

# WPŁYW REAKTYWNOŚCI JONOWEJ BIOMATERIAŁÓW NA ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK IN VITRO

AGATA PRZEKORA<sup>1\*</sup>, DOROTA KOŁODYŃSKA<sup>2</sup>,  
GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII,  
UL. W. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN

<sup>2</sup> UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE,  
ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ,  
PL. MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ 2, 20-031 LUBLIN

<sup>3</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

\* E-MAIL: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

## Streszczenie

Powszechnie wiadomo, że reaktywne jonowo biomateriały indukują różne interakcje z otaczającym środowiskiem, powodując zmiany stężenia jonów, zwłaszcza kluczowych jonów takich jak wapń, magnez i fosfor, co może wpływać na metabolizm i żywotność komórek.

Głównym składnikiem części mineralnej kości i zębów jest hydroksyapatyt (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). W celu polepszenia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej hydroksyapatytu można połączyć go z dodatkowym komponentem organicznym np. polisacharydowym.

W niniejszej pracy oznaczano reaktywność jonową oraz cytotoksyczność 2 typów kompozytów na bazie glukanu (kompozytu glukan-HAp i kompozytu glukan-C-HAp) oraz poszczególnych ich składników: wysokoporowatych granul hydroksyapatytu (HAp), wysokoporowatych granul HAp węglanowo-magnezowych (C-HAp) oraz glukanu. Reaktywność jonową testowanych materiałów oznaczono za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA). Badania *in vitro* przeprowadzono z zastosowaniem linii komórkowej hFOB 1.19 (ludzkie płodowe osteoblasty) oraz pierwotnej hodowli fibroblastów skóry (HSF). Cytotoksyczność ekstraktów z biomateriałów określono z użyciem 2 testów – MTT i NRU.

Wyniki badań wyraźnie wskazały, że dodatek wysokoporowatych granul HAp i C-HAp do glukanu powoduje, że kompozyt jest reaktywny jonowo, co wpływa na metabolizm i żywotność hodowanych komórek.

**Słowa kluczowe:** reaktywność jonowa, kompozyt, cytotoksyczność, hodowla komórek

**Spis skrótów:** hydroksyapatyt (HAp), hydroksyapatyt węglanowo-magnezowy (C-HAp), absorpcyjna spektrometria atomowa (ASA), ludzkie fibroblasty skóry (HSF), ludzkie płodowe osteoblasty (hFOB), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), roztwór symulujący płyny ustrojowe (SBF), test wychwytu czerwieni obojętnej (NRU), roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami (PBS), dodecylsulfan sodu (SDS), białko surowicy płodowej (FBS)

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 59-65]

# THE EFFECT OF BIOMATERIALS ION REACTIVITY ON CELL VIABILITY IN VITRO

AGATA PRZEKORA<sup>1\*</sup>, DOROTA KOŁODYŃSKA<sup>2</sup>,  
GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,  
UL. W. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> MARIA CURIE-SKŁODOWSKA UNIVERSITY IN LUBLIN,  
DEPARTMENT OF INORGANIC CHEMISTRY,  
PL. MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ 2, 20-031 LUBLIN, POLAND

<sup>3</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

\* E-MAIL: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

## Abstract

It is widely known that surface-reactive biomaterials induce various interaction with surrounded environment, causing changes in the ion concentration, especially with respect to the crucial ions such as calcium, magnesium and phosphorous, what may significantly affect the cell metabolism and viability. Hydroxyapatite (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is the main inorganic component of bones and teeth. In order to improve mechanical properties and surgical handiness of hydroxyapatite, an organic component e.g. polysaccharide can be added.

In this work, the ion reactivity and cytotoxicity of 2 types of glucan-based composites (composite glucan-HAp and composite glucan-C-HAp) were evaluated. Additionally, the ion reactivity and cytotoxicity of each component of the composites: highly porous hydroxyapatite (HAp), highly porous carbonated-Mg-HAp (C-HAp) and glucan were evaluated. The ion reactivity of tested materials was assessed by atomic absorption spectrometry (AAS). *In vitro* tests were carried out using hFOB 1.19 cell line (human fetal osteoblast cells) and human skin fibroblast primary cell culture (HSF). The cytotoxicity of biomaterials extracts was estimated by 2 methods – MTT and NRU.

Our studies clearly indicated that addition of highly porous HAp and C-HAp granules to the glucan, make the composite ion reactive, what affects the metabolism and viability of cultured cells.

**Keywords:** ion reactivity, composite, cytotoxicity, cell culture

**Abbreviations:** hydroxyapatite (HAp), carbonated-magnesium doped hydroxyapatite (C-HAp), atomic absorption spectrometry (AAS), human skin fibroblasts (HSF), human fetal osteoblasts (hFOB), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), simulating body fluid (SBF), neutral red uptake test (NRU), phosphate buffer saline (PBS), sodium dodecyl sulfate (SDS), fetal bovine serum (FBS)

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 59-65]

Powszechnie wiadomo, że zmiany stężenia jonów w środowisku komórkowym, zwłaszcza kluczowych jonów takich jak wapń, magnez i fosfor, mogą wpływać na metabolizm i żywotność komórek. Reaktywne jonowo biomateriały indukują różne interakcje z otaczającym środowiskiem (podłożem hodowlanym, SBF, płynami fizjologicznymi), co powoduje zmiany stężenia jonów i hamuje metabolizm hodowanych komórek [1,2]. Dlatego w szczególności powinno się zwrócić uwagę na ocenę potencjału klinicznego tych biomateriałów, których powierzchnia wykazuje znaczną reaktywność jonową. Wstępny „screening” biomateriałów, które nie indukują dużych zmian jonowych w środowisku możliwy jest dzięki zastosowaniu uproszczonych modeli *in vitro* z wykorzystaniem SBF czy podłoża hodowlanego [3].

Głównym składnikiem części mineralnej kości i zębów jest hydroksyapatyt (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Ceramika wapniowo-fosforanowa w formie granul, jak i porowatego rusztowania (często kompozytu na bazie HAp), jest materiałem powszechnie stosowanym jako substytut tkanki kostnej w ortopedii i stomatologii. Szerokie zastosowanie tego surowca jako typowego ortopedycznego biomateriału wszczepialnego, wynika z jego charakterystycznych właściwości, takich jak kościopodobna struktura, brak toksyczności i immunogenności, bioaktywność oraz biokompatybilność [4-6]. W celu poprawienia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej hydroksyapatytu można połączyć go z dodatkowym komponentem organicznym np. polisacharydowym [7,8]. Zastosowany polisacharyd powinien cechować się takimi właściwościami jak brak toksyczności, szybka biodegradacja, podatność na chemiczną lub enzymatyczną modyfikację oraz stymulacja adhezji i proliferacji komórek [9]. Ponadto powinien być dobrym czynnikiem uplastyczniającym [7].

Celem niniejszej pracy było określenie reaktywności jonowej oraz cytotoksyczności nowych kompozytów: na bazie HAp o wysokiej porowatości i glukanu (glukan-HAp) oraz na bazie hydroksyapatytu węglanowo-magnezowego (C-HAp) o wysokiej porowatości i glukanu (glukan-C-HAp). Kompozyt zbudowany z glukanu i wysokoporowatych granul HAp jest poręczny chirurgicznie oraz charakteryzuje się dobrymi parametrami mechanicznymi, zbliżonymi do parametrów kości gąbczastej [7]. Dodatkowo określono reaktywność jonową i cytotoksyczność poszczególnych składników biomateriałów: HAp, C-HAp oraz glukanu, co umożliwiło ocenę, który komponent kompozytu wykazuje największą zdolność interakcji jonowych z podłożem hodowlanym.

## Materiały i metody

Kompozyty glukan-HAp i glukan C-HAp zostały przygotowane zgodnie z protokołem opisanym w patencie P-387872 [10].

Zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w podłożu hodowlanym po inkubacji z testowanymi materiałami określono za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA). W tym celu materiały umieszczono w pełnym podłożu hodowlanym w stosunku 0,1 g próbki/ml podłoża i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Podłoże hodowlane inkubowane w takich samych warunkach, ale bez testowanych biomateriałów stanowiło kontrolę. Ekstrakty przygotowano zgodnie ze standardami ISO 10993-5. Metoda ASA pozwala na szybkie i wiarygodne oznaczenie jonów wapnia i magnezu. W celu oznaczenia zawartości jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w próbkach metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej zastosowano spektrometr ASA firmy Varian, model SpectrAA 240FZ wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy. Oznaczenia wykonano przy długości fal 422,7 nm dla  $\text{Ca}^{2+}$  i 285,2 nm dla  $\text{Mg}^{2+}$ .

## Introduction

It is well known that changes in the ion concentration of culture environment, especially with respect to the crucial ions such as calcium, magnesium and phosphorous, may significantly affect the cell metabolism and viability. Surface-reactive biomaterials provoke different ion interactions with surrounded environment (medium, SBF, physiological fluids) and cause changes in the ion concentration what inhibits the metabolism of cultured cells [1,2]. Thus it is important to realize that specific attention should be paid to evaluate the clinical potential of the surface-reactive biomaterials before their application *in vivo*. An initial screening of the biomaterial that does not induce large ionic changes in the environment is possible when simplified model system such as SBF or culture medium is applied [3].

Hydroxyapatite (HAp) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is the main inorganic component of bones and teeth. Calcium phosphate ceramics in the form of granules and porous scaffolds (often HAp-based composites) are widely used as bone substitutes in dentistry and orthopedics. It is extensively applied as a typical orthopedic biomaterial, because of its characteristic properties such as bone-like structure, nontoxicity and nonimmunogenicity, biocompatibility and bioactivity [4-6]. In order to improve mechanical properties and surgical handiness of hydroxyapatite, an organic component e.g. polysaccharide can be added [7,8]. Applied polysaccharide should be characterized by specific properties such as nontoxicity, rapid biodegradation, prone to chemical or enzymatic modification and simulation of cell adhesion and proliferation [9]. Moreover, it should be considered as a good plasticizing agent [7].

The aim of this work was to evaluate the ion reactivity and cytotoxicity of the novel composites: containing highly porous hydroxyapatite and glucan (glucan-HAp) and containing highly porous carbonated-Mg-hydroxyapatite (C-HAp) and glucan (glucan-C-HAp). The composite containing glucan and highly porous Hap granules, performs surgical handiness and good mechanical parameters resembling human spongy bone [7]. In addition, the ion reactivity and cytotoxicity of HAp, C-HAp and glucan alone were evaluated to assess which component of the composite reveals the greatest ion interactions with culture medium.

## Materials and Methods

Composites glucan-HAp and glucan-C-HAp were prepared according to procedure described in Polish Patent P-387872 [10].

Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ion concentration of the medium after incubation with test materials were evaluated by atomic absorption spectrometry (AAS). To assess ion reactivity, materials were immersed in a complete culture medium, the ratio between the sample weight and the volume of the extraction vehicle was 0.1 g/ml. Then samples were incubated for 24 hours at  $37^\circ\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . Culture medium incubated in the same conditions but with no test material served as a control. Extracts were prepared according to ISO 10993-5. The AAS method allows for quickly and reliably determination of calcium and magnesium ions. For determination of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  contents in the samples by the atomic absorption spectrometry method, a Varian AAS spectrometer, SpectrAA 240FZ model with an air-acetylene flame was applied. The wavelengths were set to 422.7 nm for  $\text{Ca}^{2+}$  and 285.2 nm for  $\text{Mg}^{2+}$ . Calcium carbonate and magnesium nitrate(V) were used as standards to prepare calibration curves with at least 4 concentrations of calcium or magnesium within the analytical range, respectively.

Odpowiednio, węglan wapnia i azotan(V) magnezu wykorzystano do przygotowania roztworów wzorcowych o przynajmniej 4 stężeniach. W celu eliminacji interferencji pochodzących od jonów fosforanowych(V) dodano chlorek lantanu, w takiej ilości by osiągnąć końcowe stężenie równe 1%. Stężenie jonów metali w badanych próbkach obliczono w oparciu krzywe wzorcowe. Pomiar wykonano trzykrotnie dla każdej próbki i wyniki podano jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Przygotowane w wyżej opisany sposób 100% ekstrakty z testowanych materiałów były następnie poddane testom na oznaczanie cytotoksyczności *in vitro*.

W celu określenia cytotoksyczności biomateriałów wykonano testy pośrednie (z zastosowaniem ekstraktów) MTT oraz NRU. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB 1.19) pozyskanej z banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, England, UK) oraz pierwotnej hodowli fibroblastów wyprowadzonej z ludzkiej skóry (HSF). W celu izolacji fibroblastów, małe fragmenty ludzkiej skóry umieszczono w dołkach płytki 24-dołkowej, przyklejono do dna dołka za pomocą sterylnej agarozy, zalano podłożem hodowlanym wzbogaconym o czynniki wzrostu fibroblastów i inkubowano przez okres około 2 tygodni w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie w dołkach płytki 24-dołkowej uzyskano monolayer komórek, które zostały przekazane do testów na określenie cytotoksyczności. Hodowlę komórek hFOB 1.19 prowadzono w podłożu DMEM/F12 wzbogaconym o 10% bydlęcą surowicę płodową (FBS) w temperaturze 34°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, natomiast hodowlę ludzkich fibroblastów skóry (HSF) prowadzono w podłożu RPMI wzbogaconym o 10% FBS w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

W celu określenia cytotoksyczności zawiesinę komórek linii hFOB 1.19 doprowadzano do gęstości 1,5 x 10<sup>5</sup> kom./ml, a zawiesinę komórek HSF do gęstości 1 x 10<sup>5</sup> kom./ml i rozlewano po 100  $\mu$ l do dołków w płytce 96-dołkowej z płaskim dnem. Po 24 godz. inkubacji w temp. 34°C – hFOB i 37°C – HSF, delikatnie ściągano płyn hodowlany i dodawano po 100  $\mu$ l dołek odpowiednich ekstraktów z materiałów oraz 100  $\mu$ l 0,1% roztworu fenolu – kontrola pozytywna cytotoksyczności. Komórki hodowane w podłożu kontrolnym (inkubowanym w takich samych warunkach co ekstrakty) stanowiły kontrolę. Po 24 i 48 godz. inkubacji oznaczono aktywność metaboliczną komórek metodą MTT. Po 48 godz. ekspozycji na działanie ekstraktów oznaczono żywotność komórek metodą NRU.

Test MTT przeprowadzono w celu określenia aktywności metabolicznej komórek po ekspozycji na działanie ekstraktów z materiałów. Po 24 i 48 godz. inkubacji z ekstraktami, do dołków w płytce 96-dołkowej dodano po 25  $\mu$ l roztworu MTT (5 mg/ml w buforze PBS) i płytki umieszczono na 3 godziny w inkubatorze. Kryształy formazanu powstałe w żywych, aktywnych metabolicznie komórkach rozpuszczono dodając 100  $\mu$ l dołek roztworu SDS/HCl (10% SDS przygotowany w 0,01 M HCl). Po 12 godzinach inkubacji, odczytano absorbancję przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika do mikroplatek (Biotek ELx50).

Test NRU przeprowadzono w celu określenia cytotoksycznego wpływu ekstraktów z biomateriałów w stosunku do komórek hFOB oraz HSF. Po 48 godzinnej inkubacji z ekstraktami, warstwę komórek przepłukano buforem PBS, a do dołków dodano po 100  $\mu$ l roztworu czerwieni obojętnej (50  $\mu$ g/ml w podłożu hodowlanym). Następnie płytki inkubowano przez 3 godziny, roztwór NR usunięto, warstwę komórek przepłukano dwa razy buforem PBS i dodano po 100  $\mu$ l dołek roztworu rozpuszczalnika (1% lodowaty kwas octowy/50% etanol/49% woda destylowana). Następnie płytki wytrząsano przez 20 minut i odczytano absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika do mikroplatek (Biotek ELx50).

To eliminate phosphate(V) ions interference during the assay, lanthanum chloride was added to reach final concentration of 1%. Concentration of metal ions in tested solutions was calculated from the prepared standard curves. The measurements were repeated three times for each sample and the results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (SD). Prepared 100% extracts were subjected to the cytotoxicity *in vitro* tests.

MTT and NRU indirect tests (by means of fluid extracts) were performed to estimate the cytotoxicity of biomaterials. The experiments were carried out using normal human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19) obtained from ATCC (American Type Culture Collection, England, UK) and human fibroblast primary cell culture isolated from human skin (HSF). In order to isolate fibroblasts, small pieces of human skin were immersed in wells of 24-multiwell plate, the skin was attached to the bottom by sterile agarose and immersed in culture medium supplemented with fibroblast growth factors. After 2-week incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, the cell monolayer was obtained and cells were subjected into *in vitro* cytotoxicity tests. HFOB 1.19 cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained at 34°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air and human skin fibroblasts (HSF) were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

To assess cytotoxicity, hFOB 1.19 cells were seeded in flat bottom 96-multiwell plates in 100  $\mu$ l complete culture medium at a concentration of 1.5 x 10<sup>5</sup> cell/ml and HSF cells at a concentration of 1 x 10<sup>5</sup> cell/ml. After 24-hour incubation at 34°C – hFOB and at 37°C – HSF, the growth medium was replaced with 100  $\mu$ l of the appropriate extracts and 100  $\mu$ l of 0.1% phenol solution – positive control of cytotoxicity. Cells cultured in the control medium (incubated in the same standard conditions as extracts), served as control. After 24 and 48 hours of incubation, MTT test was performed to evaluate cell metabolic activity. After 48-hour exposure to the extracts, the NRU assay was performed to assess cell viability.

MTT test was performed to assess metabolic activity of cells after exposure to materials extracts. After 24 and 48-hour incubation with extracts, 25  $\mu$ l per well of MTT solution (5 mg/ml in PBS buffer) was added and plates were returned to the incubator for 3 hours. Formazan crystals formed in live, metabolic active cells were dissolved by adding 100  $\mu$ l well of SDS/HCl solution (10% SDS prepared in 0.01 M HCl). After 12 hours of incubation, the absorbance was measured at 570 nm using microplate reader (Biotek ELx50).

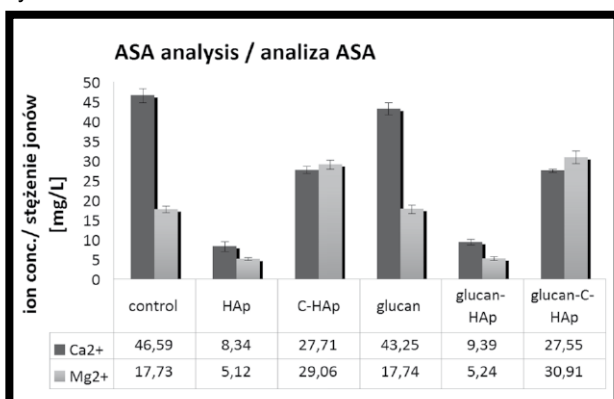
NRU test was performed to evaluate cytotoxicity effect of biomaterials extracts on hFOB and HSF cells. After 48-hour incubation with extracts, cell layers were rinsed with PBS buffer and 100  $\mu$ l per well of neutral red working solution was added (50  $\mu$ g/ml in culture medium). Then, the plates were returned to the incubator for 3 hours, the neutral red solution was removed, cell layers were rinsed twice with PBS and 100  $\mu$ l/well of solvent (1% glacial acetic acid/50% ethanol/49% distilled water) was added. Then plates were agitated for 20 minutes and the absorbance was measured at 540 nm using microplate reader (Biotek ELx50).

*In vitro* cytotoxicity tests were repeated in 3 separate experiments. The results obtained in MTT and NRU tests were expressed as the percentage of the control and reported as mean values  $\pm$  standard deviation (SD). The unpaired t-test was performed to evaluate statistical differences among groups by two population comparison. Statistical significance was considered at a probability P < 0.05 and marked by asterisks in the figure (GraphPad Prism 5, Version 5.03 Software).

Testy oceny cytotoksyczności *in vitro* zostały powtórzone w 3 niezależnych eksperymentach. Wyniki testu MTT i NRU wyrażono jako procent kontroli oraz przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). W celu oceny statystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami wykonano unpaired t-test. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i zaznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek (GraphPad Prism 5, Version 5.03 Software).

## Wyniki i dyskusja

W celu oceny reaktywności jonowej materiałów wykonano analizę ASA ekstraktów. W eksperymencie wykazano, że materiały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp indukują istotne interakcje jonowe z podłożem hodowlanym (RYS. 1). Materiały HAp i glukan-HAp powodują sorpcję jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  z podłoża hodowlanego do krytycznie niskich wartości. Po 24-godzinnej inkubacji, zaobserwowano obniżenie stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do około 9 mg/L (stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w podłożu kontrolnym było równe 46,6 mg/L). Zanotowano również duże obniżenie stężenia jonów  $\text{Mg}^{2+}$  do około 5 mg/L w porównaniu do podłoża kontrolnego – 17,7 mg/L. Biomateriały C-HAp i glukan-C-HAp powodują sorpcję jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z podłoża. Zaobserwowano obniżenie stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do około 27 mg/L w porównaniu do podłoża kontrolnego. Biomateriały zawierające w swoim składzie granule węglanowo-magnezowe HAp uwalniają jony  $\text{Mg}^{2+}$  do podłoża, powodując wzrost stężenia tych jonów w pożywce do około 30 mg/L w porównaniu do podłoża kontrolnego. Glukan nie zmienia stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w podłożu hodowlanym (RYS. 1). Zatem, można wyciągnąć wniosek, że dodatek granul HAp i C-HAp o wysokiej porowatości do glukanu powoduje, że kompozyt jest reaktywny jonowo. Przypuszczamy, że spadek stężenia kationów dwuwartościowych w podłożu hodowlanym wynika ze spontanicznego tworzenia się warstwy apatytu na powierzchni HAp. Podczas gdy wzrost stężenia jonów  $\text{Mg}^{2+}$  w podłożu przypisujemy procesowi uwalniania tych jonów z węglanowego HAp z domieszką magnezu (C-HAp). Ekstrakty z materiałów pozyskane w eksperymencie określającym reaktywność jonową zostały poddane testom na oznaczanie cytotoksyczności – MTT i NRU, w celu oceny wpływu zmian stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  na metabolizm i żywotność komórek *in vitro*.



**RYS. 1. Zmiany stężenia jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  w testowanych ekstraktach oszacowane metodą ASA. Wyniki wyrażono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD).**

**FIG. 1.  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration changes of tested extracts evaluated by AAS. The results were expressed as the mean values  $\pm$  standard deviation (SD).**

## Results and Discussion

To assess materials ion reactivity, AAS analysis of extracts was performed. The experiment revealed that materials marked as HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp induce great ion interactions with culture medium (FIG. 1). HAp and glukan-HAp materials provoke sorption of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions from culture medium to critically low values. After 24-hour incubation, decrease of  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration to approximately 9 mg/L was observed ( $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration of control medium was 46.6 mg/L). Also large decrease of  $\text{Mg}^{2+}$  ion concentration to approximately 5 mg/L compared to the control medium – 17.7 mg/L was found. C-HAp and glukan-C-HAp biomaterials cause sorption of  $\text{Ca}^{2+}$  ions from the medium. We observed decrease of  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration to approximately 27 mg/L compared to the control medium. Biomaterials consisting of carbonated-Mg-HAp (C-HAp) release  $\text{Mg}^{2+}$  ions to the medium causing increase of  $\text{Mg}^{2+}$  ion concentration to approximately 30 mg/L after 24-hour incubation compared to the control medium. Glukan does not change  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ion concentration of culture medium (FIG. 1). Thus, it can be concluded that highly porous HAp and C-HAp used as additives to the glukan, make the composite ion reactive. We suggest that decrease of divalent cations in the culture medium is caused by spontaneous apatite layer formation on the surface of HAp. Whereas, we assign increase of  $\text{Mg}^{2+}$  ions in the medium to process of releasing of these ions from magnesium doped carbonated hydroxyapatite (C-HAp). Material extracts obtained from ion reactivity experiment were subjected to MTT and NRU cytotoxicity assays to evaluate the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ion concentration changes on cell metabolism and viability *in vitro*.

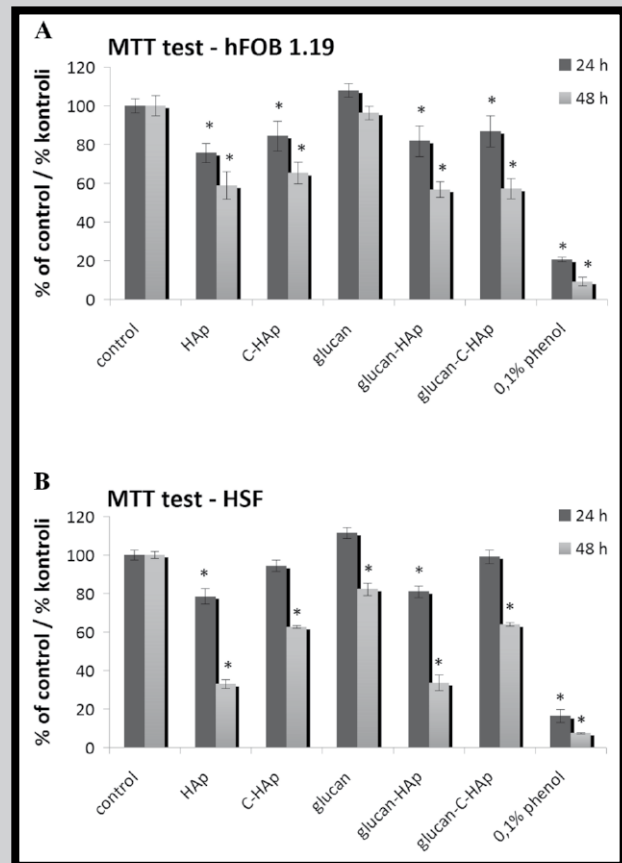
Cells such as osteoblasts or fibroblasts need to adhere to the surface of culture flask or biomaterial to maintain their biological activity and viability. It is widely known that cell-material surface interaction are mediated by integrins, which require divalent cations, mainly  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , to be activated. Thus, it is important to realize that critically low concentration of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ions may affect cell adhesion and viability [1].

In the present work, the MTT test was performed to evaluate the cytotoxic effect of biomaterial extracts on hFOB 1.19 cells and HSF cells after 24 and 48-hour exposure. The MTT assay was described to estimate cell viability and proliferation. Only viable, metabolic active cells with active mitochondrial dehydrogenases have ability to intracellular reduction of yellow tetrazolium salt to purple formazan. Chemicals that act as toxic agents, inhibit dehydrogenases activity and formazan production [11]. The MTT test revealed that materials marked as HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp reduced significantly metabolic activity of hFOB cells just after 24-hour incubation with extracts and formazan production was gradually decreased with time (FIG. 2a). After 48-hour exposure to the extracts, cell metabolic activity was significantly reduced to approximately 60-65% compared to the control cells. Glukan extract did not induce cytotoxic effect and hFOB cell metabolic activity was approximately 100% throughout the full length of the experiment. The MTT test results obtained for HSF cells also showed cytotoxic effect of HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp extracts (FIG. 2b). After 24-hour incubation, only HAp and glukan-HAp extracts decreased significantly HSF cells metabolic activity to 78.5% ( $P=0.0086$ ) and 81% ( $P=0.0342$ ) respectively compared to the control cells. However, after 48-hour exposure, formazan production was significantly reduced by all tested extracts: HAp and glukan-HAp extracts decreased HSF metabolic activity to approximately 33%, C-HAp and glukan-C-HAp to approximately 64% compared to the control cells.

Komórki takie jak osteoblasty czy fibroblasty muszą ulec adhezji do powierzchni naczynia hodowlanego lub biomateriału, aby zachować żywotność i swoją biologiczną aktywność. Powszechnie wiadomo, że w interakcjach komórka–powierzchnia materiału pośredniczą integryny, które do swojej aktywności wymagają obecności kationów dwuwartościowych, głównie  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Zatem, bardzo ważne jest, aby zdać sobie sprawę, że krytycznie niskie stężenie jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  może znacząco wpływać na adhezję i żywotność komórek [1].

W niniejszej pracy, test MTT wykonano w celu określenia cytotoksycznego wpływu ekstraktów z biomateriałów w stosunku do komórek linii hFOB i HSF po 24 i 48-godzinnej inkubacji z eluatami. Metodę MTT opracowano w celu określania żywotności komórek oraz badania ich proliferacji. Zasada testu opiera się na reakcji, która zachodzi w żywych, metabolicznie czynnych komórkach przy udziale mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej i polega na redukcji żółtej soli tetrazoliowej (MTT) do purpurowego formazanu. Związki działające toksycznie hamują aktywność dehydrogenaz, a tym samym powstawanie barwnego produktu ich reakcji [11]. Test MTT wykazał, że materiały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp redukowały istotnie statystycznie aktywność metaboliczną komórek hFOB już po 24-godzinnej inkubacji z ekstraktami, a produkcja formazanu zmniejszała się stopniowo w czasie (RYS. 2a). Po 48-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów, aktywność metaboliczna komórek była istotnie zredukowana do około 60-65% w porównaniu do kontroli. Ekstrakt z glukanu nie wywierał cytotoksycznego wpływu w stosunku do komórek hFOB, a aktywność metaboliczna utrzymywała się na poziomie około 100% przez cały czas trwania doświadczenia. Wyniki testu MTT uzyskane dla komórek HSF również wykazały cytotoksyczne działanie ekstraktów z HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp (RYS. 2b). Po 24-godzinnej inkubacji, jedynie ekstrakty z HAp i glukan-HAp obniżyły istotnie statystycznie metabolizm komórek HSF do odpowiednio 78,5% ( $P = 0,0086$ ) i 81% ( $P = 0,0342$ ) w porównaniu do kontroli. Jednak, po 48-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów, produkcja formazanu była istotnie statystycznie obniżona przez wszystkie testowane materiały: ekstrakty z HAp i glukan-HAp obniżyły aktywność metaboliczną komórek HSF do około 33%, a ekstrakty z C-HAp i glukan-C-HAp do około 64% w porównaniu do kontroli. Test MTT wykazał, że ilość formazanu produkowanego przez komórki HSF po 24-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktu z glukanu wynosiła 111,5%, a po 48 godzinach inkubacji aktywność metaboliczna komórek jedynie w niewielkim stopniu ale istotnie statystycznie obniżyła się do 82,3% ( $P = 0,0276$ ) w porównaniu do kontroli (RYS. 2b).

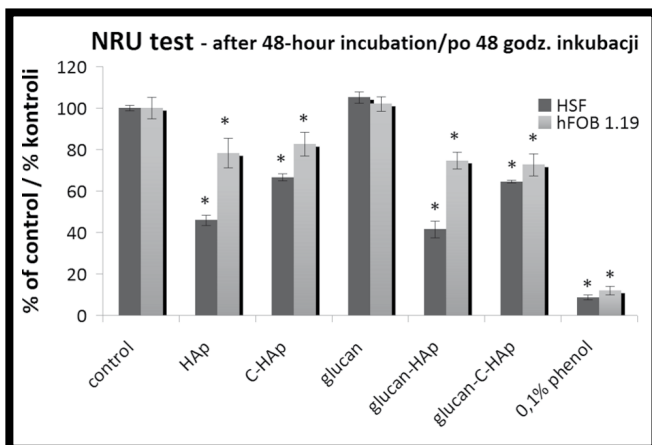
W niniejszej pracy, test NRU przeprowadzono w celu oceny żywotności komórek hFOB i HSF po 48-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów z materiałów. Badanie cytotoksyczności z wykorzystaniem barwnika – czerwieni obojętnej (NR) – opiera się na zdolności żywych komórek do jego wychwytu oraz gromadzenia go w lizosomach komórek. Wychwyt NR wzrasta w czasie inkubacji, a ilość zaabsorbowanego barwnika jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Uszkodzenie błony komórkowej lub błony lizosomu przez różne związki chemiczne powoduje obniżenie wychwytu czerwieni obojętnej przez komórki [12]. Test NRU wykazał, że biomateriały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp redukowały istotnie statystycznie żywotność komórek hFOB i HSF (RYS. 3).



**RYS. 2. Określenie cytotoksyczności testowanych ekstraktów z biomateriałów za pomocą testu MTT (A – cytotoksyczność ekstraktów w stosunku do komórek hFOB, B – cytotoksyczność ekstraktów w stosunku do komórek HSF). Wyniki wyrażono jako wartości średnie  $\pm$  SD. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i oznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek. FIG. 2. Cytotoxicity evaluation of tested biomaterials extracts by means of MTT test (A – cytotoxicity effect of extracts on hFOB cells, B – cytotoxicity effect of extracts on HSF cells). The results were expressed as the mean values  $\pm$  SD. Statistical significance was considered at a probability  $P < 0.05$  and marked by asterisks in the figure.**

The MTT test showed that the amount of formazan produced by HSF cells exposed to the glucan extract for 24 hours was 111.5% and cell metabolic activity was only slightly but statistically significant decreased with time to 82.3% ( $P = 0.0276$ ) after 48-hour exposure compared to the control (FIG. 2b).

In this study, the NRU test was performed to evaluate hFOB and HSF cell viability after 48-hour exposure to the material extracts. The NRU cytotoxicity assay allows to assess cell viability using neutral red dye (NR). Viable cells have ability to take up and incorporate NR in their lysosomes. Incorporation of NR increases with time of incubation and the amount of absorbed dye is proportional to the number of viable cells. Chemicals that damage cell membranes or lysosomes membranes will decrease the cell ability to take up neutral red dye [12]. NRU test revealed that biomaterials marked as HAp, C-HAp, glucan-HAp and glucan-C-HAp reduced significantly hFOB and HSF cell viability (FIG. 3).



Jednakże, żywotność komórek hFOB była jedynie w niewielkim stopniu, ale istotnie statystycznie zredukowana do około 75-80% w porównaniu do kontroli. Żywotność komórek HSF po ekspozycji na działanie ekstraktów z HAp i glukan-HAp była obniżona do odpowiednio 46% ( $P=0,0024$ ) i 41,6% ( $P=0,0035$ ) w porównaniu do kontroli. Ekstrakty z C-HAp i glukan-C-HAp redukowały żywotność komórek HSF do około 65% w porównaniu do kontroli. Test NRU wykazał, że ekstrakt z glukanu nie wpływał na żywotność komórek hFOB i HSF (żywotność wynosiła ponad 100% dla obu typów komórek). Bazując na uzyskanych wynikach testu NRU, można zasugerować, że biomateriały oznaczone jako HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp wykazują mniej toksyczny wpływ w stosunku do komórek hFOB niż w stosunku do komórek HSF (RYS. 3).

Wykonane przez nas testy na oznaczenie cytotoxiczności *in vitro* jednoznacznie wskazują, że ekstrakty z biomateriałów HAp, C-HAp, glukan-HAp i glukan-C-HAp zachowują się jak związki toksyczne i powodują znaczącą redukcję aktywności metabolicznej i żywotności komórek. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi w eksperymencie na określenie reaktywności jonowej, które wykazują, że wspomniane biomateriały powodują duże zmiany w stężeniu jonów w podłożu hodowlanym.

Nasze obserwacje są zgodne z wynikami prezentowanymi przez innych autorów. Malafaya i Reis wykazali, że biomateriał na bazie chitosanu wyprodukowany z niespieczonego hydroksyapatytu powoduje sorpcję kationów dwuwartościowych do krytycznie niskich wartości, co istotnie wpływa na żywotność komórek *in vitro* [1]. Nasz poprzedni raport również udowodnił, że różnorodne biomateriały wykazują różne interakcje jonowe z podłożem hodowlanym i powodują duże zmiany w stężeniu jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , co hamuje metabolizm hodowanych komórek. Jednak, ważne jest, aby zdać sobie sprawę, że stały przepływ płynów fizjologicznych *in vivo* może powodować, że sorpcja jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  stanie się zjawiskiem korzystnym, przyspieszającym proces mineralizacji tkanki kostnej po implantacji [2].

## Wnioski

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników z analizy ASA można wysnuć wniosek, że dodatek granul HAp o wysokiej porowatości do glukanu, powoduje, że kompozyt jest reaktywny jonowo. Wyniki testów na oznaczenie cytotoxiczności sugerują, że duże zmiany stężenia kluczowych jonów w podłożu hodowlanym mogą hamować metabolizm i wpływać na żywotność hodowanych komórek.

**RYS. 3. Określenie żywotności komórek hFOB i HSF po zadziałaniu ekstraktami z biomateriałów za pomocą testu NRU. Wyniki wyrażono jako wartości średnie  $\pm$  SD. Istotność statystyczna była rozpatrywana przy prawdopodobieństwie  $P < 0,05$  i oznaczona na wykresie za pomocą gwiazdek.**

**FIG. 3. Viability evaluation of hFOB and HSF cells after exposure to biomaterials extracts by means of NRU test. The results were expressed as the mean values  $\pm$  SD. Statistical significance was considered at a probability  $P < 0.05$  and marked by asterisks in the figure.**

However, hFOB cell viability was only slightly but statistically significant reduced to approximately 75-80% compared to the control cells. Viability of HSF cells after exposure to HAp and glukan-HAp extracts was decreased to 46% ( $P=0.0024$ ) and 41.6% ( $P=0.0035$ ) respectively compared to the control. C-HAp and glukan-C-HAp extracts reduced HSF viability to approximately 65% compared to the control cells. NRU assay showed that glukan extract did not affect hFOB and HSF cell viability (viability was over 100% for both type of cells). Basing on the obtained NRU assay results, it can be suggested that biomaterials marked as HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp exert less cytotoxic effect on hFOB cells than on HSF cells (FIG. 3).

Our *in vitro* cytotoxicity tests clearly indicate that HAp, C-HAp, glukan-HAp and glukan-C-HAp extracts act as cytotoxic agents and cause significant reduction of cell metabolic activity and cell viability. It is in agreement with the ion interaction experiment results, which showed that these biomaterials cause large ion concentration changes of culture medium.

Our observations are in agreement with the results presented by other authors. Malafaya and Reis revealed that chitosan-based scaffold produced with unsintered hydroxyapatite provokes sorption of divalent cations to critically low values, what significantly affects cell viability *in vitro* [1]. Our previous report also proved that various biomaterials reveals different ion interaction with culture medium and cause great changes in  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ion concentration, what inhibits the metabolism of cultured cells. However, it is important to realize that constant flow of physiological fluids *in vivo* can make sorption of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  ions beneficial phenomena that enhance mineralization process of bone tissue after implantation [2].

## Conclusion

In summary, basing on the AAS analysis results, it can be concluded that addition of highly porous HAp to the glukan, make the composite ionic reactive. Cytotoxicity test results reveal that large changes in the crucial ion concentration of the medium may inhibit metabolism of cultured cells and affect their viability.

## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu UDA-POIG. 01.03.01-00-005/09-02. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w projekcie realizowanym zgodnie z umową nr POPW.01.03.00-06-010/09-00 w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi Priorytetowej I, Nowoczesna Gospodarka, Działanie 1.3. Wsparcie Innowacji.

## Acknowledgements

This work was supported by financial support from UDA-POIG.01.03.01-00-005/09-02 project. The paper was developed using the equipment purchased within the agreement No. POPW.01.03.00-06-010/09-00 Operational Program Development of Eastern Poland 2007-2013, Priority Axis I, Modern Economy, Operations 1.3. Innovations Promotion.

## Piśmiennictwo

- [1] Malafaya B.P., Reis L.R.: Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 644-660.
- [2] Przekora A., Kołodyńska D., Jedel R., Ginalska G., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z.: The influence of hydroxyapatite granules on osteoblast culture in vitro. *Ceramic Materials* 63(4) (2011) 765-768.
- [3] Gustavsson J., Ginebra P.M., Engel E., Planell J.: Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 4242-4252.
- [4] Sopyan Y.I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A.: Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 8 (2007) 116-123.
- [5] Aronov D., Karlov A., Rosenman G.: Hydroxyapatite nanoceramics: Basic physical properties and biointerface modification. *Journal of the European Ceramic Society* 27 (2007) 4181-4186.
- [6] Belcarz A., Ginalska G., Zalewska J., Rzeski W., Ślósarczyk A., Kowalczyk D., Godlewski P., Niedźwiadek J.: Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes gentamicin release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 89 (2009) 102-113.

## References

- [7] Belcarz A., Ginalska G., Polkowska I., Przekora A., Ślósarczyk A., Zima A., Paszkiewicz Z.: Pilot clinical study of efficacy of flexible HAp-based composite for bone defects replacement. *Engineering of Biomaterials* 99-101 (2010) 16-18.
- [8] Tsiptsias C., Panayiotou C.: Preparation of cellulose-nano-hydroxyapatite composite scaffolds from ionic liquid solutions. *Carbohydrate Polymers* 74 (2008) 99-105.
- [9] Belcarz A., Ginalska G., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z.: Bioactive composite and process for the production of the same. 2009; Polish Patent PL-387872.
- [10] Barbarić M., Kraljević S., Grce M., Zorc B.: Novel 1,2,5-oxadiazine derivatives – Synthesis and in vitro biological studies. *Acta Pharmaceutica* 53 (2003) 175-186.
- [11] Putnam P.K., Bombick W.D., Doolittle J.D.: Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro* 16 (2002) 599-607.