

2. Powierzchnia płytek tworzywa siarkowego SK wydłuża proces krzepnięcia krwi.
3. Tworzywo siarkowe SW ( siarka, krzemionka, węgiel-sadza ), przy dłuższym kontakcie z krwią, wykazuje działanie toksyczne na składniki krwi.
4. Tworzywo siarkowe SW, wydłuża proces krzepnięcia krwi.

## Podziękowanie

Praca finansowana w ramach grantu KBN Nr 7 TO8D 016 18.

żalności na parametry układu krzepnięcia i fibrylizacji. Polim. w Med., 32,1-2, 41-64.

[7] PN-EN ISO 10993-12:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12 : Przygotowanie próbek i materiałów odniesienia.

[8] PN-EN ISO 10993-1:2001 Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Ocena i badania.

[9] PN-EN ISO 30993-4:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych - część 4 Wybór badań interakcji z krwią.

[10] Szymonowicz M., Łowkis B: In vitro testing method of polymers candidate destined for contact with blood. Polimery w Medycynie 1990, 20, 1-4, 43- 54.

[11] Bomski H: Podstawowe badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 1995.

[12] Dąbrowski Z.: Fiziologia krwi. Wybrane zagadnienia cz. 1. 2. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1998.

[13] Krzemińska - Ławkowiczowa I Maj S.: Atlas hematologii klinicznej. WL PZWL Warszawa 1993.

## WPŁYW BIOMATERIAŁÓW NA SYNTEZĘ CYTOKIN PROZAPALNYCH W LEUKOCYTACH LUDZKIEJ KRWI OBWODOWEJ

STANISŁAW PIELKA\*, ANNA CZARNY\*\*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA\*,  
EWA ZACZYŃSKA\*\*, LESZEK SOLSKI\*, DANUTA PALUCH\*,  
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ\*

\*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW  
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

\*\* INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ PAN WE  
WROCŁAWIU

### Wprowadzenie

Materiały biomedyczne o wysokim stopniu biogodności, i produkty ich biodegradacji, nie powinny wywierać wpływu na układ immunologiczny organizmu, bowiem pobudzenie układu immunologicznego może nasilać procesy zapalne, a także wyzwolić reakcje alergiczne. Są to zjawiska niekorzystne zarówno w przypadku krótkotrwałego kontaktu biomateriału z tkankami, ale przede wszystkim dla długotrwałego utrzymania wszczepu w organizmie. Dotychczas nie w pełni poznanym zjawiskiem jest wpływ biomateriałów na produkcję i uwalnianie mediatorów zapalenia, takich jak: czynnika martwicy guza (TNF- $\alpha$ ) najwcześniej występującego w ognisku zapalnym, a także interferonów (IFN) aktywujących makrofagi i fagocytozę. Obecność cytokin prozapalnych powoduje wzrost poziomu NO, który w małych ilościach pełni funkcje ochronną, natomiast w wysokim stężeniu wywiera działanie cytotoksyczne na komórki. Prześledzenie stymulacji tych mediatorów (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NO) może udzielić odpowiedzi o potencjalnej wczesnej i późnej reakcji tkankowej na nowe biomateriały i okazać się czułym testem do praktycznej selekcji materiałów.

## THE INFLUENCE OF THE BIOMATERIALS FOR THE PROINFLAMMATORY CYTOKINES SYNTHESIS IN HUMAN LEUKOCYTES FROM PERIPHERAL BLOOD

STANISŁAW PIELKA\*, ANNA CZARNY\*\*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA\*,  
EWA ZACZYŃSKA\*\*, LESZEK SOLSKI\*, DANUTA PALUCH\*,  
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ\*

\*MEDICAL ACADEMY IN WROCLAW, INSTITUTE OF EXPERIMENTAL  
SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, WROCLAW, POLAND,

\*\*INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, POLISH  
ACADEMY OF SCIENCES, WROCLAW, POLAND

### Introduction

Medical materials of the high level biocompatibility and products of their biodegradation should not have any influence on the immunological system of organism, because such stimulation may cause the increase of inflammatory reactions as well as to provoke the allergic reactions. Such reaction are unfavourable in both cases, for short-time contact biomaterials but specially for all implanted materials, which stayed for long time in the body. As for today we do not know too much about the influence of biomaterials on the production and releasing of inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), which are present in inflammatory site during the early stage, and such as interferons which activates macrophags and phagocytosis. The presence of pro-inflammatory cytokines caused the increase of nitric oxide, which itself in small quantities has the protective function, but in higher concentrations has the cytotoxic effect on the cells. The monitoring of the stimulation of these mediators could give us the answer about the potential, early and late tissue reaction for the new biomaterials and it could prove to be the sensitive test for practical selection of materials.

Badano dwie grupy biomateriałów, przeznaczonych:

- do czasowego kontaktu z tkankami - silikonowe cewniki pęcherzowe i dreny
- do stałego kontaktu z tkankami - poliestrowe dzianiny (hydrofilową- I i hydrofobową- II), hydroksyapatytowe implanty dokostne (HAP i HAP/TCP)

Do doświadczeń użyto próbek o jednakowej wadze.

### Ciągłe linie komórkowe

Do badań użyto linii komórkowych oznaczonych L929 i A549

- L929-linia komórkowa otrzymana z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy C3H, fibroblastopodobna (ATCC CCL 1).

Hodowlę komórek L929 prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a (MEM) z dodatkiem 10% inaktywowanej (30min., 56°C) surowicy cielęcej (CS), 100 j/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM L-glutaminy. Komórki przeszczepiano co 48 godz.

- A549 - linia komórkowa ludzka raka płuc, nabłonkowa (ATCC CCL)

Hodowlę pasażowano w w płynie hodowlanym Dulbecco (DMEM) wzbogaconym L-glutaminą (2mM) i surowicą (2% lub 10%) inaktywowaną w temp 56°C przez 30 min oraz 100µg/ml streptomycyny.

### Wirus

Namnażanie i oznaczanie aktywności Encephalomyocarditis virus (EMCV) szczepu Col MM (Picornaviridae) prowadzono na linii komórkowej L929.

### Metoda izolacji leukocytów z ludzkiej krwi obwodowej i indukcja cytokin

Krew pobierano na heparynę w stosunku 1:10, leukocyty izolowano przez wirowanie w gradiencie gęstości z użyciem Gradisolu Aqua-Medica (1ml krwi na 0,6 gradisolu). Płukano dwukrotnie w medium hodowlanym RPMI1640 z dodatkami. Na płytkę 24 dołkową firmy Costar nanoszono po 1 ml zawiesiny leukocytów o gęstości  $1 \cdot 10^6$  / ml. Do tak przygotowanych komórek dodawano jałowe próbki badanych biomateriałów o wadze 10 mg, następnie inkubowano w temp. 37°C w wilgotnej atmosferze z 5% CO<sub>2</sub>. Supernatant z nad komórek i biomateriałów zbierano po 24 godzinach inkubacji i zamrażano w -70°C do czasu oznaczeń. W supernatantach nad komórek i biomateriałów oznaczano poziom cytokin i NO.

### Metoda oznaczania IFN

Poziom interferonu oznaczano mikrometryczną metodą zahamowania efektu cytopatycznego (CPE) wirusa EMC w komórkach hodowli A549. Miareczkowanie interferonu wykonywano na 96 dołkowych płaskodennych płytkach plastikowych. Na płytce zakładano hodowlę A549 o gęstości  $2 \cdot 10^5$ /ml i inkubowano 24h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Na dodatkowej płytce przygotowano odpowiednie rozcieńczenia badanego materiału w DMEM z dodatkami. Następnie płyn z nad hodowli A549 usuwano i nanoszono przygotowane rozcieńczenia badanego materiału.

Po 24h inkubacji (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) hodowlę zakażano EMCV o mianie 102 TCID<sub>50</sub>/ml. Zawiesinę wirusa przygotowano w płynie hodowlanym DMEM z 2% surowicy cielęcej. Na płytce pozostawiono kontrolę wirusa (EMCV) w hodowli, kontrolę referencyjnego interferonu i nie zakażoną kontrolę hodowli komórek A549. Po 24h inkubacji odczytywano efekt cytopatyczny w mikroskopie odwróconym. W przypadku obecności interferonu w materiałach, obserwowano ochronę komórek przed cytopatycznym działaniem wirusa. Rozcieńczenie interferonu, przy którym obserwowano ochronę przed efektem cytopatycznym w 50% komórek, przyjmowano za 1j. IFN. Wyniki odnoszono do miana standardowego IFN-γ (Pharmigen,USA).

There were two groups of biomaterials tested:

- short-time contact: silicone drains and catheters;
- long-time (permanent) contact: polyester knittings (hydrophobic I and hydrophilic II), hydroxyapatite bone implants (HAP and HAP/TCP).

For the assessment the samples of the same weight were used.

### The continuous cell culture lines

In experiments we used of lung adenocarcinoma A549 cell line ATCC CCL 185 and L 929 fibroblastic mouse cells CCL 1. The cells A549 were grown in Dulbecco, Minimum Essential Medium (DMEM) (Gibco), L929 cell line in Eagle culture medium (Gibco), supplemented with 10% calf serum (Gibco), 2mM L-glutamine (Sigma), streptomycin and penicillin (100 µg/ml) (Polfa), and incubated at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. after 48 hours, cells were harvested using trypsin-EDTA (Sigma), and washed two times in Dulbecco or Eagle medium.

### Viruses

The multiplication of viruses Encephalomyocarditis virus (EMCV) of the strain Col MM (Picornaviridae) and assessment of their activity were conducted on L929 cell culture line.

### The human leukocytes sampling and cytokines induction.

The leukocytes used for the assessment were extracted from the peripheral blood of healthy volunteers, which was collected for heparin after centrifugation at the density gradient of Gradisol Aqua-Medica (1ml of blood for 0,6 ml of gradisol). For the purpose of this assessment, a leukocyte suspension in the RPMI medium with 2% fetal calf of serum, 100 v/ml of penicillin, 100 mg/ml of streptomycin.

On a plate with 24 wells (Costar Ltd.) 1 ml of the leukocyte suspension of  $1 \times 10^6$  cells/ml in the culture liquid RPMI with 2% calf serum was deposited into each well. Samples of the tested biomaterials in amount of 10 mg of each were added to prepared cells, which were then incubated for 24h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and then were frozen at -70°C until the time of tests. The activities of TNF-α, IFN-γ, and nitric oxide were assessed in the supernatants.

### IFN activity

The interferon level was assessed by the micro-method of inhibition of the cytopathological effect (CPE) of EMC virus in the A549 cell culture of human lung adenocarcinoma.

The interferon titration was conducted on plastic 96-well plates. An A549 cell culture of the  $2 \times 10^5$  /ml density was established on each plate and incubated for 24h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The proper dilutions of the tested materials in the Dulbecco medium with 10% calf fetal of serum were prepared on the additional plate. The supernatant from above cell cultures was removed and prepared dilutions were deposited. After 24h of incubation (at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>) the culture was infected with the titre 102 TCID<sub>50</sub>/ml of EMCV virus. The virus suspension was prepared in the liquid culture medium DMEM with 2% calf fetal serum. The control EMCV virus in the culture, the control-referenced interferon and non-infected A549 cell culture were left on the plate. The cytopathological effect was observed in the reverse microscope after 48h incubation. The presence of interferon resulted in the protection of the cells against cytopathological effects of the virus. The dilution of the interferon, which protected 50% of the cells, was adopted as one unit of IFNs. All results were corrected to the standard titre of IFN-s.

## Metoda oznaczania aktywności czynnika martwicy nowotworów

Miano TNF- $\alpha$  oznaczano metodą biologiczną na plastikowych płytkach 96 dołkowych. Na płytce zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości  $4 \cdot 10^5$ /ml i inkubowano 24h ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Na osobnej płytce przygotowano odpowiednie rozcieńczenia badanego materiału w MEM z 10% surowicą cielęcą i aktynomycyną D (2,5mg/ml). Następnie płyn z nad hodowli L929 usuwano i nanoszono przygotowane rozcieńczenia. Po 24h inkubacji ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), obserwowano degenerację komórek wywołaną przez TNF- $\alpha$ . Jednocześnie pozostawiono kontrolę hodowli komórek L929 (bez aktynomycyny), z aktynomycyną i kontrolę standardowego rHu TNF- $\alpha$ . Rozcieńczenie TNF- $\alpha$  wywołujące efekt toksyczny w 50% komórek, odpowiada 1 jednostce aktywności TNF- $\alpha$ . Wyniki odnoszono do miana standardowego rHu TNF- $\alpha$  (Pharmigen, USA).

### Oznaczanie poziomu tlenu azotu

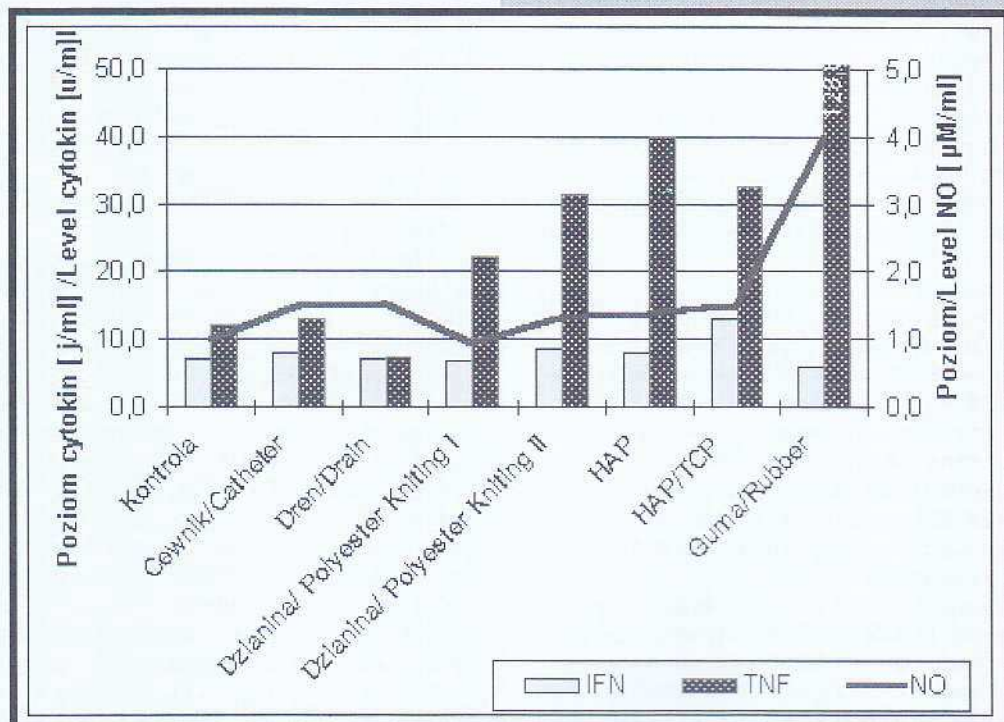
Stężenie  $\text{NO}_2$  w nadsączach z nad hodowli leukocytów mierzono wykorzystując metodę kolorymetryczną wg. Dinga i współr. (1988). Na plastikową płytkę 96 dołkową (Nunc) nanoszono badane supernatanty w ilości 100ml/dołek dodawano po 100ml odczynnika Griessa (0,1% dichlorowodorek naftylenodiaminy w  $\text{H}_2\text{O}$  i 1% sulfanilamidu w 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  w stosunku 1:1). Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 12min. Po tym czasie oznaczano absorbancję na czytniku Stat Fax 2100 (Awarenes, Technology inc) przy długości 540 nm. Stężenie  $\text{NO}_2$  obliczano korzystając z krzywej standardowej  $\text{NaNO}_2$ .

### TNF- $\alpha$ level

The level of TNF- $\alpha$  was determined by biological method on 96-well plates on which the L929 cell cultures of mouse fibroblasts were established with the density  $2 \cdot 10^5$  /ml and incubated for 24h ( $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ ). The proper dilutions of the supernatant from above leukocyte cultures in the Eagle medium containing 10% calf fetal of serum and actinomycine D (Sigma) (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were prepared on a separate plate. Then the liquid from above the L929 cultures was removed and the proper previously prepared dilutions were deposited on these cultures. The degeneration of the cells caused by TNF was observed in the inverted microscope after 24h and 72h incubation (at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ ). In parallel L929 cultures in the Eagle medium a without actinomycine, with the actinomycine and the standard control of rHu TNF- $\alpha$  were also established for comparison.

### Nitric oxide level

The concentration of nitric oxide ( $\text{NO}_2$ ) was measured in the supernatant from above leukocyte cultures using the colorimeter method according to Ding et all. 100  $\mu\text{l}$  of Griess reagent (i.e. 0,1% dihydrochloride naphthylenediamine in  $\text{H}_2\text{O}$  and 1% sulfanilamide in 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in the ratio 1:1) was added to 100  $\mu\text{l}$  of the tested material for one well. Then the plate was incubated at room temperature for only 12 minutes and optical density was measured in the Stat Fax 2100 counter (Awareness Technology Inc.) at the wavelength of 540 nm. The concentration of  $\text{NO}_2$  was calculated in relation to the standard curve of  $\text{NaNO}_2$  prepared within concentrations from 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  to 100  $\mu\text{M}/\text{ml}$ .



RYS. 1. Poziom cytokin prozapalnych TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i tlenu azotu w nadsączach hodowli leukocytów krwi ludzkiej po stymulacji próbkami biomateriałów.

FIG. 1. The cytokines levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and nitric oxide in the supernatant of human peripheral blood after stimulation by the samples of different biomaterials.

## Wyniki Omówienie

Badane silikonowe dreny i cewniki nie stymulowały leukocytów ludzkich do zwiększonej syntezy TNF i IFN oraz wzrostu poziomu tlenków azotu, a otrzymane wyniki były porównywalne ze spontaniczną produkcją tych czynników przez komórki nie traktowane biomateriałami (RYS. 1).

Biomateriały przeznaczone do bezpośredniego kontaktu z krwią (poliestrowe dzianiny) i na wszczepy kostne (hydroksyapatyt, hydroksyapatyt-TCP), wywoływały umiarkowaną indukcję badanych mediatorów reakcji zapalnej (RYS. 1). Produkcja TNF- $\alpha$ , najważniejszego i charakterystycznego czynnika reakcji zapalnej, przez leukocyty stymulowane próbkami gumy technicznej stanowiła kontrolę pozytywną (TNF-128j/ml).

## Wnioski

1. Badane biomateriały przeznaczone:

– do czasowego kontaktu z tkankami - silikonowe dreny i cewniki nie powodują wzrostu syntezy cytokin TNF, INF i tlenków azotu w leukocytach ludzkich.

– do stałego kontaktu (wszczepy)- poliestrowe dzianiny i hydroksyapatytowe materiały dokostne charakteryzują się umiarkowanymi właściwościami immunomodulacyjnymi.

2. Prześledzenie stymulacji mediatorów zapalenia TNF, IFN, NO może udzielić odpowiedzi o potencjalnej wczesnej i późnej reakcji tkankowej na nowe biomateriały.

## Podziękowanie

Praca wykonana została w projekcie badawczym nr 552 w ramach badań własnych Uczelni.

## Piśmiennictwo

[1] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Induction of Tumor Necrosis Factor and Interleukin6 by Outer Membrane Proteins of Shigella in Spleen Cells and Macrophages of Mice. Arch. Immun. et Therapiae Exper. 1993, 41, 153-157.

[2] Żywicka B., Paluch D., Staniszevska -Kuś J., Sołski L., Szymonowicz M., Biocompatibility evaluation of high strength aramid fibres. Inżynieria Biomateriałów 1998, 1, 3, 12-16.

[3] Misterka S., Paluch D., Staniszevska -Kuś J., Żywicka B., Pობiedzińska J.; Zmiany w poziomie interleukiny -1B i interleukiny-6 po implantacji wybranych materiałów medycznych. Doniesienie wstępne. Polim. Med. 1998, T XXVIII, No 1-2, 15-24.

## Results Discussion

The tested silicone drains and catheters did not stimulate human leukocytes for higher synthesis of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  neither to the increase of nitric oxide level. The obtained results were all comparable with the spontaneous production of these factors by the control cells not treated with the tested biomaterials (FIG. 1).

Biomaterials intended to use in direct contact with blood (e.g. polyester knittings) or as bone implants (hydroksyapatite, hydroksyapatite-TCP), caused the moderate induction of the tested pro-inflammatory mediators (FIG. 1). Production of TNF- $\alpha$ , the most important and characteristic of all the inflammatory reaction factors, by the human leukocytes stimulated by the samples of technical rubber served as the positive control (TNF-128u/ml).

## Conclusions

1. The tested biomaterials intended to use:

– short-time contact with tissues (silicone drain and catheters) do not cause the increase of the synthesis of cytokines TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and nitric oxide (NO) in human leukocytes.

– long-time (permanent) contact (implants) - such as polyester knittings and hydroxyapatite bone implants are characterized by moderate immuno-modulative properties.

2. The monitoring of the stimulation of these mediators could give us the answer about the potential, early and late tissue reaction for the new biomaterials.

## Acknowledgement

The work has been done as the part of Medical Academy grant no 552.

## References

[4] Zaczynska E., Pielka S., Staniszevska -Kuś J., Czarny A., Żywicka B., Dawidowicz A.: Influence of hydroxyapatite implants (HAP/TCP and HAP) on TNF level in rat's blood and local soft response. XI Polish Society for Immunology Congress, Olsztyn, Poland, 18-21 September 2002. Centr. Europ. J. of Immunol. Vol 27, suplement. 1

[5] Czajkowska B., Otfinowski J., Ptak M., Pawelec A., Lekki J.: Different Reactions of macrophages cultured with the samples of new and polyethylene cups of the hip prosthesis. Inżynieria Biomateriałów 2000, 11, 8-10.

[6] Zaczynska E., Pielka S., Staniszevska -Kuś J., Czarny A., Żywicka B., Paluch D., Dawidowicz A.: Badania porównawcze indukcji TNF- $\alpha$  in vitro i miejscowej reakcji tkanek po implantacji HAP i HAP/TCP, Polim. Med. 2003, T. XXXIII, No.1-2.