

WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE I MORFOLOGICZNE TKANEK OSIERDZIA PO USUNIĘCIU KOMÓREK

ARTUR TUREK^{1*}, BEATA C WALINA², J. NOŻYŃSKI³

¹ ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
KATEDRA BIOFARMACJI,
NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

² POLITECHNIKA ŚLĄSKA,
KATEDRA BIOTECHNOLOGII ŚRODOWISKOWEJ,
AKADEMICKA 2, 44-100 GLIWICE, POLSKA

³ FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,
WOLNOŚCI 345A, 41-800 ZABRZE, POLSKA

* E-MAIL: ATUREK@VIP.INTERIA.PL

Streszczenie

Celem pracy była ocena stabilności struktury macierzy zewnątrzkomórkowej osierdza świni po usunięciu z nich komórek. Badano wpływ substancji powodujących usuwanie komórek na właściwości biochemiczne i morfologiczne tkanek. Tkanki traktowano roztworami zawierającymi trypsynę i wersenian sodu (EDTA) lub dodecylosiarczan sodu (SDS) i chlorek sodu (NaCl). W badaniach wykorzystano elektroforezę SDS-PAGE i mikroskopię optyczną. Wykazano, że oddziaływanie na tkanki roztworu zawierającego 0,05% trypsyny i 0,02% EDTA pozwala na uzyskanie materiału bezkomórkowego.

Słowa kluczowe: tkanki osierdza, macierz zewnątrzkomórkowa, usuwanie komórek, stabilność struktury, biomateriał

[Inżynieria Biomateriałów, 77-80, (2008), 110-113]

Wprowadzenie

Deficyt tkanek ludzkich powoduje konieczność komercyjnego stosowania materiału ksenogenego. Wymaga on kompleksowej stabilizacji ze względu na immunogenność tkanek zwierzęcych, a także ryzyko transmisji chorób odzwierzęcych [1,2]. Stabilizację tkanek zwierzęcych najczęściej osiąga się przez sieciowanie białek, głównie za pomocą aldehydu glutarowego (GA) [3]. Efektem jest zmniejszenie immunogenności tkanek [2,4], a także zwiększenie ich oporności na degradację [5]. Jednakże tkanki utrwalone GA wykazywały cytotoksyczność [6] i przedwczesną kalcyfikację biomateriałów w warunkach in vivo [7]. Okazało się także, że nie można usunąć z nich resztek komórkowych odpowiedzialnych za immunogenność i kalcyfikację biomateriału. Doprowadziło to do rozwoju wielu różnych metod usuwania komórek z tkanek. W tym celu stosuje się głównie preparaty enzymatyczne [8] lub substancje powierzchniowo czynne [9]. Uzyskuje się naturalne rusztowania, na których można osadzać komórki autologiczne lub allogeniczne w warunkach in vitro. Przypuszcza się, że trwałość takich biomateriałów będzie większa, w porównaniu z ksenograftami modyfikowanymi za pomocą sieciowania.

Celem niniejszej pracy była ocena stabilności struktury macierzy zewnątrzkomórkowej osierdza świni, po usunięciu z nich komórek. Ocenę przeprowadzono na podstawie analizy profili elektroforetycznych białek uwalnianych z tkanek oraz zmian morfologicznych w tkankach.

BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF PERICARDIUM TISSUES AFTER DECELLULARIZATION

ARTUR TUREK^{1*}, BEATA C WALINA², J. NOŻYŃSKI³

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
1, NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

² SILESIAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT,
2, AKADEMICKA STR., 44-100 GLIWICE, POLAND

³ FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY,
345A, WOLNOŚCI STR., 41-800 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: ATUREK@VIP.INTERIA.PL

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the stability of the extracellular matrix structure in porcine pericardium after their decellularization. The influence of decellularizing substances on the tissues biochemical and morphological properties has been investigated. Tissues have been treated with solutions containing trypsin and sodium versenate (EDTA) or sodium dodecyl-sulfate (SDS) and sodium chloride. The SDS-PAGE electrophoresis and the optical microscopy have been used in researches. It has been shown that the tissues treatment with the solution containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA allows to obtain the acellular material.

Keywords: pericardium tissues, extracellular matrix, decellularization, structure stability, biomaterial

[Engineering of Biomaterials, 77-80, (2008), 110-113]

Introduction

The deficiency of human tissues causes the necessity of commercial usage of the xenogeneic material. Its complex stabilization is required in view of the animal tissues immunogenicity, and also of the risk of animal disease transmission [1,2]. The animal tissues stabilization is most often attained through the tissue proteins cross-linking, mainly by means of the glutaraldehyde (GA) [3]. As a result, the tissues immunogenicity decrease [2,4], and also their degradability decrease [5] are achieved. However, the GA-fixed tissues showed cytotoxicity [6], and the biomaterials premature calcification in vivo [7]. It also proved that one could not remove all cellular remains being responsible for immunogenicity and calcification of biomaterials. It resulted in the development of many different methods of removing cells from tissues. Enzymatic preparations [8] or surface active agents [9] are mostly used for this purpose. The natural scaffolds are obtained on which the autogeneic or allogeneic cells can be seeded in vitro. One supposes that such biomaterials persistence will be greater, as compared with xenografts modified by means of crosslinking.

The aim of the present study was to evaluate the stability of the extracellular matrix structure in porcine pericardium after their decellularization. The estimation has been carried out through the analysis of electrophoretic profiles of proteins released from tissues, and morphological changes in tissues.

Materiały i metody

Z próbek osierdzia świni usuwano komórki poprzez działanie (24h, temp. 37°C) roztworów zawierających trypsynę i wersenian sodu (EDTA), albo dodecylsulfian sodu (SDS) i chlorek sodu (NaCl), w różnych wariantach i stężeniach (TABELA 1).

Właściwości biochemiczne badano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE [10, 11]. Żel barwiono srebrem [11]. Elektroforegram analizowano z użyciem oprogramowania Scangel 1.45 (Kucharczyk T.E. Co).

Właściwości morfologiczne badano stosując mikroskop optyczny Polyvar 2 (Leica) przy powiększeniu 200x. Skrawki tkanek barwiono hematoksyliną i erytrozyną. Dokumentację preparatów wykonano z zastosowaniem systemu Quantimet 500 Plus.

Wyniki i dyskusja

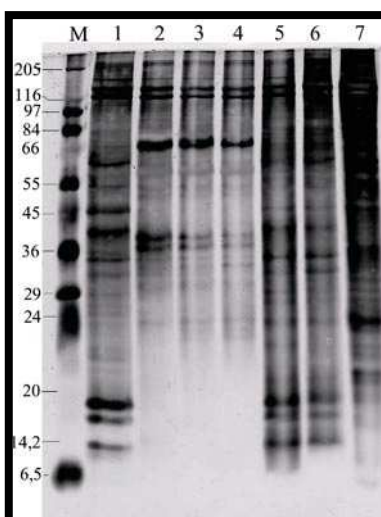
Rusztowania otrzymane z tkanek zwierzęcych dla de novo osadzanych komórek allogenicznymi lub autogenicznymi stanowią optymalne rozwiązanie w zastępowaniu chorych tkanek i narządów w przypadku deficytu tkanek ludzkich. Rusztowania do produkcji biologicznych zastawek serca otrzymuje się najczęściej z osierdzia wołu lub świni, a także z zastawek świńskich w wyniku ich traktowania preparatami enzymatycznymi albo substancjami powierzchniowo czynnymi [1,2]. Pozbawione komórek osierdzie świni może być używane do produkcji biomateriałów kontaktujących się z krwią, a także do uzupełniania małych ubytków tkanek.

W niniejszej pracy prowadzono badania elektroforetyczne i histologiczne osierdzia świni traktowanego substancjami rutynowo stosowanymi do usuwania komórek z tkanek, jak trypsyna, EDTA lub SDS i chlorek sodu NaCl.

Na RYS. 1 przedstawiono rozdział elektroforetyczny polipeptydów ekstrahowanych z tkanki natywnej i tkanek bezkomórkowych.

Istotne zmiany właściwości biochemicznych obserwowano dla tkanek traktowanych trypsyną i EDTA (RYS. 1, ścieżki 2-4) w porównaniu z tkanką natywną (RYS.1, ścieżka 1). W profilach elektroforetycznych białek uwalnianych z tkanek traktowanych trypsyną i EDTA (RYS. 1, ścieżki 2-4) ujawnił się brak polipeptydów o masie cząsteczkowej mniejszej niż 24 kDa, niezależnie od stężenia stosowanych substancji. Nie obserwowano istotnych zmian jakościowych między tkankami traktowanymi trypsyną i EDTA o różnych stężeniach (RYS. 1, ścieżki 2-4). Szczególnie wyraźne są widoczne polipeptydy o masie cząsteczkowej 82 kDa.

Według Beard i wsp. [12], trypsyna powoduje usunięcie z kolagenu peptydów niehelikalnych odpowiedzialnych za reakcje immunologiczne.



Materials and methods

TABELA 1. Składniki roztworów stosowanych do usuwania komórek z osierdzia świni.

TABLE 1. Components of solutions used for decellularization of porcine pericardium.

Substancja Substance	Wariant roztworu / Solution variant						
	1	2	3	4	5	6	7
	Stężenie / Concentration [%]						
Trypsyna Trypsin		0,05	0,3	0,5			
EDTA		0,02	0,2	0,2			
SDS					0,03	0,1	0,5
NaCl					0,9	0,9	0,9

Cells were removed from the porcine pericardium samples through their treatment (24 h, temp. 37°C) with solution containing trypsin and sodium versenate (EDTA), or solutions containing sodium dodecyl-sulfate (SDS) and sodium chloride (NaCl), in different variants and concentrations (TABLE 1).

Biochemical properties were analysed by means of SDS-PAGE electrophoresis [10, 11]. Gel was stained with silver [11]. Electrophoregram was analysed

using the Scangel 1.45 software (Kucharczyk T.E. Co).

Morphological properties were investigated using optical microscope Polyvar 2 (Leica), at 200x magnification. The tissue sections were stained with hematoxylin and erythrosin. The preparations documentation was performed using the Quantimet 500 Plus system.

Results and discussion

Scaffolds received from animal tissues for de novo seeded allogeneic or autogeneic cells represent optimal solution in replacement of sick tissues and organs in case of the human tissues deficit. Scaffolds for the biological heart valves production are received most often from the bovine or porcine pericardium, and also from porcine valves, as a result of their treatment with enzymatic preparations or with surface active agents [1,2]. Acellular porcine pericardium can be applied to production of biomaterials which are in contact with blood, and also to supplementing small defects of tissues.

In the present study, both electrophoretic and histological investigations were carried out on porcine pericardium treated with solutions containing substances routinely used for the tissues decellularization, as trypsin and EDTA, or SDS and NaCl.

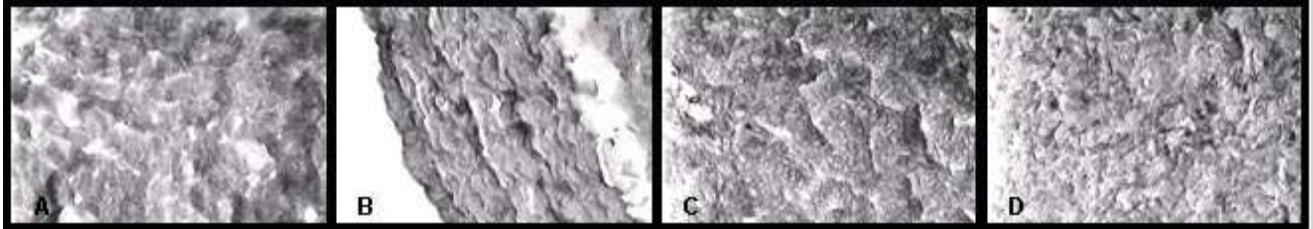
The electrophoretic distribution patterns of polypeptides extracted from native and acellular tissues are presented in FIG.1.

Essential changes in biochemical properties were observed for tissues treated with trypsin and EDTA (FIG.1, lanes 2-4), as compared with the native tissue (FIG.1, lane 1). The lack of polypeptides with molecular weight below 24 kDa appeared in electrophoretic profiles of proteins released

from tissues treated with trypsin and EDTA (FIG. 1, lanes 2-4), regardless of the reagent concentrations. Essential qualitative changes between tissues treated with trypsin and EDTA at different concentrations were not observed (FIG.1, lanes 2-4). Especially, the polypeptides with molecular weight of 82 kDa are clearly visible.

According to Beard et al. [12], the trypsin causes the removal of the collagen non-helical peptides responsible for immunological reactions.

RYS. 1. Profile elektroforetyczne polipeptydów ekstrahowanych z tkanki natywnej (ścieżka 1) i tkanek pozbawionych komórek (ścieżki 2-7; numery odpowiadają wariantom w TABELI 1); M – wzorzec mas cząsteczkowych. FIG. 1. Electrophoretic profiles of polypeptides extracted from native tissue (lane 1) and decellularized tissues (lanes 2-7; numbers relate to variants in TABLE 1); M – molecular weight standards.



RYS. 2. Tkanki traktowane roztworami zawierającymi trypsynę i EDTA w stężeniach 0,02% i 0,05% (A); 0,5% i 0,2% (B), lub zawierającymi SDS i NaCl w stężeniach 0,03% i 0,09% (C); 0,1% i 0,09% (D).

FIG. 2. Tissues treated with solutions containing trypsin and EDTA at concentrations of 0.02% and 0.05% (A); 0.5% and 0.2% (B), or containing SDS and NaCl at concentrations of 0.03% and 0.09% (C); 0.1% and 0.09% (D).

Wyniki uzyskane w tej pracy (RYS. 1, ścieżki 2-4) wskazują na możliwość stosowania trypsyny i EDTA w niskich stężeniach do usuwania komórek z osierdzia świni.

Obserwacja histologiczna tkanek osierdzia traktowanych różnymi stężeniami trypsyny i EDTA wskazuje na istotne zmiany morfologii badanych tkanek. Obrazy histologiczne wykazywały rozluźnioną strukturę tkanek i brak jąder komórkowych. Użycie mieszaniny zawierającej 0,05% trypsyny i 0,02% EDTA było wystarczające do usunięcia komórek (RYS. 2A). Przy stężeniach 0,5% trypsyny i 0,2% EDTA obserwowano obrzęk włókien łącznotkankowych (RYS. 2B).

Profile elektroforetyczne białek uwalnianych z tkanek traktowanych roztworami zawierającymi SDS (RYS. 1, ścieżki 5-7) różniły się istotnie od tych z trypsyną (RYS. 1, ścieżki 2-4). Roztwory SDS o stężeniach 0,03% (RYS. 1, ścieżka 5) i 0,1% (RYS. 1, ścieżka 6) w 0,9% NaCl powodowały najmniejsze zmiany, w porównaniu z tkanką natywną (RYS. 1, ścieżka 1). Zwiększenie stężenia SDS do 0,5% w roztworze 0,9% NaCl (RYS. 1, ścieżka 7) powodowało wzrost podatności tkanek na ekstrakcję białek (w porównaniu z tkanką natywną; RYS. 1, ścieżka 1), gdyż SDS niszczy wiązania wodorowe. Z drugiej strony, stosowanie SDS do usuwania komórek z macierzy zewnątrzkomórkowej może mieć pozytywny wpływ na biomateriały tkankowe, gdyż SDS jest substancją powierzchniowo czynną powodującą usunięcie fosfolipidów [13].

Badania histologiczne wykazały, że traktowanie tkanek roztworami zawierającymi 0,03% SDS (RYS. 2C) i 0,1% SDS (RYS. 2D) w roztworze 0,9% NaCl powoduje nieznaczne rozluźnienie struktury tkanki. Włókna łącznotkankowe pozostają jednak dobrze zachowane. W obrazie histologicznym tkanek widoczne są jednak śladowe ilości chromatyny. Pozostają one nawet przy zastosowaniu stężenia 0,5% SDS, które powoduje zniszczenie struktury włókien łącznotkankowych.

Wnioski

Wyniki badań elektroforetycznych wskazują, że traktowanie osierdzia świni roztworami zawierającymi 0,03% lub 0,1% SDS i 0,9% NaCl umożliwia zachowanie właściwości biochemicznych macierzy zewnątrzkomórkowej podobnych do właściwości tkanki natywnej. Metoda ta jednak nie pozwala na usunięcie pozostałości jąder komórkowych.

Przetwarzanie osierdzia włóknistego świni z zastosowaniem roztworu zawierającego 0,05% trypsyny i 0,02% EDTA pozwala na uzyskanie materiału pozbawionego komórek i pozostałości chromatyny, bez zniszczenia struktury włókien łącznotkankowych.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny.

Results obtained in this work (FIG. 1, lanes 2-4) indicate the possibility of trypsin and EDTA usage at low concentrations for decellularization of the porcine pericardium.

The histological observation of pericardium tissues treated with the trypsin and EDTA at different concentrations indicates essential changes in morphology of investigated tissues. Histological images showed the loose structure of the tissue and lack of cellular nuclei. The use of the mixture containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA was sufficient for tissue decellularization (FIG. 2A). Concentrations of 0.5% trypsin and 0.2% EDTA caused swelling of connective tissue fibers (FIG. 2B).

Electrophoretic profiles of proteins released from tissues treated with solutions containing SDS (FIG. 1, lanes 5-7) were considerably different from those containing trypsin (FIG. 1, lanes 2-4). Solutions containing SDS at concentrations of 0.03% (FIG. 1, lane 5) and 0.1% (FIG. 1, lane 6) in 0.9% NaCl caused least significant changes, as compared with the native tissue (FIG. 1, lane 1). An increase of the SDS concentration up to 0.5% in the solution of 0.9% NaCl (FIG. 1, lane 7) caused increase of the tissues susceptibility to extraction of proteins (as compared with native tissue; FIG. 1, lane 1), as SDS destroys the hydrogen bonds. On the other hand, the SDS usage in decellularization of the extracellular matrix can have advantageous effect on tissue derived-biomaterials as SDS is the surface active agent which causes removal of phospholipids [13].

Histological investigations showed that the tissues treatment with solutions containing 0.03% SDS (FIG. 2C) or 0.1% SDS (FIG. 2D) in the solution of 0.9% NaCl caused the slight looseness of the tissue structure, although the connective tissue fibers are still well preserved. However, the chromatin remains are visible in the tissues histological images. These traces remain in tissue even after usage of 0.5% SDS solution which leads to destruction of the connective tissue fibers structure.

Conclusions

The results of electrophoretic studies show that the porcine pericardium treatment with solutions containing 0.03% or 0.1% SDS and 0.9% NaCl makes it possible to maintain biochemical properties of extracellular matrix which are similar to native tissue. However, this method does not allow to remove all cellular debris from the pericardium tissue.

Processing porcine fibrous pericardium by their treatment with solution containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA allows to obtain the chromatin-free acellular material, without the connective tissue fibers structure destruction.

Acknowledgements

This work was financially supported by Silesian Medical University.

Piśmiennictwo

- [1] Khor E. Methods for treatment of collagenous tissues for bio-prostheses. *Biomaterials* 1997, 18: 95-105.
- [2] Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 2000, 21: 2215-31.
- [3] Cheung DT, Perelman N, Ko EC, Nimni ME. Mechanism of cross-linking of proteins by glutaraldehyde. III: Reactions with collagen in tissues. *Connect Tissue Res* 1985, 13: 109-15.
- [4] Meade KR, Silver FH. Immunogenicity of collagenous implants. *Biomaterials* 1990, 11: 176-80.
- [5] Cwalina B, Turek A, Nożyński J, Jastrzębska M, Nawrat Z. Structural changes in pericardium tissue modified with tannic acid. *Int J Artif Organs* 2005, 28:648-53.
- [6] Gendler E, Gendler S, Nimni ME. Toxic reactions evoked by glutaraldehyde – fixed pericardium and cardiac valve tissue bio-prosthesis. *J Biomed Mater Res* 1984, 18: 727-36.
- [7] Thoma RJ, Phillips RE. The role of material surface chemistry in implant device calcification: a hypothesis. *J Heart Valve Dis* 1995, 4: 214-21.

References

- [8] Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, Kleczka C, Ciubotaru A, Haverich A. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation* 2002, 106 (12 Suppl 1): I63-I8.
- [9] Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Wattersson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Tissue engineering of cardiac valve prostheses. II: Biochemical characterisation of decellularized porcine aortic hearts valves. *J Heart Valve Dis* 2002, 11: 463-71.
- [10] Laemmler UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-5.
- [11] Westermeier R. *Electrophoresis in Practice*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001.
- [12] Beard HK, Faulk WP, Conochie LB, Glynn LE. Some immunological aspects of collagen. *Prog Allergy* 1977, 22: 45-106.
- [13] Doillon CJ, Drouin R, Côte MF, Dallaire N, Pageau JF, Laroche G. Chemical inactivators as sterilization agents for bovine collagen materials. *J Biomed Mater Res* 1997, 37: 212-21.

ODDZIAŁYWANIE ŚRODOWISKA KOSTNO-MIĘŚNIOWEGO Z UKŁADEM PODPOROWO-CIĘGNOWYM W ALLOPLASTYCE SEGMENTU KRĘGOSŁUPA/ KRĘGOMOSTU ZWIERZĘCEGO

AGNIESZKA KIERZKOWSKA^{1,3*}, JACEK STERNA²,
LECHOSŁAW F. CIUPIK³, WOJCIECH BIELECKI²

¹ UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI, ZIELONA GÓRA, POLSKA

² SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO,
WYDZIAŁ MEDYCZYNY WETERYNARYJNEJ, W-WA. POLSKA

³ LFC, DEPARTMENT BADAŃ I ROZWOJU, ZIELONA GÓRA, POLSKA

* E-MAIL: LFC@LFC.COM.PL

Słowa kluczowe: stabilizacja kręgosłupa, alloplastyka, implant, badania na zwierzętach, reakcja tkanek

[*Inżynieria Biomateriałów, 77-80, (2008), 113-116*]

Wprowadzenie

Największą grupę biomateriałów stosowanych w chirurgii kostnej stanowią materiały metaliczne, w tym stale Cr-Ni-Mo, tytan i jego stopy, stopy na osnowie kobaltu, tantal, niob i ich stopy, metale szlachetne oraz stopy z pamięcią kształtu [1]. Poza nimi wykorzystuje się ceramikę, węgle, polimery i kompozyty i materiały resorbowalne, które są aktualnie przedmiotem intensywnych prac badawczych na całym świecie. Szczególny postęp obserwuje się w rozwoju materiałów niemetalicznych oraz w tendencji do łączenia biomateriałów w celu większego zbliżenia do różnorodnych właściwości tkanek miękkich i kości z jednoczesną pożądaną biotolerancją i wytrzymałością [2]. Innym sposobem na zwiększanie biofunkcjonalności implantów kostnych jest łączenie materiałów o różnych właściwościach z uwzględnieniem ich najkorzystniejszych cech w całość konstrukcyjną sprzyjającą najpełniejszemu wspomagananiu zdrowia człowieka. Można mówić wówczas o implantach wielo-komponentowych.

THE INFLUENCE OF MUSCULOSKELETAL ENVIRONMENT ON BEARING-TENSIONING SYSTEM IN ALLOPLASTY OF THE ANIMAL SPINE

AGNIESZKA KIERZKOWSKA^{1,3*}, JACEK STERNA²,
LECHOSŁAW F. CIUPIK³, WOJCIECH BIELECKI²

¹ UNIVERSITY OF ZIELONA GORA, ZIELONA GORA, POLAND

² WARSAW UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES,
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, WARSAW, POLAND

³ LFC, LTD, ZIELONA GORA, POLAND

* E-MAIL: LFC@LFC.COM.PL

Keywords: spine stabilization, alloplastics, implant, animal research, tissue reaction

[*Engineering of Biomaterials, 77-80, (2008), 113-116*]

Introduction

The largest group of biomaterials applied in osseous surgery are metallic materials, including Cr-Ni-Mo steel, titanium and its alloys, cobalt matrix alloys, tantalum, niobium and its alloys, noble metals and shape memory alloys [1]. Furthermore ceramics, carbon, polymers, composites and resorbable materials are used which are currently subject of intensive science studies all over the world. The special progress is observed in development of non-metallic materials as well as in connection of biomaterials in order to receive closer similarity to various properties of soft tissues and bones with simultaneous expected biotolerance and strength [2]. The other way to enlarge the bio-functionality of bone implants is to connect materials with different properties, taking under consideration its best features, into complete construction favouring the best human health support. In this case we can speak about multi-component implants.