierzchni bocznej implantu. Obserwacje przeprowadzono w elektronowym mikroskopie skaningowym DSM-940 firmy OPTON. Dla potrzeb badań przygotowano przekroje poprzeczne implantu łącznie z tkanką kostną. W przedstawianym materiale obserwowano bardzo wolno postępującą degradację kompozytu od obwodu implantu. Dopiero w końcowej fa-zie doświadczenia widać masywne przyleganie nowej tkanki kostnej do wolnych fragmentów kompozytu. Natomiast na przekroju poprzecznym implant sprawiał wrażenie nienaruszonego. Tak powolny proces biodegradacji kompozytu zapewnia samej uszkodzonej kości silniejszą i dłuższą stabilizację. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji uzyskano zachęcające wyniki stwarzające większe kliniczne możliwości stosowania kompozytu C-ep-Hap niż kompozytu węgiel-węgiel.

Słowo kluczowe: biomateriały, polimery termoutwardzalne, kompozyt węgiel-żywica epoksydowa, hydroksyapatyt, badania doświadczalne, materiały węglowe, elektronowy mikroskop skaningowy

Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój badań doświadczalnych i klinicznych w ortopedii i traumatologii dorosłych nad możliwościami stosowania nowych biomateriałów tworzy nowe możliwości także dla chirurgii dziecięcej [2,4,6,9]. Pozytywne wyniki doświadczalne dotyczące implantów węglowych zachęcają do stosowania podobnych kompozytów ale o poprawionych własnościach mechanicznych [1,3,8,9].

W oparciu o wcześniej prowadzone badania doświadczalne na kompozytach węgiel-węgiel prócz szeregu ich zalet stwierdzono, że mają także wady w postaci dużej kruchości, łamliwości i tendencji do przedwczesnej fragmentacji [1,5,8]. Problem ten nie występuje, jeżeli włókna węglowe wprowadzone są do odpowiedniej osnowy stanowiącej element zbrojący dla struktur organicznych, two-

APPLICABILITY OF A CARBON-EPOXY RESIN COMPOSITE AS A MATERIAL FOR OSTEOSYNTHESIS - EXPERIMENTAL APPROACH

GRZEGORZ BAJOR*, ZBIGNIEW PASZENDA**

*DEPARTMENT OF PAEDIATRIC SURGERY IN BYTOM, SILESIA MEDICAL
ACADEMY IN KATOWICE

**INSTITUTE OF ENGINEERING AND BIOMEDICAL MATERIALS, SILESIA
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY IN GLIWICE

Abstract

Investigations were carried out using eight rabbits, which were inserted, into the marrow cavity, a pin made of hydroxyapatite-coated carbon-epoxy resin composite (C-ep-Hap). Examined was the C-ep-Hap implant and bone tissue interphase, as well as the lateral implant surface. Observations of the transverse sections of the implant along with the bone tissue under the OPTON DSM-940 scanning electron microscope indicated very slow degradation of the composite from the implant circumference. In the final stage of the experiment, only massive adhesion of the new bone tissue to the free composite fragments was visible. However, the implant seemed intact on its transverse section. The slow biodegradation of the composite ensures the damaged bone a stronger and longer stabilisation. The obtained results are encouraging and indicate better possibilities for clinical use of the C-ep-Hap composites in comparison with the carbon-carbon ones.

Keywords: biomaterials, thermosetting polymers, carbon-epoxy resin composite, hydroxyapatite, experimental research, carbon materials, scanning electron microscope.

Introduction

Dynamic development of experimental and clinical research in the area of application of new biomaterials in orthopaedics and traumatology of adults gives also new prospects for the paediatric surgery [2,4,6,9]. The positive experimental results pertaining to the carbon composites encourage employment of similar composites, but with improved mechanical properties [1,3,8,9].

Basing on the results of previous research on the carbon-carbon composites, it has been stated that - apart from many advantages - they have also some deficiencies, such as significant brittleness, fragility, and tendency to premature fragmentation [1,5,8]. This problem does not occur when the carbon fibres are placed in a matrix, playing a role of reinforcement for the organic structure, i.e. in the case when homogenous composite material is formed [3]. Owing to the development of carbon fibre - polymer composites, suitable flexibility was obtained with

rząc lity materiał kompozytowy [3]. Wskutek wytworzenia kompozytu włókno węglowe-polimer uzyskano odpowiednią elastyczność i nadal dobrą tolerancję przez organizm żywy. Kompozyt ten nie ulega korozji takiej jak materiały metaliczne. Ponadto jest on lekki i przezroczysty dla promieniowania rentgenowskiego. Dodatkową poprawę własności tego kompozytu uzyskano poprzez pokrycie go materiałem bioaktywnym w postaci hydroksyapatytu [10, 12]. Dla tych celów jako polimeru tworzącego osnowę użyto żywicy epoksydowej należącej do grupy materiałów termoutwardzalnych.

Cel pracy

1. Ocena przydatności kompozytu węgiel-żywica epoksydowa pokrytych hydroksyapatytem dla celów medycznych.
2. Określenie wpływu hydroksyapatytu naniesionego na powierzchnię implantów na aktywność biologiczną ich powierzchni.

Materiał i metody

Przeprowadzono badania kompozytu węgiel-żywica epoksydowa pokrytego hydroksyapatytem, który wprowadzono do światła kanału szpikowego królików w okresie wzrostu kostnego. Do eksperymentu użyto osiem królików o masie ciała nie przekraczającej 2500 g. Miejsce eksperymentu oraz szczegółowe warunki przebywania zwierząt po zabiegach operacyjnych zostały określone w poprzednich publikacjach. Czas obserwacji zwierząt doświadczalnych obejmował okresy 4, 14, 18, 20, 22 tygodni.

Po założonym okresie implantacji badane próbki poddano obserwacji w elektronowym mikroskopie skaningowym. Szczególną uwagę zwrócono na strefy rozdziału implantu C-ep-Hap, a tkanką kostną oraz na powierzchnię boczną implantu. Obserwacje prowadzono w elektronowym mikroskopie skaningowym DSM-900 firmy OPTON w zakresie powiększeń 10 - 3000 x. Dla potrzeb realizacji tego eksperymentu przygotowano przekroje poprzeczne implantów łącznie z tkanką kostną. Poszczególne próbki do badań cięto, płukano a następnie suszono strumieniem ciepłego powietrza.

Omówienie materiału

Dokonane obserwacje w elektronowym mikroskopie skaningowym na próbkach zwierząt doświadczalnych po 4 tygodniowym okresie implantacji wykazały bardzo dyskretne zmiany w strukturze. Jednolita powierzchnia przekroju implantu wypełniała jeszcze całą jamę szpikową. Pomimo procesu osuszania nie doszło do pęknięcia materiału implantowanego, co świadczyłoby o jego nienaruszonej strukturze wewnętrznej (RYS.1). Jednak obserwacje przy większym powiększeniu ujawniły na powierzchni implantu rozluźnienie struktury przy zachowanej niezmięnionej strukturze centralnej. Obserwuje się liczne, linijnie biegnące włókna ściśle przylegające do wewnętrznej powierzchni kości. Sprawiają wrażenie jakby były odrywane od powierzchni implantu (RYS.2). Ponadto zaobserwowano wnikanie świeżej tkanki kostnej, która pokrywa skupiska włókien węglowych. Wolne włókna wystające ze struktury kompozytu utraciły już osnowę i ulegają fragmentacji (RYS.3).

Obserwacje próbek reprezentujących 14 i 18 tydzień po implantacji materiału wykazują zbliżony ich obraz. Zarysowują się liczne szczeliny pęknięć biegnące w kierunku centralnym, a z powierzchni zostały oderwane fragmenty implantu. Świadczy to o postępującym procesie biodegradacji i trwałym połączeniu ze strukturami kości zwierzęcia (RYS.4). Badania strefy rozdziału implant - tkanka kostna

acceptable tolerance by a living organism. Unlike metallic materials, this composite is not prone to corrosion. Moreover, it is lightweight and transparent to X-rays. An additional improvement of the composite characteristics was obtained by coating it with hydroxyapatite - a bioactive material [10,12]. Thermosetting epoxy resin was used as a polymer constituting the matrix.

The aims of the project were the following:

1. Assessment of the applicability of the carbon-epoxy resin composite, coated with hydroxyapatite, for medical purposes.
2. Determination of the effect of hydroxyapatite, deposited on the surface of implants, on the biological activity of their surface.

Materials and methods

The hydroxyapatite-coated carbon-epoxy resin composite was introduced into the marrow cavity of rabbits in their bone growth period. Eight rabbits were used for the experiment with the body weight not exceeding 2500 g. The examination site and the detailed conditions in which the animals stayed after their operations were described in previous papers. Observation periods of the test animals were 4, 14, 18, 20, and 22 weeks.

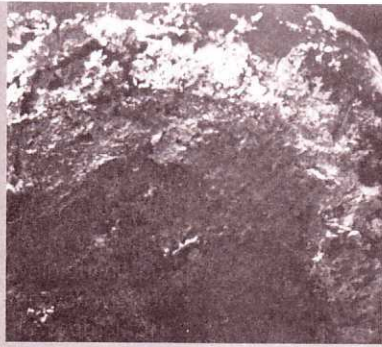
The investigated samples were examined under the scanning electron microscope after the planned implantation periods. Particular attention was paid to the C-ep-Hap implant and bone tissue contact zones, and to the implant lateral surface. Examinations were carried out using the OPTON DSM-900 scanning electron microscope in the magnification range 10-3000 x. Cross-sections of the implants along with the bone tissue were prepared for the examination. Samples were cut, rinsed and dried in a warm air stream.

Results

SEM examination of samples of the test animals after a 4-weeks-long implantation period revealed very subtle structural changes. The uniform implant cross-section surface still filled the entire marrow cavity. The implanted material did not crack in spite of drying process, which proved its internal integrity (FIG.1). However, observations made at a higher magnification revealed some slackening of the implant surface structure with yet unchanged bulk structure. Multiple linear fibres were observed, adhering closely to the inner surface of the bone. They gave the impression of having been torn off the implant surface (FIG.2). Moreover, penetration of a new bone tissue was observed, coating the carbon-fibre clusters. Some loose fibres protruding from the composite structure underwent fragmentation (FIG.3).

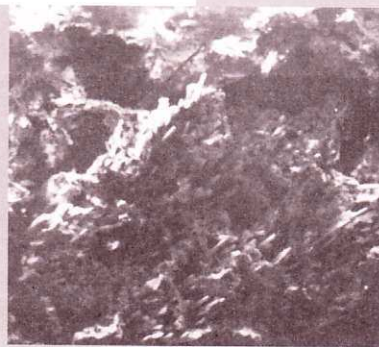
Examinations of samples 14 and 18 weeks after the implantation revealed a similar picture. Multiple cracks propagating inwards were visible, and the implant fragments were torn away from the surface. This indicated progress of biodegradation and stable connection with the animal bone structures (FIG.4). Examinations of the implant - bone tissue separation zone revealed damages of the implant lateral surface, loose carbon fibre fragments covered with a new bone tissue, and fibre fragments grown into the inner surface of the marrow cavity (FIG.5).

Examinations of samples after 20 and 22 weeks of the experiment, revealed similar SEM images. Degradation in the form of loose carbon fibres detached from the implant surface was observed. Filling of the free space with a new bone tissue was clearly visible at the phase boundary,



RYS.1. Kompozyt węgiel-żywica epoksydowa z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem, 4 tydzień po implantacji, 20x.

FIG.1. Carbon-epoxy resin composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 4 weeks after implantation, 20x.



RYS.2. Kompozyt węgiel-żywica epoksydowa z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem, 4 tydzień po implantacji, 100x.

FIG. 2. Carbon-epoxy resin composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 4 weeks after implantation, 100x.



RYS.3. Kompozyt węgiel-żywica epoksydowa z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem, 4 tydzień po implantacji, 200x.

FIG.3. Carbon-epoxy resin composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 4 weeks after implantation, 200x.

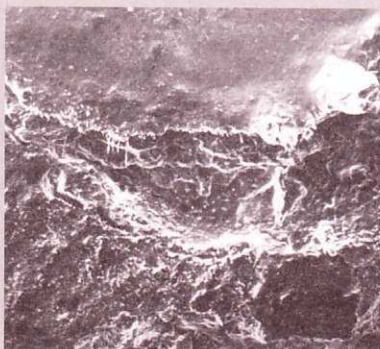
wykazały naruszenie powierzchni bocznej materiału, obecność wolnych fragmentów włókien węglowych oklejonych świeżą tkanką kostną oraz wrosniętych fragmentów włókien w wewnętrzną powierzchnię kanału szpikowego (RYS.5).

Obserwacja próbek reprezentujących 20 i 22 tydzień doświadczenia wykazuje podobne obrazy w mikroskopie skaningowym. Na powierzchni implantu spostrzega się degradację w postaci uwalnianych pojedynczych włókien węglowych, które odstają od samego implantu. Na granicy faz wyraźnie widać wypełnienie wolnej przestrzeni świeżą tkanką kostną świadcząca za stymulującym oddziaływaniem tak kompozytu, jak i hydroksyapatytu (RYS.6). Znaczna część implantu uległa już degradacji i wypełnieniu świeżą tkanką kostną, o czym świadczą wyraźnie



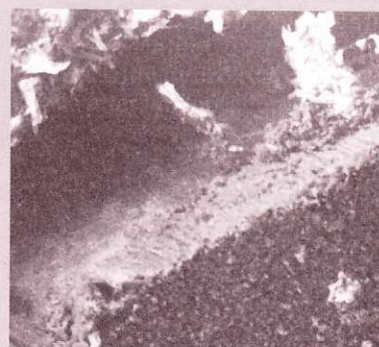
RYS.4. Kompozyt węgiel-żywica epoksydowa z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem, 14 tydzień po implantacji, 50x.

FIG.4. Carbon-epoxy resin composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 14 weeks after implantation, 50x.



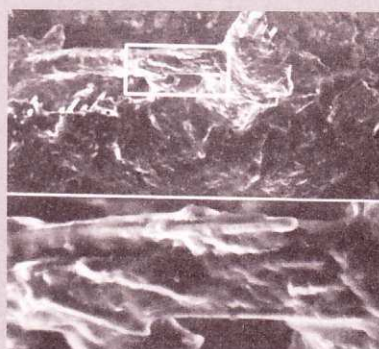
RYS.6. Kompozyt węgiel-żywica epoksydowa z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem, 22 tydzień po implantacji, 20x.

FIG.6. Carbon-epoxy resin composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 22 weeks after implantation, 20x.



RYS.5. Kompozyt węgiel-żywica epoksydowa z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem, 14 tydzień po implantacji, 200x.

FIG.5. Carbon-epoxy resin composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 14 weeks after implantation, 200x.



RYS.7. Kompozyt węgiel-żywica epoksydowa z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem, 22 tydzień po implantacji, 100x.

FIG.7. Carbon-epoxy resin composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 22 weeks after implantation, 100x.

testifying to the stimulating effect of both the composite and hydroxyapatite (FIG.6). A significant portion of the implant was already degraded and filled with a new bone tissue, boundaries between the compact bone and outer part of the implant undergoing restructuring and calcification as well as still intact inner part of the composite were clearly discernible. Rapid development of the new bone tissue was observed at high magnification around the remaining single carbon fibres (FIG.7). The space between the fibres was tightly filled with the new bone tissue, which constituted a stable connection between the fibres. It was difficult to find the outlines of single carbon fibres in the area of massively progressing bone tissue regeneration.

rysujące się dwie granice; pomiędzy kością zbitą, a podlegającą przebudowie i uwapnieniu częścią obwodową implantu oraz jeszcze nienaruszoną centralnie strukturą kompozytu. Przy znacznym powiększeniu obrazu zauważa się burzliwy rozrost świeżej tkanki kostnej wokół zachowanych pojedynczych włókien węglowych (RYS.7). Przestrzenie pomiędzy włóknami są ściśle wypełnione świeżą tkanką kostną, która trwale zespala poszczególne włókna. W obrębie zachodzących masywnie procesów odnowy tkanki kostnej zaledwie udaje się określić zarysy pojedynczych włókien węglowych.

Dyskusja

Dotychczas proponowane materiały węglowe charakteryzowały się pozytywnymi cechami polegającymi na możliwości ich biodegradacji [1,2,7,9]. Niestety, znaczna kruchość tych materiałów zapoczątkowała poszukiwania i próby doświadczalne zmierzające w kierunku opracowania kompozytu o wyższych walorach wytrzymałościowych przy jednoczesnym zachowaniu właściwości samego kompozytu węgiel-węgiel [3,6,7,9,11]. Takie wymogi wydaje się spełniać kompozyt węgiel-żywica epoksydowa.

Badania w elektronowym mikroskopie skaningowym są świadectwem powolnych procesów biodegradacji postępującym od obwodu implantowanego materiału. Zapewnia to większą stabilizację odłamów kostnych, przy jednoczesnej odbudowie świeżej kości opartej na włóknach węglowych. Obserwowano powolny proces pęknięcia struktury materiału podążający w głąb implantu. W stosowanych kompozytach węgiel-węgiel te zjawiska zachodziły już we wczesnych okresach doświadczenia. Obserwuje się bardzo ściśle połączenie uwolnionych włókien kompozytu z kością zbitą zwierzęcia. Mimo pojawiania się świeżej tkanki kostnej pomiędzy włóknami nadal zachowują one wyraźne granice i kształty. Przez długi okres obserwacji nie spostrzega się fragmentacji włókien, typowej dla kompozytu węgiel-węgiel. Gwałtowne osuszanie preparatów nie powoduje ich obkurczania. Świadczy to o ścisłym połączeniu obwodowych warstw implantu z kością, jak również długo nienaruszonej struktury wewnątrz implantu. W końcowej fazie doświadczenia obserwuje się trwałe połączenie implantu z kością zwierzęcia, na którą niewątpliwie wpływa obecność hydroksyapatytu.

Przeprowadzone obserwacje w elektronowym mikroskopie skaningowym wykazały, że kompozyt węgiel-żywica epoksydowa może być przydatny w traumatologii dziecięcej. Zastosowanie tego rodzaju materiału kompozytowego łączy w sobie cechy wytrzymałościowe materiału z wymaganiami biomechanicznymi rekonstruowanego narządu. Jednocześnie materiał ten zachowuje określoną aktywność biologiczną implantu, wspomaganą poprzez obecność na powierzchni hydroksyapatytu, stymulującą proces tworzenia tkanki kostnej [10,11].

Wnioski

1. Wyniki badań kompozytu węgiel-żywica epoksydowa z warstwą hydroksyapatytu w elektronowym mikroskopie skaningowym wskazują na możliwość jego zastosowania w traumatologii dziecięcej.
2. Naniesienie warstwy hydroksyapatytu na powierzchni implantów wytworzonych z badanego kompozytu wpływa stymulująco na proces tworzenia nowej tkanki kostnej.

Discussion

Carbon materials proposed to date had the advantage of being biodegradable [1,2,7,9]. Unfortunately, their significant brittleness was a drawback that required further research aimed at the development of composite materials with better mechanical properties, yet maintaining the properties of the carbon-carbon composite [3,6,7,9,11]. It seems that the carbon-epoxy resin composite meets these requirements.

SEM examinations indicate low rate of biodegradation proceeding from the perimeter of the implanted material. This ensures better stability of the fractured bone fragments, with simultaneous regeneration of a new bone on a carbon-fibre support. The observed crack formation and propagation into the implant was slow. Similar phenomena occurred already at the early stages of experiments with the carbon-carbon composites. Very tight connection is formed between the released composite fibres and the compact bone of an animal. In spite of the new bone tissue development between the fibres, their boundaries and shapes are distinctly discernible. No fragmentation of fibres, typical of the carbon-carbon composites, is noticed after long observation times. Rapid drying of the specimens does not cause shrinking, which indicates tight connection of the outer layers of the implant with the bone as well as preserved intact inner structure of the implant. At the final stage of the experiment, permanent union of the implant with the animal bone is observed, which is undoubtedly affected by the presence of hydroxyapatite.

SEM examinations demonstrated that the carbon-epoxy resin composite might be useful in the paediatric traumatology. Composite materials of this type have good mechanical properties and satisfy the biomechanical requirements of the reconstructed organ. Simultaneously, they exhibit relevant biological activity due to the presence of surface layer of hydroxyapatite, stimulating bone-tissue formation [10,12].

Conclusions

1. Results of SEM examinations of the carbon-epoxy resin composite with hydroxyapatite coating indicate a possibility of its application in the paediatric traumatology.
2. Deposition of the hydroxyapatite coating on the surface of implants made of the investigated composite stimulates the process of new bone-tissue formation.

Piśmiennictwo

References

- [1] Bajor G., Paszcenda Z., Bohosiewicz J., Marciniak J.: Badania kompozytu węglowego w mikroskopie skaningowym po wszczepieniu do tkanki kostnej zwierząt. Inżynieria Biomateriałów, 7-8 (1999), 37-43.
- [2] Górecki A., Kuś W., Błażewicz S., Chłopek J., Powroźnik A.: Możliwości zastosowania materiałów węglowych w chirurgii narządu ruchu. Chir. Narz. Ruchu, 55, 2, (1990), 131-138.
- [3] Chłopek J., Błażewicz S., Pamuła M., Wajler C., Staszów E.: Carbon and polymer composites in bone surgery. Materiały konferencyjne Euromat'99, 27-30.09.99, München, Niemcy.
- [4] Baczuk K., Bielecki K.: Zastosowania polskich materiałów węglowych w medycynie. Post. Nauk. Med., 8, 1, (1995), 45-47.
- [5] Pogorzelska-Stronczak B., Cieślak T.: Zastosowania włóknistych materiałów węglowych w medycynie. Czas. Stomat., 49, 5, (1996), 340-344.
- [6] Evans S.L., Gregson P.J.: Composite technology in load-bearing orthopedic implants, Biomaterials, 19 (1998), 1329-1342.

[7] Chłopek J.: Kompozyty węgiel-węgiel. Otrzymywanie i zastosowanie w medycynie. Polski Biuletyn Ceramiczny, Ceramika, 52, Kraków 1997.

[8] Bajor G., Błażewicz M., Bohosiewicz J., Chłopek J., Stoch A.: Badania powierzchni kompozytów węglowych pokrytych hydroksyapatytem po implantacji. Inżynieria Biomateriałów, 3, (1998), 21-27.

[9] Chłopek J.: New materials orthopedic screws, Acta Montana (in print).

[10] Shiota T.: Healing around hydroxylapatite coated istal- led with revascularized bone graft. Proc. of Congr. of JAOP, Hamburg 1992.

[11] Chłopek J., Stoch A., Degórska B., Kmiecński W.: Composite stems for dog's hip-joint endoprotheses, International Conference of Biomaterials Cracow '99, 30.05-02.06.99. Inżynieria Biomateriałów (in print).

[12] Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z.: Hydroksyapatyt jako materiał implantacyjny. Ceramika, 46, 8, (1994), 155-158.

POŁĄCZENIE DWÓCH METOD TESTOWANIA BIOMATERIAŁÓW IN VITRO

D. KUDELSKA-MAZUR*, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*, J. KOMENDER*, G. BENKE**

*ZAKŁAD TRANSPLANTOLOGII I CENTRALNY BANK TKANEK, INSTYTUT BIOSTRUKTURY, AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE.

**KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDYCZNA AKADEMII MEDYCZNEJ W WARSZAWIE.

Streszczenie

W pracy przedstawiono połączenie dwóch metod testowania biomateriałów w układzie *in vitro*. W doświadczeniu wykorzystano osteoblasty i fibroblasty ludzkie otrzymane z hodowli pierwotnych. Komórki wysiano na powierzchnię próbek materiałów: hydroksyapatytu, tlenku glinu i stali chirurgicznej. Zbadano żywotność, liczbę i rozplaszczanie komórek. Żywotność oznaczono w teście XTT (ELISA). Komórki poddano znakowaniu barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst oraz barwieniu z użyciem przeciwciał anti- α -tubulinie metodą pośrednią. Następnie próbki obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym. Liczbę i rozplaszczanie komórek zmierzono za pomocą programu do analizy obrazu ImageProPlus. Wyniki testów żywotności porównano z wynikami pomiarów rozplaszczania i liczby komórek. Zauważono korelację pomiędzy rozplaszczaniem i żywotnością osteoblastów i fibroblastów hodowanych na hydroksyapatycie, tlenku glinu i stali chirurgicznej.

Słowa kluczowe: testowanie biomateriałów, osteoblasty ludzkie, fibroblasty ludzkie, metody *in vitro*, rozplaszczanie komórek, analiza obrazu.

Wstęp

Zastosowanie metod *in vitro* do testowania biogodności materiałów wszczepialnych umożliwia precyzyjne zbadanie reakcji tkanek w kontakcie z implantem [1,2,3]. Warunki doświadczalne bardziej zbliżone do sytuacji klinicznej można osiągnąć wykorzystując w badaniach hodowle pierwotne komórek ludzkich [4,5]. Za pomocą metod *in vitro* można między innymi przeprowadzać testy toksyczności, badania przylegania, żywotności, czynności wydzielniczych i innych

COMBINATION OF TWO METHODS FOR BIOMATERIAL TESTING IN VITRO

D. KUDELSKA-MAZUR*, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*, J. KOMENDER*, G. BENKE**

*DEPARTMENT OF TRANSPLANTOLOGY AND CENTRAL TISSUE BANK, INSTITUTE OF BIOSTRUCTURE, THE MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW.

**DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS, THE MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW.

Abstract

We present a combination of two methods of biomaterial testing *in vitro*. Primary culture human osteoblasts and fibroblasts seeded on the samples of hydroxyapatite, alumina and surgical steel were used in the experiments. Cell viability, number and spreading were investigated. Viability was estimated in XTT test (ELISA). Anti- α -tubulin antibodies were used for indirect immunofluorescent labelling of cells and Hoechst fluorescent dye for staining of nuclei. Subsequently the samples were observed in a fluorescence microscope. Cell number and spreading were measured by means of ImageProPlus software. The results of viability test were compared with calculations of cell number and spreading. It was observed that correlation existed between spreading and viability of osteoblasts and fibroblasts cultured on hydroxyapatite, alumina and surgical steel.

Keywords: biomaterial testing, human osteoblasts, human fibroblasts, *in vitro* methods, cell spreading, image analysis.

Introduction

In vitro methods in biocompatibility investigation of implantable materials enable more precise evaluation of tissue reaction in contact with the implant [1,2,3]. Application of human primary cell cultures makes the experimental conditions closer to clinical situations [4,5]. *In vitro* investigations include toxicity testing, testing of cell viability, adherence and other functions [6,7,8]. Especially cell adherence and spreading seem to influence the regeneration of tissues in contact with implants [9,10,11].

The purpose of this study was to establish an effective quantitative method to assess cell adherence and