

BADANIA REAKTYWNOŚCI LEUKOCYTÓW KRWI PO KONTAKCIE Z MATRYCAMI ŻELATYNOWO-ALGINIANOWYMI

MARIA SZYMONOWICZ¹, ALEKSANDRA PLISZCZAK-KRÓL², STANISŁAW PIELKA¹, JAROSŁAW KRÓL², STANISŁAW GRACZYK², DOROTA HAZNAR³, JANUSZ PLUTA³

¹AKADEMIA MEDYCZNA, ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA MATERIAŁÓW, UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCLAW, POLSKA

²UNIwersytet PRZYRODNICZY, WYDZIAŁ MEDYCZYNY WETERYNARYJNEJ, KATEDRA ANATOMII PATOLOGICZNEJ, PATOFIZJOLOGII, MIKROBIOLOGII, UL. NORWIDA 31, 50-375 WROCLAW POLSKA

³AKADEMIA MEDYCZNA, KATEDRA I ZAKŁAD TECHNOLOGII POSTACI LEKU, UL. SZEWSKA 38, 50-139 WROCLAW, POLSKA

* E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 29-30*]

Wprowadzenie

Przy ocenie biomateriałów przeznaczonych do czasowego kontaktu z tkankami niezbędna jest obserwacja wzajemnych relacji materiału i komórek krwi, dotyczących ewentualnych zmian morfologicznych i czynnościowych [1,2].

Zmiany morfologiczne w komórkach, wynikające ze zmian ich reaktywności, związane są m.in. z reorganizacją cytoszkieletu komórkowego [3]. O reorganizacji cytoszkieletu pośrednio może świadczyć pojawienie się w komórkach jednojądrzastych krwi radialnej segmentacji jądra (RS) – są to głębokie szczeliny w jądrze, zbiegające się koncentrycznie w centrum i powstające w wyniku przyspieszonej depolimeryzacji mikrotubuli [4-6].

Zdolność komórek do fagocytozy umożliwia usuwanie z organizmu czynników chorobotwórczych pochodzenia zewnętrznego, jak również usuwanie endogennych substancji toksycznych, komórek rozpadłych [6]. W trakcie przebiegu tego procesu nasileniu ulega metabolizm tlenowy komórek żernych (np. granulocytów). W wyniku tlenowych przemian metabolicznych komórki produkują aktywne związków tlenu. Związki te ze względu na ich toksyczność, z jednej strony są wykorzystywane przez komórki w trakcie wypełniania funkcji (np. tlenozależny układ niszczenia drobnoustrojów neutrofilii). Z drugiej jednak, przyczyniają się do przyspieszonego starzenia się czy uszkodzenia komórek (stres oksydacyjny).

Celem pracy była ocena zmian morfologicznych oraz czynnościowych leukocytów po czasowym kontakcie krwi z matrycami żelatynowo-alginianowymi w badaniach in vitro.

Materiały

Do badań użyto czterech rodzajów matryc żelatynowo-alginianowych o strukturze gąbki. Gąbki pozyskano metodą liofilizacji piany powstałej poprzez spienienie mieszaniny jałowych roztworów żelatyny (20%), alginianu sodu (2% lub 4%) oraz glicerolu (3% lub 5%) w odpowiednich proporcjach (TAB. 1). Doświadczenie wykonano na krwi pobranej na heparynę (10 j/ml krwi) od klinicznie zdrowych świń.

Matryca / Matrix	Żelatyna / Gelatine	Alginian sodu / Sodium alginate	Glicerol / Glycerol
3A	8 cz/part 20%	2 cz/part 2%	3%
5A	8 cz/part 20%	2 cz/part 2%	5%
3B	8 cz/part 20%	2 cz/part 4%	3%
5B	8 cz/part 20%	2 cz/part 4%	5%

TABELA 1.
TABLE 1.

STUDIES OF THE REACTIVITY OF LEUKOCYTES AFTER CONTACT WITH GELATINE-ALGINATE MATRIXES

MARIA SZYMONOWICZ¹, ALEKSANDRA PLISZCZAK-KRÓL², STANISŁAW PIELKA¹, JAROSŁAW KRÓL², STANISŁAW GRACZYK², DOROTA HAZNAR³, JANUSZ PLUTA³

¹MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, 2 PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCLAW, POLAND

²WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES, THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, DEPARTMENT OF PATHOLOGICAL ANATOMY, PATHOPHYSIOLOGY,

MICROBIOLOGY AND FORENSIC VETERINARY MEDICINE, 31 NORWID STR., 50-375 WROCLAW, POLAND

³WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, FACULTY OF PHARMACY CHAIR AND DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, 38 SZEWSKA STR., 50-139 WROCLAW, POLAND

* E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

[*Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 29-30*]

Introduction

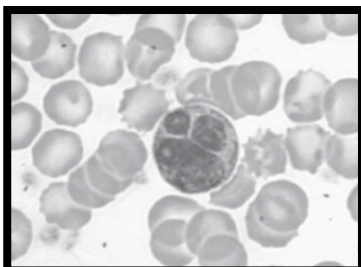
Observation of the relations between material and blood cells, concerning possible morphological and functional changes is necessary for the evaluation of biomaterials assigned for temporal contact with tissues [1,2]. The morphological changes in cells, resulting from the changes of their reactivity are connected, among others, with reorganisation of the cellular cytoskeleton [3]. The appearance of a radial segmentation of the nucleus (RS) in mononuclear blood cells indirectly proves the cytoskeleton reorganization – these are deep clefts in the nucleus gathering concentrically in the centre and appearing as a result of the accelerated depolymerization of microtubules [4-6]. The phagocytic ability of cells enables to remove external pathogens as well as endogenous toxic substances, destroyed cells from the organism [6]. The aerobic processes in phagocytes are more intensive during phagocytosis and the active oxygen derivatives are produced. Because of their toxicity these compounds are used by the cells in performing functions (e.g. the oxygen-dependent system of damaging of microorganisms in granulocytes). On the other hand, they cause an accelerated ageing or damaging of cells (oxidation stress).

Evaluation of the morphological and functional changes of leukocytes after temporal contact of blood with gelatine-alginate matrixes in tests in vitro was the purpose of the study.

Materials

Four kinds of gelatine-alginate matrixes with the sponge structure were used for the tests. The sponges were obtained by lyophilization of foamed mixture of sterile solutions of gelatine (20%), sodium alginate (2% or 4%) and glycerol (3% or 5%) in the proper proportions (TAB. 1). The test was performed on heparinized blood (10 j/ml) sampled from clinically healthy pigs.

Reaktywność leukocytów oceniano na podstawie:
- zdolności komórek jednojądrzastych krwi do tworzenia radialnej segmentacji jąder - badania spontanicznej i indukowanej radialnej segmentacji jąder (Radial Segmentation – RS),



RYS. 1. Limfocyt z jądrem segmentowanym. - Radial Segmentation (RS). FIG. 1. Radial segmentation of nuclei in lymphocyte - Radial Segmentation (RS).

RYS. 1. [3,4],
- zdolności leukocytów do fagocytozy - badania fagocytozy z użyciem komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, RYS. 2 [4,5],

- aktywności przemian tlenowych w leukocytach - badania zdolności do redukcji błękitu nitrotetrazolowego [6].

Wyniki

Matryce żelatynowo-alginiatowe w kontakcie z krwią ulegały rozpuszczeniu w czasie do 15 min., w związku z czym badania były wykonane na postaci płynnej materiału. Stwierdzono, że oceniane matryce obniżają zdolność komórek jednojądrzastych (limfocytów i monocytów) krwi do tworzenia radialnej segmentacji jądra (RS) i zdolność leukocytów do redukcji błękitu nitrotetrazolowego. Nasilają natomiast proces fagocytozy. Osłabienie zdolności komórek jednojądrzastych do tworzenia RS, po ich czasowym kontakcie z matrycami, świadczy o reorganizacji cytoszkieletu mikrotubularnego tych komórek. Związane jest to prawdopodobnie ze stabilizacją mikrotubuli, warunkowaną spowolnieniem lub zatrzymaniem depolimeryzacji. Obserwowany zwiększony udział odsetkowy komórek (neutrofilii) ze sfagocytowanymi komórkami drożdży przemawia za nasileniem ich aktywności fagocytarnej. Jednak obniżenie zdolności leukocytów do redukcji NBT sugeruje mniejszą jej skuteczność [4].

Wnioski

Kontakt krwi z matrycami żelatynowo-alginiatowymi nie wywołał zmian morfologicznych w komórkach krwi. Spowodował natomiast zmiany ich reaktywności.

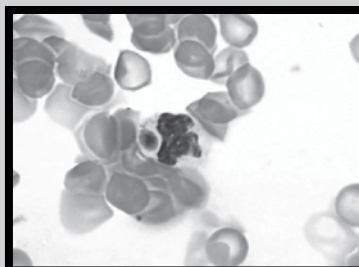
Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 1260 Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Piśmiennictwo

- [1] Szymonowicz M., Pielka S., Owczarek A, Haznar D., Pluta J.: Study on influence of gelatine-alginate matrixes on the coagulation system and morphotic blood elements. *Macromolecular Symposia* 253, (2007), 71-76.
- [2] Min Ding, Robinson J. M., Behrens B. C., Vandre D.D.: The microtubule cytoskeleton in human phagocytic leucocytes is a highly dynamic structure. *Eur. J. Cell.Biol.* 66, (1995), 234-245.
- [3] Graczyk S., Madej J., Pliszczak-Król A., Nowak M., Janczyk B.: Leukocytes function in the course of tumor progression in a rat model. *Acta Sci Pol Vet* 3, (2004), 45-51.

The reactivity of leukocytes was evaluated on the basis:
- the ability of mononuclear blood cells to create radial segmentation of nuclei – tests of the spontaneous and induced radial segmentation of nuclei (Radial Segmentation – RS),



RYS. 2. Granulocyt obojętnochłonny-wewnątrzsfagocytowana komórka drożdży. FIG. 2. Neutrophilic granulocyte - inside phagocytosed yeast cell.

FIG. 1 [3,4],
- the ability of leukocytes for phagocytosis – phagocytic tests with use of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*, FIG. 2 [4,5],

- activity of oxygen metabolic processes in leukocytes – tests of the ability for nitroblue tetrazolium reduction [6].

Results

The gelatine-alginate matrixes after contact with blood were dissolved till 15 minutes. That is why the tests were performed on the liquid form of the material. It was observed that the evaluated matrixes decreased the ability of mononuclear cells of blood (limphocytes and monocytes) to create the radial segmentation of nucleus (RS) and the ability of leukocytes to nitroblue tetrazolium reduction. However, they strengthen the phagocytosis. The decreased ability of mononuclear cells to create RS, after their temporal contact with matrixes, proves the reorganisation of the microtubular cytoskeleton in these cells. It is probably connected with the stabilisation of microtubules conditioned by slowing down or stopping of the depolimerization. The observed increased percentage of cells (neutrophils) with phagocytized yeasts proves their stronger phagocytic activity. However, the decreased ability of leukocytes to reduce NBT suggests smaller efficiency of phagocytosis [4].

Conclusions

Contact blood with gelatine-alginate matrixes did not cause morphological changes in blood cells. However, it caused changes in their reactivity.

Acknowledgements

The work was supported by the project No. 1260 of the Wrocław Medical University.

References

- [4] Pliszczak-Król A. Graczyk S. Król J., Janczyk B.: Ocena reaktywności leukocytów krwi obwodowej u szczurów anemizowanych. *Med. Wet.* 62, 12, (2006), 1435-1438.
- [5] Slapnickova M. Berger J.: Rat neutrophil phagocytosis following feed restriction. *Comp. Clin. Path.* 11, (2002), 172-177.
- [6] Dęboczyński W., Pietruska Zofia: Ocena testu NBT w metodach cytochemicznej i spektrofotometrycznej. *Pol. Tyg. Lek.* 44 ,14, (1989), 332-333.