

WPLÝW MATERIAŁÓW ZOL-ŻEŁOWYCH NA HODOWLE KOMÓRKOWE

IWONA HOŁOWACZ*, ANNA MARCINKOWSKA**,
HALINA PODBIELSKA*, JOANNA BAUER*, TERESA BANAS**

*GRUPA BIO-OPTYKI, INSTYTUT FIZYKI,
POLITECHNIKA WROCLAWSKA,
50-370 WROCLAW, WYBRZEZE WYSPIANSKIEGO 27

**KATEDRA I ZAKLAD BIOCHEMII LEKARSKIEJ,
50-368 WROCLAW, UL. CHALUBINSKIEGO 10

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),224-225]

Wstęp

Biomateriały zol-żelowe znajdują coraz liczniejsze zastosowania [1,2,3,4]. Dlatego ważne staje się badanie ich wpływu na obiekty biologiczne. W niniejszej pracy przedstawiano rezultaty badań na komórkach hodowanych na materiałach zol-żelowych o różnej zawartości etanolu.

Materiał

Hydrolizaty do produkcji zol-żeli przygotowano z prekursora tetraetoksylanu $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ 98% TEOSu (Aldrich). Rozpuszczalnikiem był alkohol etylowy 96% (Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.). Reakcję hydrolizy katalizowano silnie stężonym kwasem solnym HCl 36% (POCH), dodawano kolejno po 5 μl do uzyskania pH 2. Do hydrolizatu dodano środek powierzchniowo czynny Triton X-100 (Aldrich), na każde 10ml hydrolizatu dodano 20 μl detergentu. Hydrolizę przeprowadzono mieszając składniki na mieszalniku magnetycznym przez 8 godzin w temperaturze 22oC. Wytworzono materiały o współczynniku R=5, 10, 15, 20, 32, 40, 50, gdzie R oznacza stosunek liczby moli rozpuszczalnika do liczby moli prekursora R [5].

Badanie wpływu materiałów zol-żelowych na komórki linii Jurkat i A549

Przygotowanie podłoża

Przygotowano dwie serie płytek hodowlanych z okrągłymi dołkami firmy Nunclon Company, na które naniesiono różne warstwy zol-żeli. W pierwszej serii (A) na dno dołków naniesiono po 10ml hydrolizatu zol-żelowego. W drugiej serii (B), do dołków hodowlanych wklepiono 15ml hydrolizatu, następnie po 5 minutach, gdy pierwsza warstwa już była sucha, naniesiono kolejne 15ml hydrolizatu; w ten sposób na dno dołka powstały dwie warstwy. Dla serii A i B wykonano podwójne próbki, przy czym jeden rząd (każdy rodzaj materiału) po zżelowaniu przemyto płynami hodowlanymi (odpowiednimi dla danej linii komórkowej) przed naniesieniem komórek, natomiast drugi pozostawiono nieprzemity.

Materiał biologiczny

Badania przeprowadzono na komórkach nowotworowych ludzkich linii limfoblastycznej chłoniaka T komórkowego - Jurkat, rosnących w toni medium oraz linii epitelialnej raka płuc - A549, przylegających w hodowli do podłoża. Dla linii Jurkat używano medium RPMI-1640 (R8758) firmy Sigma z dodatkiem 10% FBS (Fetal Bovine Serum) firmy Cambrex. Dla linii A549 zastosowano medium MEM (Minimum Essential Medium Eagle M2279) firmy Sigma z suplementacją 0,292 g/1L - glutaminą i 10% FBS. Komórki do doświadczeń pobrano z butelek hodowlanych, hodowla komórek znajdowała się w II fazie logarytmicznej wzrostu. Do dołków hodowlanych z warstwami zol-żeli naniesiono po 1 ml zawiesiny komórek w odpowiednim medium. Kontrole stanowiły analogiczne hodowle, założone w

INFLUENCE OF SOL-GEL BIOMATERIALS ON BIOLOGICAL CELLS GROWTH IN VITRO

IWONA HOŁOWACZ*, ANNA MARCINKOWSKA**,
HALINA PODBIELSKA*, JOANNA BAUER*, TERESA BANAS**

*BIO-OPTICS GROUP, INSTITUTE OF PHYSICS,
WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
WYBRZEZE WYSPIANSKIEGO 27, 50-370 WROCLAW, POLAND

**DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY,
50-368 WROCLAW, UL. CHALUBINSKIEGO 10

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),224-225]

Introduction

The sol-gel based biomaterials have found many interesting applications [1,2,3,4]. Therefore, it is important to examine their influence on biological materials in view of potential biocompatibility. In this work, the results of examination of cells growth on sol-gel materials prepared with various ethanol content, are discussed.

Material

The hydrolizates for production of sol-gels were prepared from precursor 98% tetraethoxysilan $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS from Aldrich). As a solvent 96% ethyl alcohol (from POCh - Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.) was used. The hydrolysis was catalized by 36% HCl (POCH), added in portions of 5 μl up to the moment when pH=2 was reached. As a surfactant Triton X-100 (Aldrich) in amount of 20 μl on each 10ml of hydrolizate was used. The mixture was stirred 8 hours by means of magnetic stirrer in the temperature 22oC. The following materials were produced: with ratio R = 5, 10, 15, 20, 32, 40, 50, denoting the number of solvent moles to the number of TEOS moles [5].

Examination of sol-gel influence on cells lines Jurkat and A549

Preparation of substrates

Two series of samples were prepared on bottom-plates (circulars from Nunclon Company) that were covered by sol-gels. In the first group (A), 10ml liquid sol-gel was deposited in each hole. In a group B, 15ml hydrolizate was deposited, and after 5 minutes, when the first layer was dried, next layer with the same amount of sol-gel was created. After polycondensation of sol-gels, the tested cells were seeded.

Biological materials

Two types of cells were cultured. The lymphoblastic T lymphoma cells Jurkat grow in the suspension of medium, whereas epithelial lung carcinoma cells - A549, show the superficial growth on substrate. For Jurkat cells the typical medium RPMI-1640 (R8758) from Sigma with addition of 10% FBS (Fetal Bovine Serum) from Cambrex, was applied. For A549 cells, the medium MEM (Minimum Essential Medium Eagle M2279) from Sigma supplemented with 0,292 g/1L glutamine and 10% FBS, was used. The 1 ml cells suspension in corresponding medium was seeded on sol-gels. As a control, the cells seeded on plates without sol-gels were taken. Some of the sol-gels, prior to cells seeding, were pre-washed with corresponding culture medium. The plates were incubated in the temperature of 37°C in the atmosphere of 5% CO₂ for 48 hours.

Results

First, the Jurkat cells on sol-gels were evaluated micro-

dołkach nie pokrytych materiałem. Płytki umieszczono w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ na 48 godzin.

Wyniki

Komórki linii Jurkat hodowane na pojedynczych cienkich warstwach zol-żelowych w badaniu mikroskopowym wyglądały prawidłowo, po przeliczeniu nie wykazano istotnych różnic ilościowych, komórki mnożyły się.

Komórki linii A549 rosnące w postaci monowarstwy przykleiły się do podłoża zol-żelowych, nie było możliwe ich odklejenie i wiarygodne policzenie. Jednak wygląd utworzonych monowarstw, oglądanych pod mikroskopem, nie wskazywał na różnice ilościowe w zależności od rodzaju zol-żelu. Wygląd komórek był prawidłowy, obserwacja ta wskazuje na brak istotnych toksycznych wpływów warstw zol-żelowych na komórki.

Warstwy zol-żeli serii B uległy znacznym deformacjom, uniemożliwiając zebranie komórek do badań ilościowych. Mikroskopowa ocena komórek wskazywała jednak na brak wpływów cytotoksycznych zol-żeli, nie zaobserwowano martwych komórek.

Cytotoksyczność badano używając testu TOX-1 firmy Sigma, w którym dehydrogenazy mitochondrialne, tylko dla komórek z aktywnymi metabolicznie mitochondriami, powodują przekształcenie żółtego barwnika MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) w nierozpuszczalne w wodzie niebieskofioletowe formazany, które po rozpuszczeniu w mieszaninie 10% TritonX-100/0,1N HCl/ izopropanol oznaczono za pomocą spektrofotometru ($\lambda=570\text{nm}$) [6,7]. Wyniki badań porównano z absorpcją dla próbek kontrolnych. Test przeżywalności komórek linii Jurkat na warstwach zol-żelowych wykazał brak istotnego wpływu obecności zol-żeli na proliferację i żywotność komórek. Nie wykazano również wpływu przemywania warstw zol-żeli przed naniesieniem komórek na ich żywotność. Najlepszą zgodność testu uzyskano dla materiału o współczynniku $R=20$.

Wykonano również badania nad apoptozą komórek metodą kometową [8]. Zastosowano pięciostopniowy system rozpoznawania uszkodzeń w/g Shingo Yasuhara [9]. Nie wykazano istotnego wpływu zol-żeli na komórki linii Jurkat. Nie wykazano również wpływu przemywania materiału przed naniesieniem na niego komórek oprócz zol-żelu o współczynniku $R=40$. Najmniejszy wpływ na skłonność komórek do śmiertelnych uszkodzeń na drodze apoptozy czy uszkodzeń niezidentyfikowanych miał materiał o współczynniku $R=20$. Zaobserwowano również, że materiał o tym współczynniku, niezależnie od grubości warstwy pozostawał przezroczysty w trakcie oddziaływania z medium hodowlanym i komórkami, nie wpływał na przejrzystość komórek, pozostał całkowicie obojętny biologicznie względem komórek linii JURKAT.

Otrzymane wyniki świadczą o tym, że odpowiednio przygotowany materiał zol-żelowy nie wykazuje właściwości cytotoksycznych.

Podziękowania

Badania wykonano częściowo w ramach grantu KBN No. 4T11E01124.

scopically. They demonstrated the proper structure, ability to growth and no statistically significant difference when comparing to control group.

The A549 cells grew as a monolayer on sol-gel substrates and it was not possible to separate them from these substrates, therefore the quantitative analysis was not conducted. However, in the qualitative microscopic evaluation, there was no difference between cells on sol-gels and in the control group. The influence of type of sol-gel (here meaning R factor, what corresponds to ethanol content) was not observed, as well.

In the group B (double layered sol-gels) the cells grew into the sol-gel material, which was deformed, so it was difficult to harvest them for quantitative analysis. However, non cytotoxic effects were observed.

Cytotoxicity was examined by means of TOX-1 test from Sigma, based on transformation of yellow dye MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) into hydrophobic formazanes, which can be examined spectrophotometrically after dissolving in mixture of 10% TritonX-100/0,1N HCl/ isopropanol ($\lambda=570\text{nm}$) [6,7]. This transformation takes place in cells with metabolically active mitochondria, only.

The results were compared with absorption for control group. In case of Jurkat cells, no differences in proliferation when comparing to control group, were stated. However, the best results were observed for sol-gel materials prepared with ratio $R=20$. Additionally, the apoptosis was examined by means of comet assay [8], by using the method of Shingo Yasuhara for damage detection [9].

Also in this case, no influence of sol-gels on Jurkat cells was observed. Slightly difference was observed for material with $R=40$, regarding the prewashed and non pre-washed substrates. The lowest number of changes in cells was observed for sol-gel with ratio $R=20$, which was absolutely neutral.

These results clearly demonstrate that it is possible to produce non-cytotoxic sol-gel material.

Acknowledgements

The support of the Polish Ministry of Science, Grant KBN No. 4T11E01124 is gratefully acknowledged.

Piśmiennictwo

- [1] Boettcher H.: Bioactive sol-gel coatings, J. Prakt. Chem. 342, 427-436, (2000).
- [2] Kim H-W., Kim H-E., Knowles J.C.: Fluor- hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants, Biomaterials 25, 3351-3358, (2004).
- [3] Gan L., Pilliar R.: Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization, Biomaterials 25, 5303-5312, (2004).
- [4] Podbielska H., Ulatowska-Jarza A., Holowacz I., Sol-gel applicators for medical light therapy, Physica Medica, Vol. XX, Supplement 1, 2004, 43-45.
- [5] Brinker C.J., Scherer G.W.: Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. Academic Press, San Diego (1990).
- [6] Carmichael J., et al.: Evaluation of tetrazolium-based, semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, Cancer Res., 47: 936-942 (1987).
- [7] Denizot F., Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, J. Immunol. Meth., 89: 271 (1986)
- [8] Olive P.L., Frazer G., Banath J.P.: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, Radiat. Res., 136: 130-136 (1993).
- [9] Shingo Yasuhara, et al.: Comparison of comet assay, electron microscopy and flow cytometry for detection of apoptosis, J. Histochemistry and Cytochemistry, 51: 873.