

WPLÝW POLIMERÓW ZASTOSOWANYCH JAKO NOŚNIKI LEKÓW W POROWATYCH IMPLANTACH KORUNDOWYCH NA LEUKOCYTY LUDZKIEJ KRWI OBWODOWEJ- BADANIA IN VITRO

STANISŁAW PIELKA*, ANNA CZARNY**, EWA ZACZYŃSKA**,
BOGUSŁAWA ŻYWICKA*, JOANNA KARAS***
ZBIGNIEW JAEGERMANN*** SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI***

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW AKADEMII MEDYCZNEJ

WE WROCŁAWIU UL PONIATOWSKIEGO 2

** INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ PAN

WE WROCŁAWIU UL WEIGLA 12

***INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI W WARSZAWIE

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 143-145]

Zalety porowatej ceramiki korundowej, jako materiału implantacyjnego, zachęciły do badań nad zastosowaniem jej jako nośnika leków czy żywych komórek w inżynierii tkankowej. Ważnym jest przy tym dobór ceramiki o odpowiedniej porowatości ułatwiającej odżywianie, proliferację i różnicowanie komórek. Użycie nośnika o dużej porowatości, to znaczy wysokim stosunku pola powierzchni do objętości, ma szczególne znaczenie w przypadku implantacji przewidzianych do bogato unaczynionych organów. Najefektywniejsze rozwinięcie pola powierzchni materiału uzyskuje się przy wytworzeniu ceramiki o małych porach, lecz wielkość ich winna być jednak optymalna dla rozmiarów i metabolizmu otaczających je komórek [1]. Zapewnia to odpowiednią przestrzeń do przenikania mnożących się komórek, wytwarzania substancji międzykomórkowej i unaczynienia [2]. Tak przygotowane materiały korundowe mogą być również nośnikami polimerów przeznaczonych do kumulacji i uwalniania leków. Badanie oddziaływania porowatej ceramiki z nośnikami polimerowymi na leukocyty ludzkiej krwi obwodowej może udzielić odpowiedzi o ich cytotoksycznym lub proliferacyjnym oddziaływaniu, a także o potencjalnej wczesnej i późnej reakcji tkankowej i być może okazać się cennym testem do praktycznej selekcji materiałów [3, 4]. Celem badań była ocena toksycznego działania biomateriałów na leukocyty ludzkiej krwi obwodowej w teście MTT.

Material i metody

Badano dwa nośniki polimerowe: hydroksypropylometylocelulozę i poli(alkohol winylu), którymi nasączono tworzywa korundowe o tym samym składzie chemicznym lecz różniące się technologią wytwarzania i porowatością. Do tego celu zastosowano dwa tworzywa korundowe:

1. o porowatości 80-90%, wytwarzane metodą wypalania gęstwy ceramicznej naniesionej na matrycę organiczną. Tworzywo to zostało nasączone próżniowo nośnikiem w postaci hydroksy-propylometylocelulozy, HPMC firmy Fluka.

INFLUENCE OF POLYMERS USED AS MEDICAMENTS CARRIERS IN POROUS CORUNDUM GRAFTS ON LEUKOCYTES OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD- IN VITRO STUDIES

STANISŁAW PIELKA*, ANNA CZARNY**, EWA ZACZYŃSKA**,
BOGUSŁAWA ŻYWICKA*, JOANNA KARAS***
ZBIGNIEW JAEGERMANN*** SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI***

*MEDICAL UNIVERSITY, INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH,

PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW, POLAND,

**INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY,

POLISH ACADEMY OF SCIENCES,

R.WEIGLA 12, 53-114 WROCŁAW, POLAND

***INSITUTE OF GLASS AND CERAMICS IN WARSAW

[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 143-145]

Successes of porous corundum ceramics as graft material encouraged to studies of its usage as medicaments or living cells carrier in tissue engineering. Selection of ceramics with proper porosity making nourishment, proliferation and differentiating of cells easier is important. Usage of carrier with large porosity, high relation of surface field to volume is particularly essential in case of imlantations to high vascularized organs. The most effective development of surface field of material is achieved in producing ceramics with small pores but their size should be best for the sizes and metabolism of the surrounding cells [1]. It ensures proper space for permeation of cells cultures, producing intercellular substance and vascularisation [2]. Such prepared corundum materials can be carriers of polymers for medicaments revelling. Influence of porous ceramics with polymers carriers on leukocytes of human peripheral blood can explain its cytotoxic or potential proliferating influence and potential early and late tissue reaction and it can turn out a sensitive test for practical biomaterial selection [3, 4]. The objective of this study was to examine the in vitro cytotoxicity activities of a biomaterials on a human pripheral blood leukocytes using MTT cytotoxicity assay.

Material and methods

Two polymer carriers were tested: hydroxypropylmethylcellulose and vinyl polyalcohol with corundum materials with witch corundum materials with which corundum materials with the same chemical composition but different producing technology were dripped. For that aim corundum materials were used:

1. with porosity 80-90% produced with cauterization of ceramic density brought on organic matrix. That material was vacuum dripped carrier as hydroxypropylmethylcellulose, HPMC produced by Fluka.
2. with porosity 60-70% produced with cauterisation of ceramic density chemically foamed. That material was vacuum

2. o porowatości 60÷70%, wytwarzane metodą wypalania gęstwy ceramicznej spienianej chemicznie. Tworzywo to zostało nasączone próżniowo nośnikiem w postaci poli(alkoholu winylu), PAW o nazwie handlowej Poval-05 firmy Shin-Etsu.

Tak przygotowane materiały zostały wysuszone metodą liofilizacji, a następnie poddane sterylizacji radiacyjnej w warunkach standardowych dla materiałów medycznych.

Krew

Krew pochodziła z Wrocławskiego Centrum Krwiodawstwa i pobierana była od grupy zdrowych wolontariuszy w wieku od 18 do 45 lat.

Metoda izolacji leukocytów ludzkiej krwi obwodowej

Krew pobierano na heparynę w stosunku 1:10, leukocyty izolowano przez wirowanie w gradiencie gęstości 1,115 g/ml z użyciem Gradisolu (Aqua-Medica Poznań). 5ml krwi nawarstwiano na 3ml gradisolu i wirowano przez 30 min./400xg. Zebrane leukocyty płukano dwukrotnie w medium hodowlanym RPMI1640 z dodatkami i zawieszano w medium do do gęstości 2×10^6 komórek/ml.

Test cytotoksyczności

Test cytotoksyczności wykonano na leukocytach ludzkiej krwi obwodowej. Na płytkę 24 dołkową firmy Costar nanoszono po 1 ml zawiesiny leukocytów o gęstości 1×10^6 / ml zawieszonych w medium hodowlanym RPMI1640 z dodatkiem 2% surowicy cielęcej, penicyliny, i streptomycyny. Do tak przygotowanych komórek dodawano jałowe próbki badanych biomateriałów o wadze 10 mg, następnie inkubowano w temp. 37°C w wilgotnej atmosferze z 5% CO₂. Cytotoksyczność biomateriałów badano po 24 i po 72 godzinnej inkubacji.

Cytotoksyczność ceramiki korundowej HPMC i PAW w teście MTT

Do oceny cytotoksyczności biomateriałów zastosowano analizę kolorymetryczną z wykorzystaniem testu MTT [3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl) 2,5-diphenyltetrazoliumbromide]. Wskaźnikiem żywotności komórek w teście jest aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy. Użyto MTT (Sigma, St. Louis, MO) o stężeniu 5 mg/ml rozpuszczonego w PBS. Dla pomiaru przeżywalności komórek, do każdego dołka płytki zawierającego biomateriały z hodowlą leukocytów dodawano 25 µl roztworu MTT i inkubowano w temp. 37°C w wilgotnej atmosferze z 5% CO₂. Następnie do każdego dołka dodawano 100 µl mieszniny lizującej (45 ml dimethylformamide, 13,5 g sodium dodecyl sulfat i 55 ml wody destyl.) i po 3 h inkubacji w 37°C odczytano wartość absorbancji przy długości fali $\lambda = 570$ nm na czytniku (Start Fax Awareness Technology, Inc. 2100).

Wyniki

Cytotoksyczność ceramiki korundowej z nośnikami polimerowymi PAW i HPMC określana była na podstawie oddziaływania na leukocyty ludzkiej krwi obwodowej. Wyniki badań cytotoksyczności in vitro ilustrują ryciny: RYS.1. A i B. Wskazują one, że ceramika korundowa z HPMC nieznacznie obniża żywotność komórek po 24 godz., natomiast po 72godz. toksyczne działanie tego biomateriału jest statystycznie istotne. Przeżywalność komórek po inkubacji z ceramiką korundową z PAW, zarówno po 24 h jak i po 72 h, była podwyższona i statystycznie istotna.

Wnioski

Wyniki badań wskazują że ceramika korundowa z PAW wpływała na zwiększoną proliferację komórek ludzkiej krwi, natomiast ceramika korundowa z HPMC działa toksyczne

dripped with carrier as vinyl poly(alcohol), PAW wit the brand name Poval-05 produced by Shin-Etsu. Such prepared materials were dried with lyophilization and next radioactive sterilised in standard conditions of medical materials.

Blood donors

Peripheral vein blood was taken from a group of healthy volunteers and obtained from Wrocław Regional Transfusion Center. The persons were 18-45 years old.

Leukocytes

Leukocytes were isolated from heparinized peripheral blood (10 U/ml) by gradient centrifugation in Gradisol G with a density of 1,115 g/ml (Aqua Medica, Poznań, Poland). Five ml of blood were layered on three ml of Gradisol and centrifuged for 30 min. at 400x g. The leukocytes from the interphase were collected, washed two times with RPMI supplemented with 2% c. s. and suspended in this medium at a density of 2×10^6 cells/ml

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of the compounds was determined in the human leukocytes. For cytotoxicity test, the human leukocytes were seeded in 24-well (Costar) 1 ml of 1×10^6 cells/ml in the culture medium RPMI with 2% calf serum, penicillin and streptomycin was deposited into each well. Samples of the tested biomaterials in amount 10mg of each were added to prepared cells, which were then incubated for 24h and 72h at 37°C in the atmosphere of 5% CO₂ in air.

The cytotoxicity of HPMC and PAW were detected by MTT assay

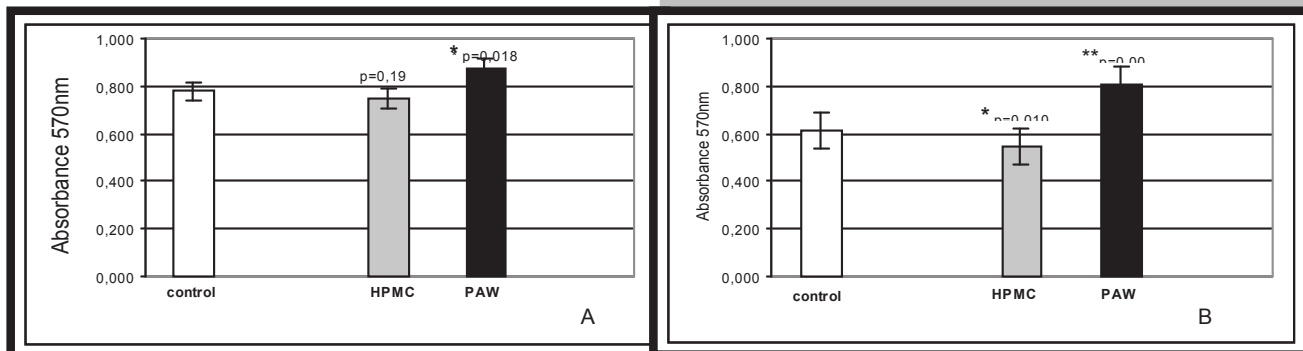
MTT[3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl) 2,5-diphenyltetrazoliumbromide] colorimetric analysis was used to measure the cytotoxicity of biomaterials. The test is based on mitochondrial dehydrogenase cell activity as an indicator of cell viability. MTT (Sigma, St. Louis, MO) was dissolved in PBS at concentration of 5 mg/ml. To measure cell killing, 25 µl solution was added to every well of the culture plates with biomaterials, and these were incubated for 2h at 37°C in the atmosphere of 5% CO₂ in air. A solvent solution (100 µl of 45 ml dimethylformamide, 13,5 g sodium dodecyl sulfat, and 55 ml distilled water) was added to every well and after 3h incubation at 37°C, the optical density at 570 nm was measured in a microplate reader (Start Fax Awareness Technology, Inc. 2100).

Results

Cytotoxicity of ceramics with PAW i HPMC were determined in human leukocytes. The results of our in vitro cytotoxicity assessment are shown in FIGURE 1 A and B. They shown that HPMC no statistically significant reduced the cells viability after 24h of incubation (FIG. 1A). The cytotoxicity effect of HPMC ceramic was dependent on time of interaction with human blood leukocytes and after 72h incubation was statistically significant (Fig. B). The cells viability after 24h nad 72h of incubation with PAW ceramic was enhanced and statistically significant (FIG. 1A, B).

Conclusions

The cytotoxicity effect HPMC was dependent on time of interaction with human blood leukocytes and after 72h incubation was statistically significant. The obtained results indicate that direct contact of the human peripheral blood leukocytes culture with ceramics with PAW did not show any cytotoxicity effect and enhance proliferation of cells. Test MTT is usfull for preliminary selection of biomaterial.



RYS. 1. Oznaczenie cytotoksyczności biomateriałów PAW i HPMC na ludzkich komórkach krwi obwodowej: A) po 24 godzinach, B) po 72 godzinach.

RYS. 1A. Wyniki badań przedstawiono jako \pm SD z 5 doświadczeń; * wskazuje statystycznie istotne różnice pomiędzy ceramiką z PAW i kontrolą ($p=0,018$).

RYS. 1B. Wyniki badań przedstawiono jako \pm SD z 5 doświadczeń; * wskazuje statystycznie istotne różnice pomiędzy ceramiką z HPMC i kontrolą ($p=0,010$); ** wskazuje statystycznie istotne różnice pomiędzy ceramiką z PAW i kontrolą ($p=0,006$).

FIG. 1. Cytotoxicity determined by MTT assay on human peripheral blood leukocytes after indicated of the biomaterials. A) after 24h, B) after 72 h.

FIG. 1A. The results present mean \pm SD of five separate experiments. * indicates statistically significant difference as compared to control with PAW ($p=0,018$).

FIG.1B. The results present mean \pm SD of five separate experiments:

* indicates statistically significant difference as compared to control with HPMC ($p=0,010$)

** indicates statistically significant difference as compared to control with PAW ($p=0,006$)

na komórki krwi. Efekt toksyczny pogłębiał się wraz z wydłużonym czasem oddziaływania tego biomateriału z leukocytami krwi obwodowej. Badanie cytotoksyczności na leukocytach ludzkich, z wykorzystaniem testu MTT, pozwala na wstępną selekcję nowych biomateriałów.

Podziękowanie

Praca wykonana została w projekcie badawczym nr 1064 w ramach badań własnych uczelni.

Piśmiennictwo References

- [1] Jaegermann Z., Karaś J., Michałowski S.: Struktury porowate materiałów ceramicznych na nośniki żywych komórek do stosowania w inżynierii tkankowej. *Inżynieria Biomateriałów*, (2003), 30-33, 12-14.
- [2] Pielka S., Szymonowicz M., Paluch D., Librant Z. Karaś J. Buczyńska H. K., Jegerman Z.: Ocena chropowatości powierzchni ceramiki korundowej na wybrane parametry krwi. (2004), 30-33, 59-62.
- [3] Pielka S., Czarny A., Żywicka B., Zaczyńska E., Solski L., Paluch D., Staniszevska-Kuś J.: Wpływ biomateriałów na syntezę cytokin prozapalnych w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej. (2003), 30-33, 66-69.
- [4] Berg K., Hansen M.B., Nelsen S.E.: A new sensitive bioassay for precise quantification of interferon activity as measured via the mitochondrial dehydrogenase function in cells (MTT-method). (1990), *APMIS* 98, 156-162.