

Beata Drzewiecka

Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Joanna Wessely-Szponder, profesor uczelni

OCENA AKTYWNOŚCI NEUTROFILI STYMULOWANYCH BIOMATERIAŁEM CERAMICZNYM W WARUNKACH IN VITRO

Streszczenie

Hydroksyapatyt (HA) jako materiał biozgodny i bioaktywny znajduje szereg zastosowań w różnych dziedzinach chirurgii i ortopedii. Zwiększa zdolność wgajania implantu, jednakże jego wadą jest tendencja do defragmentacji i uwalniania drobnych cząstek, które mogą aktywować leukocyty, szczególnie neutrofile we wczesnym etapie rozwoju reakcji zapalnej. Taka reakcja może spowodować poważne zaburzenia i przyczynić się nawet do odrzucenia implantu. Celem pracy jest ocena aktywności neutrofilii izolowanych z krwi świń stymulowanych in vitro dwoma rodzajami hydroksyapatytu: komercyjny Hydroksyapatyt i komercyjny Hydroksyapatyt + β – TCP.

Z krwi świń pobranej podczas uboju do probówek z 3,8% roztworu cytrynianu sodu jako antykoagulantu, wyizolowano neutrofile i przygotowano ekstrakt peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Powyższy ekstrakt poporcjowano, zliofilizowano i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszych oznaczeń. Z kolejnej porcji świeżej krwi przygotowano zawiesinę neutrofilii (czystość 95%). Równocześnie przygotowano biomateriały (Biomateriał 1 – Hydroksyapatyt (HA) firmy Biocer; Biomateriał 2 – Hydroksyapatyt + β -fosforan trójwapniowy (HA + β -TCP)). Próbkę po 20mg biomateriałów nałożono w 2 powtórzeniach na płytkę 24 dołkową i zalano 500 μl buforu PBS, pozostawiono na 2h do napęcznienia. Po tym czasie odciągnięto nadmiar PBS, który nie uległ wchłonięciu. Do każdego z 12 dołków nałożono po 40 μg ekstraktu. Dokładny sposób rozmieszczenia próbek przedstawia rys. Nr 1. Płytkę umieszczono w inkubatorze CO₂ na 4h. Po tym czasie oceniono aktywność wolnorodnikową neutrofilii na podstawie wytwarzania tlenu azotu, oznaczoną z użyciem reakcji Griessa i wytwarzania anionorodnika ponadtlennego reakcją Confera. Odczyt powtórzono po 20 godzinach.

W otrzymanych wynikach zaobserwowano, że stężenie azotynów w podłożu było większe w przypadku próby HA + β -TCP + N niż w próbce zawierającej sam HA + N, a dodatek ekstraktu neutrofilowego nie zmienił znacząco otrzymanych wyników.

Również wytwarzanie anionorodnika ponadtlennego było większe po stymulacji HA+ β -TCP niż czystym HA.

Można zatem wywnioskować, że zwiększona aktywność neutrofilii zaobserwowana w hodowlach stymulowanych HA + β -TCP wynika z stymulujących właściwości TCP jako dodatku do HA.

Wstęp

Od wielu lat biomateriały są wykorzystywane do wzmacniania funkcji organizmu i/lub zastępowania uszkodzonych tkanek i celu wspomagania procesu gojenia. W szczególności biomateriały odegrały zasadniczą rolę w transformacji medycyny w ciągu ostatnich kilku dekad (Ratner, Bryant, 2004). Historycznie istnieją trzy różne generacje biomateriałów, które można oznaczyć jako „bioinertne”, „biokompatybilne” i „bioaktywne”, w zależności od stopnia ich interakcji z organizmem. Termin „inteligentne biomateriały” został po raz pierwszy użyty w 2004 r. (Anderson i in., 2004) dla opisu materiałów „odpowiadających na określone sygnały komórkowe”. Jednak wykładniczy wzrost w ostatnich dziesięcioleciach liczby nowych biomateriałów o sprytnych, precyzyjnych i wysoce kontrolowanych funkcjach biologicznych gwarantuje przededefiniowanie i wyjaśnienie tego terminu. Termin „inteligentny” odnosi się do określonego momentu w czasie. Biomateriały, które są obecnie uważane za „inteligentne”, mogą zostać uznane za „głupie” za 40 lat. Można bezpiecznie założyć, że dzisiejsze „inteligentne biomateriały” zostaną „przechytrzone” przez przyszłe innowacje. Lepszą klasyfikacją inteligentnych biomateriałów będzie ich podział według stopnia (lub poziomu) interakcji z otoczeniem i wynikających z tego reakcji biologicznych. Klasyfikacja ta uwzględnia również ewolucję pojęcia „inteligentność” bez cementowania definicji tego, czym jest inteligentny biomateriał (Montoya i in., 2021).

Nowe materiały naśladujące naturalne właściwości kości, odpowiadające właściwościom funkcjonalnym, mechanicznym i biologicznym, są stale opracowywane w celu naprawy ubytków kości. Pożądane jest, aby „inżynieria tkankowa” była multidyscyplinarną podstawą, która wykorzystuje zasady nauk przyrodniczych i inżynierii do wytwarzania biologicznych zamienników, które przywracają lub zastępują funkcję tkanki lub całego narządu. Niemniej jednak, stosowanie przeszczepów kostnych ma liczne ograniczenia, w tym główne zagrożenia infekcją w miejscach, w których usuwa się przeszczepy kostne dawcy, prawdopodobieństwo odrzucenia immunologicznego lub transportu bakterii z miejsca pobrania (w przypadku przeszczepu allogenicznego) oraz niewystarczająca dostępność dawców przeszczepów kostnych, którzy mogą sprostać obecnym wymaganiom. Ponieważ prawidłowy wzrost materiałów syntetycznych do implantacji kości sprzyja odbudowie tkanki kostnej, zapewnia to mocne wsparcie strukturalne bez ingerencji w tkankę biologiczną. Aby wymusić w organizmie takie zachowania stosuje się biodegradowalne matryce, które zapewniają tymczasowe rusztowania, w miejscach w których można zregenerować tkankę kostną. Zazwyczaj do tego celu służą termoplastyczne poliestry alifatyczne. Ogromne znaczenie dla rozwoju tej dziedziny polega na wzroście *in vitro* komórek na porowatych matrycach (rusztowaniach) w celu wygenerowania trójwymiarowych (3D) tkanek, które można zakorzenić w miejscu uszkodzenia tkanki/kości (Lett i in., 2021).

Materiały bioceramiczne charakteryzują się dobrą biokompatybilnością – nie wywołują reakcji toksycznych, alergicznych, mutagennych, rakotwórczych. Wśród tej grupy materiałów szerokie zastosowanie znalazły ortofosforany wapnia (CaPO_4). Głównymi przedstawicielami ceramiki fosforanowej wapnia są hydroksyapatyt (HA) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ oraz β -fosforan trójwapniowy (β -TCP) – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Podobieństwo ich budowy chemicznej do kości oraz unikalne właściwości m.in. bioaktywność, biodegradowalność, właściwości osteoindukcyjne wpłynęły na ich szerokie zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako substytuty kości. Główną zaletą HA jest taki sam skład chemiczny i fazowy jak dla tkanki kostnej, natomiast dla β -TCP – wysokie właściwości resorpcyjne. Najważniejszym jest fakt, że oba biomateriały poddawane są wpływowi środowiska biologicznego organizmu człowieka. Po implantacji reakcja organizmu na obcy materiał jest zjawiskiem naturalnym. Przejawia się to występowaniem wielu złożonych reakcji na styku biomateriał/środowisko biologiczne. Zrozumienie właściwości fizykochemicznych i właściwości powierzchni niektórych biomateriałów jest przedmiotem intensywnych badań. Materiały te oddziałują z różnymi mediami, dzięki czemu reagują jako odpowiedni i selektywny sorbent dla wielu cząstek i jonów nieorganicznych lub organicznych (Adamska, Voelkel, 2022).

Biomateriały ceramiczne wapniowo-fosforanowe znajdują szerokie zastosowania w ortopedii i chirurgii szczękowo-twarzowej do regeneracji ubytków kostnych. Jednym z najważniejszych materiałów na implanty jest naturalny lub syntetyczny hydroksyapatyt (HAP). Należy zauważyć, że HAP może być opcjonalnie stosowany w postaci wysoce porowatej lub niskoporowatej. Ceramiczny HAP o wysokiej porowatości (o dużej powierzchni właściwej) wykazuje znaczną zdolność do tworzenia apatytów dzięki wymianie jonów wapnia i fosforanów między materiałem a płynami tkankowymi. Jednak wysoki wychwytywanie Ca^{2+} przez HAP z pożywek do hodowli komórkowych powoduje niższą żywotność osteoblastów, co można uznać za „fałszywą” cytotoksyczność. Chociaż spiekanie HAP w wysokich temperaturach (powyżej $1000\text{ }^\circ\text{C}$) skutkuje niższą reaktywnością jonową i niższym działaniem cytotoksycznym na komórki kostne, to również znacząco obniża porowatość granulki ceramicznych. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie fluoroapatytu (FAP), który zamiast grup hydroksylowych zawiera jony fluorokowe (Borkowski i in., 2020). Doniesiono, że podstawienie fluorokowe w ceramice apatytu jest odpowiedzialne za słabszą rozpuszczalność i reaktywność jonową (Mansoorianfar i in., 2020). Badania fizykochemiczne FAP w porównaniu z próbkami HAP wskazują na wzrost gęstości wraz ze wzrostem jonów fluorokowych. Dlatego odpowiednia kombinacja zawartości fluoru, sposobu jego wprowadzania do ceramiki oraz warunków spiekania może skutkować syntezą ceramiki o optymalnej porowatości, zdolności do adsorpcji jonów, bioaktywności i cytokompatybilności (Borkowski i in., 2020).

Neutrofile stanowią 50–70% krążących leukocytów i są coraz częściej rozpoznawane jako populacja niejednorodna, odgrywająca kluczową rolę w regulacji immunologicznej i patogenezie chorób. Kompleksowa charakterystyka neutrofilii i subpopulacji neutrofilii jest utrudniona przez ich wrodzoną niestabilność *ex vivo*, ich tendencję do tworzenia multipletów z innymi typami komórek oraz wysoki poziom niespecyficznego barwienia tła, prawdopodobnie z powodu ekspozycji białek kationowych podczas aktywacji (Pillay i in., 2012).

Wiadomo, że neutrofile ulegają szybkiej aktywacji za pomocą wielu powszechnych metod przygotowania, w tym sedymentacji krwinek czerwonych (RBC), lizy RBC i wirowania w gradiencie gęstości. Ostatnio opisano kilka subpopulacji neutrofilii w stanach homeostatycznych i patologicznych na podstawie właściwości fenotypowych, transkrypcyjnych i funkcjonalnych. Subpopulacje o niskiej częstotliwości są zazwyczaj identyfikowane na podstawie poziomów określonych białek powierzchniowych, które mogą zostać zmienione przez aktywację podczas przygotowania, co utrudnia ich dokładne scharakteryzowanie. Obecnie stosowane metody charakteryzacji granulocytów obojętnochłonnych często opierają się na kombinacji wirowania w gradiencie gęstości i usuwania RBC przez sedymentację i/lub lizę. Poszczególne badania wykorzystują określone metody przygotowania, rodzaj antykoagulantu do pobierania krwi oraz ramy czasowe przetwarzania próbki, co skutkuje raportami o różnym poziomie aktywacji i zmianach fenotypu. Stanowi to istotną przeszkodę w dokładnej charakterystyce fenotypu neutrofilii i komplikuje porównanie wyników między badaniami, hamując postęp w tej dziedzinie (Connelly i in., 2022).

W badaniach klinicznych pobieranie krwi często odbywa się w miejscach oddalonych od miejsca analizy, co powoduje, że nie da się uniknąć opóźnień w przetwarzaniu próbek. Jest to szczególnie problematyczne w przypadku neutrofilii, ponieważ nie można ich kriokonserwować do opóźnionej analizy i muszą być przetwarzane na świeżo. W kilku badaniach zbadano zdolność funkcjonalną neutrofilii po 24-72 godzinach inkubacji, stwierdzając, że z czasem neutrofile mają zmniejszoną zdolność do fagocytozy, zabijania bakterii, chemotaksji, przypadkowych ruchów i wybuchu oksydacyjnego. Jednak zmiany fenotypowe, które występują z powodu opóźnionego przetwarzania, nie zostały jeszcze opisane. Inne kluczowe zmienne różniące się między badaniami neutrofilii obejmują temperaturę barwienia i rodzaj antykoagulantu stosowanego do pobierania krwi, które, jak wykazano, wpływają na regenerację neutrofilii i odpowiedź na stymulację. Aktualna wiedza na temat wpływu tych czynników na fenotyp neutrofilii jest ograniczona (Connelly i in., 2022).

Hydroksyapatyt (HA) jest szeroko stosowany w chirurgii ortopedycznej ze względu na jego biokompatybilność i bioaktywność. Służy do

pokrywania metalowych części protez w celu poprawy ich biokompatybilności oraz jako substytut kości w chorobach kości. HA zwiększa integrację implantu; jednak jedną z wad powłok HA jest ich tendencja do fragmentacji i generowania cząstek HA, które powodują zużycie szczątków, które aktywują leukocyty (Prystowsky i in., 1995).

Badanie powierzchni styku tkanka/biomateriał wykazało, że we wczesnym stadium dochodzi do rekrutacji komórek zapalnych, w tym neutrofilii wielojądrowych (PMN), a następnie komórek monocytowych. Wykazano, że podczas przewlekłego procesu zapalnego cząstki HA mogą wywoływać wytwarzanie i uwalnianie mediatorów zapalnych, takich jak proteazy i ich inhibitory, chemokiny i cytokiny. Jednak niewiele wiadomo na temat ostrego procesu zapalnego i wpływu pozostałości HA na PMN i ich odpowiedź in vitro i/lub in vivo (Velard i in., 2009).

Szereg badań donosi, że komórki osteoblastyczne mogą uwalniać czynniki chemotaktyczne, takie jak białko chemoatraktant monocytów (MCP-1) i interleukina-8 (IL-8) in vitro lub in vivo podczas chorób zapalnych w kontakcie z cząsteczkami. Takie czynniki chemotaktyczne mogą rekrutować komórki zapalne do miejsca implantacji. Oddziaływanie PMN z cząstkami drobnoustrojów lub materiałów powoduje aktywację komórek. PMN to komórki odpornościowe, których podstawową funkcją jest ochrona gospodarza przed atakującymi patogenami i obcymi materiałami. Jednak niekontrolowana reakcja fizjologiczna może stać się patogenna, prowadząc do uszkodzenia tkanki (Potera i in., 2016). Aktywacja PMN przez cząstki biomateriału może potencjalnie „zainicjować” efekt późniejszej aktywacji i nasilić proces zapalny. Regulacja mediatorów zapalenia może modulować odpowiedź immunologiczną i zwiększać żywotność protezy oraz jej zgodność z tkanką gospodarza. Celem tego badania jest zbadanie roli cząstek hydroksyapatytu w rekrutacji i aktywacji PMN (Velard i in., 2009).

Cel pracy

Celem pracy jest ocena aktywności neutrofilii izolowanych z krwi świń, po stymulacji in vitro dwoma rodzajami hydroksyapatytu: komercyjny Hydroksyapatyt i komercyjny Hydroksyapatyt + β – TCP.

Metodyka i materiały

Przygotowano 3,8% roztworu cytrynianu sodu, w celu zapobiegania krzepnięcia krwi. Wymieszano cytrynian z krwią w stosunku 1:9, 20ml cytrynianu: 180ml krwi. Przygotowano 0,83% roztwór chlorku amonu, do lizy komórek krwi. Zmieszano krew zawierającą cytrynian z roztworem chlorku amonu w stosunku 1:3, czyli 200ml roztworu krwi + cytrynian i 600ml chlorku amonu. Liza komórek następowała po 10min a roztwór zmieniał

wtedy barwę na malinową. Rozlano mieszaninę do 16 probówek typu falcon, po 50ml do każdej. Wirowanie w warunkach: 3000 rpm, 15min, 4°C. Zlano supernatant. Przygotowano roztwór buforu PBS, do płukania pelletu po wirowaniu.

Na 1l buforu PBS zmieszano 8g NaCl; 0,2g KCl; 0,1g MgCl₂ + 6H₂O; 1,14g Na₂HPO₄; 0,2g KH₂PO₄ i dopełniono wodą destylowaną do objętości 1l. Wirowanie i płukanie pelletu powtórzono dwukrotnie. Przy ostatnim płukaniu zredukowano objętość mieszaniny do zwirowania do 1 probówki. Po ostatnim wirowaniu pellet zhomogenizowano w lodowatej wodzie przez 15min. Homogenat rozlano do eppendorffów po 1,5ml objętości zawiesiny. Zwirowano w warunkach: 27 000g, 40min, 4°C. Zlano supernatant a pellet rozpuszczono w 10% kwasie octowym. Tak otrzymaną zawiesinę postawiono na noc na mieszadło w temperaturze 4°C.

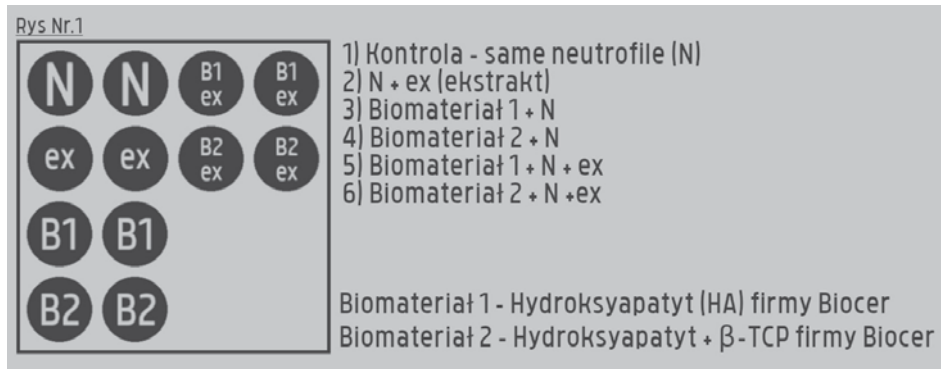
Na kolejny dzień rozpipetowano mieszaninę do eppendorffów po 1,5ml i zwirowano w warunkach: 27000g, 20min, 4°C. Po wirowaniu pobrano z probówek supernatant. Wykonano pomiar spektrofotometryczny przy dł. fali 280nm. Obliczono ilość neutrofilii w mieszaninie. Rozdzielono je po 500μg na probówkę i zliofilizowano.

Przygotowano biomateriały (Biomateriał 1 – Hydroksyapatyt (HA) Biocer; Biomateriał 2 – Hydroksyapatyt + β-fosforan trójwapniowy (HA + β-TCP)) (Chema Elektromet Spółdzielnia Pracy). Próbki po 20mg biomateriałów nałożono w 2 powtórzeniach na płytkę 24 dołkową i zalano 500μl buforu PBS, pozostawiono na 2h do napęcznienia. Po tym czasie odciągnięto nadmiar PBS, który nie uległ wchłonięciu.

Do każdego z 12 dołków nałożono po 40μl roztworu ekstraktu neutrofilowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, powstałego z rozpuszczenia jednej porcji liofilizatu w 1250μl PBS. Dokładny sposób rozmieszczenia próbek przedstawia Rys. nr 1. Następnie płytkę umieszczono w inkubatorze CO₂ na 4h.

Do przygotowania odczynnika Griessa użyto roztworu kwasu sulfanilowego i α-naftyloaminy w stosunku masowym 10:1, rozpuszczonych w 2,5% H₃PO₄, natomiast do wykonania odczynnika do reakcji Confera wykorzystano 1mg błękitu tetrazoliowego (NBT) rozpuszczony w 1ml buforu PBS.

W reakcji Griessa użyto 50μl hodowli i 50μl Griessa, inkubowano 10min po czym odczytano wynik spektrofotometrycznie przy dł. fali 545nm. Do reakcji Confera użyto 50μl hodowli i 50μl 0,1% roztworu NBT, inkubowano 10min i odczytano wynik również spektrofotometrycznie przy dł. fali 545nm.

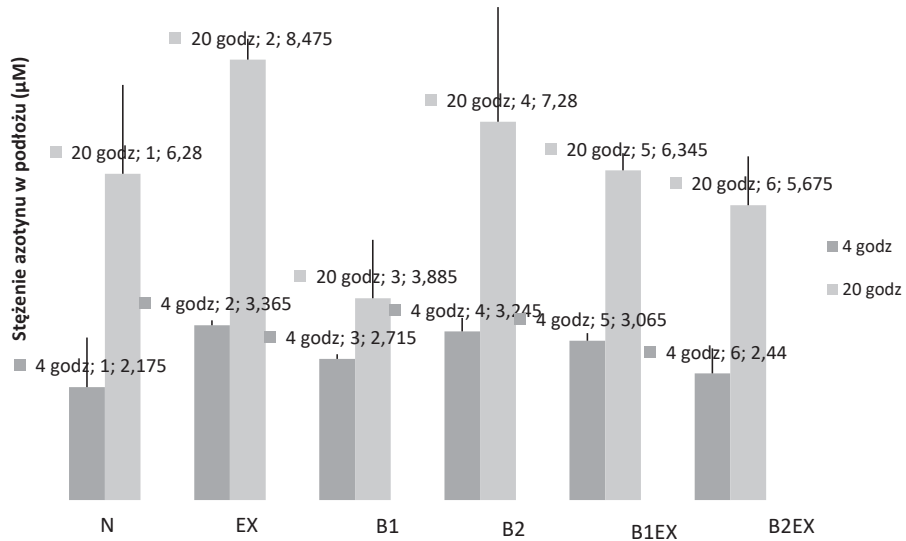


Rysunek 1. Rozmieszczenie próbek na płytce

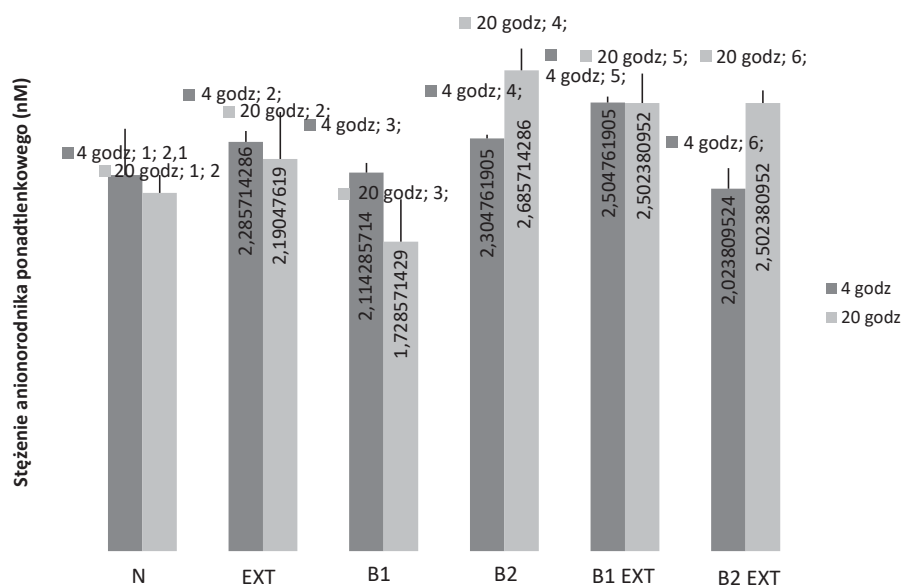
Źródło: Opracowanie własne.

Wyniki

Tabela 1. Stężenie azotynu w podłożu



Źródło: Opracowanie własne.

Tabela 2. Stężenie anionorodnika ponadtlenkowego

Źródło: Opracowanie własne.

Na podstawie załączonych wykresów można zaobserwować, że stężenie azotynów w podłożu było większe w przypadku próby HA + β -TCP + N niż w próbce zawierającej sam HA + N, a dodatek ekstraktu neutrofilowego nie zmienił znacząco otrzymanych wyników.

Również wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego było większe po stymulacji HA+ β -TCP niż czystym HA.

Wnioski

Zwiększona aktywność neutrofilii zaobserwowana w hodowlach stymulowanych HA + β -TCP wynika z stymulujących właściwości TCP jako dodatku do HA.

Piśmiennictwo:

1. Adamska, K., & Voelkel, A. (2022). Chromatographic examination of the influence of environment on selected properties of ceramic biomaterials. *Surfaces and Interfaces*, 29, 101777. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.101777>
2. Anderson, D. G., Burdick, J. A., & Langer, R. (2004). Materials science. Smart biomaterials. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5692), 1923–1924. <https://doi.org/10.1126/science.1099987>
3. Anita Lett, J., Sagadevan, S., Fatimah, I., Hoque, M. E., Lokanathan, Y., Léonard, E., Alshahateet, S. F., Schirhagl, R., & Oh, W. C. (2021). Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications. *European Polymer Journal*, 148, 110360. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110360>

4. Borkowski, L., Przekora, A., Belcarz, A., Palka, K., Jozefaciuk, G., Lübek, T., Jójczuk, M., Nogalski, A., & Ginalska, G. (2020). Fluorapatite ceramics for bone tissue regeneration: Synthesis, characterization and assessment of biomedical potential. *Materials Science and Engineering: C*, *116*, 111211. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111211>
5. Connelly, A. N., Huijbregts, R. P. H., Pal, H. C., Kuznetsova, V., Davis, M. D., Ong, K. L., Fay, C. X., Greene, M. E., Overton, E. T., & Hel, Z. (2022). Optimization of methods for the accurate characterization of whole blood neutrophils. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07455-2>
6. Mansoorianfar, M., Mansourianfar, M., Fathi, M., Bonakdar, S., Ebrahimi, M., Zahrani, E. M., Hojjati-Najafabadi, A., & Li, D. (2020). Surface modification of orthopedic implants by optimized fluorine-substituted hydroxyapatite coating: Enhancing corrosion behavior and cell function. *Ceramics International*, *46*(2), 2139–2146. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.197>
7. Montoya, C., Du, Y., Gianforcaro, A. L., Orrego, S., Yang, M., & Lelkes, P. I. (2021). On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone Research*, *9*(1), 12. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-00131-z>
8. Pillay, J., Kamp, V. M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J. W., Ulfman, L. H., Leenen, L. P., Pickkers, P., & Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(1), 327–336. <https://doi.org/10.1172/JCI57990>
9. Potera, R. M., Jensen, M. J., Hilkin, B. M., South, G. K., Hook, J. S., Gross, E. A., & Moreland, J. G. (2016). Neutrophil azurophilic granule exocytosis is primed by TNF- α and partially regulated by NADPH oxidase. *Innate Immunity*, *22*(8), 635–646. <https://doi.org/10.1177/1753425916668980>
10. Prystowsky, J. B., Huprikar, J. S., Rademaker, A. W., & Rege, R. v. (1995). Human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis of crystalline cholesterol, bilirubin, and calcium hydroxyapatite in vitro. *Digestive Diseases and Sciences*, *40*(2), 412–418. <https://doi.org/10.1007/BF02065430>
11. Ratner, B. D., & Bryant, S. J. (2004). Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *6*, 41–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>
12. Velard, F., Laurent-Maquin, D., Guillaume, C., Bouthors, S., Jallot, E., Nedelec, J. M., Belaaouaj, A., & Laquerriere, P. (2009). Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta Biomaterialia*, *5*(5), 1708–1715. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.008>