

WPŁYW PENICYLINY I KWASU TANINOWEGO NA MORFOLOGIĘ OSIERDZIA WŁÓKNISTEGO

ARTUR TUREK¹, BEATA C WALINA², JERZY NOŻYŃSKI³,
ZOFIA DZIERŻEWICZ¹

¹ ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATEDRA BIOFARMACJI,
SOSNOWIEC, POLSKA

² POLITECHNIKA ŚLĄSKA,
KATEDRA BIOTECHNOLOGII ŚRODOWISKOWEJ,
GLIWICE, POLSKA

³ FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,
ZABRZE, POLSKA

Streszczenie

Oceniano właściwości morfologiczne osierdza włóknistego świni stabilizowanego za pomocą kwasu taninowego (TA) i/lub penicyliny (P). Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu optycznego. Wykazano, że oddziaływanie TA lub P nie powoduje istotnych zmian cech morfologicznych badanych tkanek. Udowodniono, że kolejność oddziaływania TA i P wpływa na efekt stabilizacji tkanek.

[Inżynieria Biomateriałów, 69-72, (2007), 82-84]

Wstęp

Ocena właściwości morfologicznych biomateriałów tkankowych należy do rutynowych badań wykonywanych podczas optymalizacji procesów stabilizacji tkanek. Podczas tych procesów może zachodzić wiele zmian morfologicznych. Pod wpływem czynników sieciujących może nastąpić zwiększenie integralności tkanki, utrata charakterystycznego pofałdowania włókien kolagenowych, utrata śródbłonna i mezotelium, a także degradacja komórek [1-3]. Sterylizacja tkanek za pomocą antybiotyków umożliwia zachowanie cech morfologicznych charakterystycznych dla tkanki natywnej [3-5]. Celem pracy była ocena wpływu kwasu taninowego (TA) i/lub penicyliny (P) na właściwości morfologiczne osierdza włóknistego świni domowej.

Materiały i metody

Próbki osierdza włóknistego świni domowej traktowano 2% roztworem TA w buforze PBS (pH 6,5) przez 4h i/lub roztworem P (0,05 mg/1 ml roztworu Hanks'a), w temp. 4°C, przez 24h. Tkanki poddano działaniu roztworu pankreatyny (PN) o stężeniu 1500mg/100ml 25mM Tris (pH 7,7), przez 3h, w temp. 37°C. Zmiany morfologii tkanek obserwowano z wykorzystaniem mikroskopu optycznego Polyvar 2 (Leica) przy powiększeniu 200x. Tkanki barwiono hematoksyliną i erytrozyną. Do dokumentacji preparatów stosowano system Quantimet 500 Plus.

Wyniki i dyskusja

Badania morfologii tkanki natywnej ujawniły zwartą strukturę istoty pozakomórkowej z drobnymi szczelinami (RYS.1). Po trawieniu jej za pomocą PN obserwowano obrzęk włókien łącznotkankowych i utratę jąder fibroblastów (RYS.2). Trawienie tkanki sieciowanej za pomocą TA nie powodowało degradacji fibroblastów (RYS.6), co wskazuje na silny efekt stabilizacji tkanki. Traktowanie tkanki roztworem

INFLUENCE OF PENICILLIN AND TANNIC ACID ON FIBROUS PERICARDIUM MORPHOLOGY

ARTUR TUREK¹, BEATA C WALINA², JERZY NOŻYŃSKI³,
ZOFIA DZIERŻEWICZ¹

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
SOSNOWIEC, POLAND

² SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY,
GLIWICE, POLAND;

³ FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY, ZABRZE,
POLAND

Abstract

Morphological properties of porcine fibrous pericardium stabilized by tannic acid (TA) and/or penicillin (P) were evaluated. Observations have been carried out using optical microscope. It was shown that interactions between TA and P do not result in significant changes in morphological features of examined tissues. It has been demonstrated that sequence of the tissue interaction with TA and P influences stabilization effect of the tissue-derived biomaterial.

[Engineering of Biomaterials, 69-72, (2007), 82-84]

Introduction

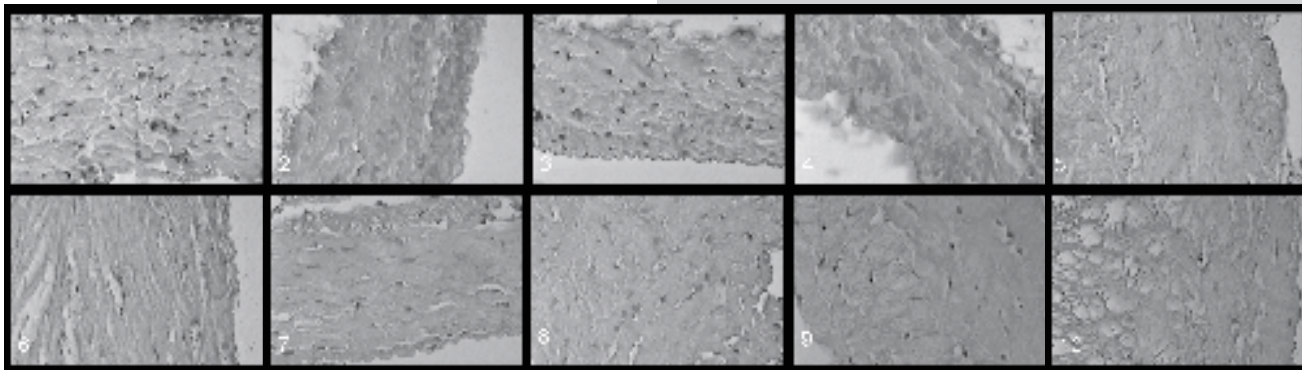
The evaluation of morphological properties of the tissue-derived biomaterials is a routine study carried out during optimization of the tissue stabilization processes. Numerous morphological changes may be a result of these processes. Under influence of cross-linking agents, increase in the tissue integrity, loss of characteristic collagen waving, as well as loss of the endothelium and the mesothelium may take place [1-3]. The tissues sterilization with the use of antibiotics makes possible preservation of morphological features characteristic for native tissue [3-5]. The aim of this study was to evaluate the influence of tannic acid (TA) and/or penicillin (P) on morphological properties of fibrous pericardium of domestic pig.

Materials and methods

Samples of porcine pericardium of domestic pig were treated with 2% solution of TA in PBS buffer (pH 6,5) during 4 h, and/or with the P-solution (0,05 mg/1 ml of Hanks solution) during 24h, at the temperature of 4°C. Tissues were digested with solution of pancreatin (PN) of concentration 1500mg/100ml of 25mM Tris buffer (pH 7,7), during 3h, at the temperature of 37°C. Changes in the tissue morphology were observed using the optical microscope Polyvar (Leica) under magnification 200x. Tissues were stained with hematoxylin and erythrosine. The preparation and documentation were performed using Quantimet 500 Plus System.

Results and discussion

Investigations of the native tissues morphology revealed tight structure of extracellular matrix with small slits (FIG.1). Swelling of connective fibers and a loss of fibroblast nucleus were observed after the PN-digestion (FIG.2). Enzymatic digestion of the TA-cross-linked tissues did not result in



P nie powodowało istotnych zmian jej morfologii (RYS.3). Nie obserwowano także różnic w oporności na trawienie PN między świeżą tkanką (RYS.2) i traktowaną P (RYS.4). Tkanka traktowana P zachowuje właściwości morfologiczne tkanki natywnej. P wraz z innymi antybiotykami (najczęściej ze streptomycyną) jest wykorzystywana w produkcji biomateriałów tkankowych [5]. Wprowadzenie antybiotyków do inżynierii biomateriałów było związane z dążeniem do uzyskania czystości mikrobiologicznej przy jednoczesnym zachowaniu żywotności komórek i funkcjonalności elementów macierzy pozakomórkowej [5]. Antybiotyki stosowane są na etapie transportowania, sterylizacji i przechowywania tkanek [5-7].

Aldehyd glutarowy (GA) jest czynnikiem sieciującym stosowanym powszechnie do stabilizacji tkanek zwierzęcych, w celu zwiększenia ich odporności na biodegradację [8]. Cytotoksyczność i kalcyfikacja tak przygotowanych biomateriałów spowodowały poszukiwanie innych metod, włączając zastosowanie TA [2]. Tkanka stabilizowana za pomocą TA (RYS.5) nie wykazywała istotnych zmian morfologicznych w porównaniu z materiałem natywnym (RYS.1), co pokazały również wyniki wcześniejszych badań [2,3]. Tkanka traktowana TA posiadała bardziej regularną strukturę, a włókna łącznotkankowe były mniej pośladowane (RYS.5).

Połączenie oddziaływania antybiotyków i czynników sieciujących w przetwarzaniu tkanek zwierzęcych stanowi nowe podejście do ich stabilizacji. W niniejszej pracy zaproponowano zastosowanie P podczas transportowania tkanek przed ich stabilizacją za pomocą TA, a także przechowywanie tkanek w roztworze P po ich stabilizacji. Uzyskane wyniki wykazały istotny wpływ kolejność oddziaływania TA i P na obraz histologiczny tkanek. Tkanka poddana działaniu TA i P wykazywała zwartą strukturę, z nielicznymi szczelinami istoty pozakomórkowej (RYS.7). Stabilność tak uzyskanej struktury potwierdza oporność tkanki na trawienie PN (RYS.8), natomiast w wyniku odwrotnej kolejności oddziaływania poszczególnych czynników z tkanką nastąpiło poszerzenie średnicy włókien tkankowych i rozmycie ich struktury (RYS.9). Tkanka ta również jest mniej oporna na trawienie PN (RYS.10), niż tkanki stabilizowane TA (RYS.6) oraz TA i P (RYS.8).

Wnioski

Badania histologiczne tkanek umożliwiły potwierdzenie efektu ich stabilizacji po sieciowaniu za pomocą kwasu taninowego (TA), ujawniając zachowanie cech morfologicznych tkanek. Udowodniono, że stabilizacja tkanek za pomocą TA, a także TA z udziałem penicyliny (P) powoduje zmniejszenie podatności tkanek na trawienie pankreatyną (PN). Podatność tkanek na trawienie enzymatyczne jest odwrotnie proporcjonalna do efektu stabilizacji tkanek, a obecność jąder fibroblastów w tkance poddanej trawieniu PN świadczy o stabilności jej struktury. P nie wpływa istotnie na morfologię badanych tkanek.

fibroblasts degradation (FIG.6), which may indicate strong effect of the tissue stabilization. The tissues treatment with P-solution did not result in significant changes in their morphology (FIG. 3). The differences in resistance to PN-digestion between fresh (FIG. 2) and P-treated tissues (FIG. 4) were also not observed. Penicillin-treated tissue maintains morphological features of native tissue. Penicillin with other antibiotics (mainly with streptomycin) are used in production of the tissue-derived biomaterials [5]. The antibiotics introduction to biomaterials-engineering was connected with pursuit of obtaining microbiological cleanness with simultaneous maintenance of cells vitality as well as functionality of extracellular matrix elements [5]. Antibiotics are used during transportation, sterilization and storage of the tissues [5-7].

Glutaraldehyde (GA) is cross-linking agent commonly used in animal tissues stabilization with the aim of increase their resistance to biodegradation [8]. Cytotoxicity and calcification of so prepared biomaterials made it necessary to search for other methods, including of TA usage [2]. TA-stabilized tissue (FIG.5) did not show significant morphological changes in comparison with native material (FIG.1), which results of previously studies had revealed [2,3]. The TA-stabilized tissue had more regular structure, and connective fibers were less waved (FIG.5).

The combination of antibiotics and cross-linking agents' interactions in processing animal tissue constitutes novel approach to their stabilization. In this work, the pericardium pretreatment with P during the tissues transportation before their further stabilization with TA, as well as the TA-stabilized tissues storage in P solution have been proposed. The obtained results revealed significant influence of a sequence of TA and P action on histology picture of tissues. TA- and P-treated tissues revealed tight structure with small slits of extracellular matrix. Stability of so obtained structure confirms the tissue resistance to PN-digestion (FIG.8). However, in case of each agent inverse sequence of interactions with tissue, widening diameter of connective fibers and structure blurring took place (FIG.9). This tissue was also less resistant to PN-digestion (FIG.10) as compared with the TA-stabilized tissue (FIG.6), as well as with the TA-P-stabilized tissue (FIG.8).

Conclusions

Studies of the pericardium tissues histology made it possible to confirm their stabilization after TA-cross-linking, as well as preservation of their morphological features. It was shown that both TA- and TA-P-stabilization of tissues result in decrease of their susceptibility to PN-digestion. The tissue susceptibility to enzymatic digestion is inversely proportional to the tissue's stabilization effect. The presence of fibroblast nuclei in PN-digested tissues confirms their structure stability. P does not influence morphology of examined tissues.

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny.

This work was financially supported by Medical University of Silesia.

Piśmiennictwo

- [1] Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res* 1999, 47: 439-65
- [2] 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
- [3] Turek A, Cwalina B, Pawlus-Łachecka L, Nożyński J. Effect of antibiotics on structure of porcine pericardium tissue. *Eng Biomat*, 2002, 23-25: 57-61
- [4] Barratt-Boyes BG, Roche AH. A review of aortic valve homografts over a six and one-half year period. *Ann Surg* 1969, 170: 483-92

References

- [5] Waterworth PM, Lockey E, Berry EM, Pearce HM. A critical investigation into the antibiotic sterilization of heart valve homografts. *Thorax* 1974, 29: 432-6
- [6] Gall K, Smith S, Willmette C, Wong M, O'Brien M. Allograft heart valve sterilisation: a six-year in-depth analysis of a twenty-five-year experience with low-dose antibiotics. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995, 110: 680-7
- [7] Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969, 58: 467-83
- [8] Khor E. Methods for treatment of collagenous tissues for bio-prostheses. *Biomaterials* 1997, 18: 95-105

WPŁYW KWASU TANINOWEGO I PENICYLINY NA STABILNOŚĆ BIAŁEK OSIERDZIA

ARTUR TUREK¹, BEATA C WALINA², LUCYNA PAWLUS-ŁACHECKA³, ZOFIA DZIERŻEWICZ¹

¹ ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
KATEDRA BIOFARMACJI,
SOSNOWIEC, POLSKA

² POLITECHNIKA ŚLĄSKA,
KATEDRA BIOTECHNOLOGII ŚRODOWISKOWEJ, GLIWICE, POLSKA

³ FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, ZABRZE, POLSKA

Streszczenie

Badano wpływ kwasu taninowego (TA) i/lub penicyliny (P) na efekt stabilizacji tkanek. W badaniach wykorzystano elektroforezę SDS-PAGE. Wykazano, że oddziaływanie TA lub P powoduje istotne zmiany profili elektroforetycznych białek uwalnianych z tkanek – w porównaniu z tkanką nie poddaną stabilizacji.

[*Inżynieria Biomateriałów, 69-72, (2007), 84-86*]

Wstęp

Biomateriały tkankowe stosowane w chirurgii odtwórczo-naprawczej są poddawane stabilizacji w celu zachowania natywnych lub uzyskania nowych właściwości wszczepów. W pierwszym przypadku tkanki są poddawane działaniu antybiotyków, a następnie krioprezerwacji [1], natomiast określone właściwości strukturalne tkanek są uzyskiwane w wyniku ich modyfikacji, głównie w procesach sieciowania [2,3]. W niniejszej pracy badano efekty zastosowania kwasu taninowego (TA) i penicyliny (P) w celu stabilizacji struktury osierdza.

INFLUENCE OF TANNIC ACID AND PENICILLIN ON PERICARDIUM PROTEINS STABILITY

ARTUR TUREK¹, BEATA C WALINA², LUCYNA PAWLUS-ŁACHECKA³, ZOFIA DZIERŻEWICZ¹

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, SOSNOWIEC, POLAND

² SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY,
GLIWICE, POLAND;

³ FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY,
ZABRZE, POLAND

Abstract

The influence of tannic acid (TA) and/or penicillin (P) on pericardium tissues stabilization effects have been examined. The SDS-PAGE electrophoresis was employed in the studies. It was shown that interactions of TA or P result in changes of electrophoretic profiles of proteins extracted from tissues as compared with non-stabilized tissue.

[*Engineering of Biomaterials, 69-72, (2007), 84-86*]

Introduction

Tissue-derived biomaterials used in surgery are stabilized to maintain native properties or to obtain new properties of implants. In the first case, tissues are treated with antibiotics, and next cryopreserved [1]. However, the definite structural properties of tissues are achieved by modification, mainly by cross-linking processes [2,3]. In this work, usage of tannic acid (TA) and penicillin (P) with the aim of the pericardium structure stabilization has been examined.