

Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, indukcja cytokin prozapalnych *in vitro* oraz badania biogodności ceramiki węglanowej *in vivo*

BOGUSŁAWA ŻYWICKA*, ANNA CZARNY **, EWA ZACZYŃSKA**,
JOANNA KARAŚ***

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów AM we Wrocławiu

** Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

*** Instytut Szkła i Ceramiki w Warszawie

Streszczenie

W odpowiedzi na zapotrzebowanie na resorbowalne materiały do zastosowania w chirurgii kostnej, przygotowano ceramikę opartą na węglanie wapnia. Surowcem dla tworzyw był węglan wapnia w postaci krystalicznego aragonitu lub kalcytu z różną zawartością fluorku litu. Badano trzy rodzaje preparatów CC-1FA - z krystalicznego aragonitu (99% CaCO_3 i 1% LiF), CC-5FA - z krystalicznego aragonitu (95% CaCO_3 i 5% LiF) i CC-1FK - materiał z krystalicznego kalcytu (99% CaCO_3 i 1% LiF). W celu określenia biogodności i prozapalnego oddziaływania materiałów kalcytowych, określona została aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i indukcja cytokin prozapalnych TNF- α , IL-6, IL-8 w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej (PBL) *in vitro*, oraz miejscowa reakcja tkanki mięśniowej po implantacji u szczurów.

W reakcji zapalnej wywoływanej przez biomateriały biorą udział cytokiny prozapalne, których ekspresja kontrolowana jest przez regulatorowe czynniki transkrypcyjne, do których należy NF- κ B (nuclear factor κ B). W niepobudzonej komórce NF- κ B znajduje się w cytosolu w nieaktywnej formie, która pod wpływem kinaz może ulec aktywacji. Wówczas odblokowane białko NF- κ B ulega przemieszczeniu z cytosolu do jądra komórkowego i tam wiążąc się ze specyficzną sekwencją DNA inicjuje transkrypcję. Dzięki szybkiej regulacji odpowiedzi immunologicznej zapewnia on komórkom przetrwanie niekorzystnych oddziaływań. Reguluje ekspresję wielu genów, głównie związanych z przebiegiem procesu zapalnego (niektórych cytokin, białek ostrej fazy, kolgenazy, stromilozyny i innych enzymów rozkładających składniki macierzy) oraz z proliferacją i różnicowaniem komórek. Jednak jego nadmierna aktywność może prowadzić do działań niepożądanych np. niekontrolowanego podziału komórek i powstawania komórek olbrzymich typu ciała około obcego.

Ekspresja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, oznaczona została w leukocytach ludzkich (PBL) po stymulacji kalcytowymi materiałami dokostnymi z wykorzystaniem metody immunocytochemicznej. Aktywację NF- κ B wyrażono jako procentowy udział komórek NF- κ B(+) pozytywnych. Poziom cytokin w nadsączach hodowli leukocytów krwi ludzkiej po stymulacji materiałami kalcytowymi, oznaczony został po 24 i 72 godzinach testem immunoenzymatycznym ELISA. Miejscowa reakcja tkankowa oceniana była 1 i 3 miesiące po wszczepieniu próbek ceramiki węglanowej w mięśnie grzbietu szczurów.

Uzyskane dane wykazały, że testowane materiały nie stymulowały leukocytów ludzkiej krwi obwodowej do produkcji IL-6 i IL-8 zarówno po 24 jak i 72 godzinnej inkubacji. Wszystkie testowane materiały indukowały wytwarzanie podwyższonego poziomu TNF- α przez leukocyty, zarówno po 24 i 72 godzinach w porównaniu do ilości wytwarzanych przez komórki niestymulowane. Różnice te były znamienne statystycznie ($p < 0.05$). Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B po 24 godzinach była wyższa po stymulacji

materiałami CC-5FA, CC-1FA niż CC-1FK, natomiast statystycznie znamieną była tylko po stymulacji tworzywem CC-5FA ($p < 0.05$). Po 72 godzinach ekspresja NF- κ B obniżała się i była porównywalna z kontrolą. W badaniach *in vivo* w pierwszym miesiącu po wszczepieniu, zaobserwowano tworzenie się ceramiki węglanowej torebki łącznotkankowej z widocznymi makrofagami. Ponadto w 3 miesiącu w zbitej tkance łącznej obecne były ogniska szkliwienia i kostnienia. Reakcja tkanek miękkich charakteryzowała się nieswoistą reakcją zapalną związaną z resorpcją badanych materiałów; najbardziej nasiloną po implantacji CC-5FA, następnie CC-1FA i najmniej po CC-1FK.

Podsumowując materiał CC-5FA w badaniach *in vivo* wywoływał najbardziej nasilony odczyn tkanki mięśniowej do 3 miesiąca po wszczepieniu, W badaniach *in vitro* - aktywował NF- κ B w leukocytach krwi po 24 godzinach oraz indukował produkcję TNF- α po 24 i 72 godzinnej stymulacji. Uzyskane dane wskazują, że materiały z ceramiki węglanowej mogą aktywować transkrypcyjny czynnik NF- κ B w PBL. Badania wpływu *in vitro* biomateriałów na syntezę cytokin prozapalnych, aktywację NF- κ B *in vitro* oraz odczynu tkankowego *in vivo* pozwalają na zróżnicowanie stopnia biozgodności badanych biomateriałów.

Słowa kluczowe: czynnik transkrypcyjny NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-8, odczyn tkankowy, leukocyty ludzkiej krwi obwodowej

Activation of nuclear factor kappa-B (NF- κ B), induction of proinflammatory cytokines *in vitro* and evaluation of biocompatibility of the carbonate ceramic *in vivo*

Summary

Ceramic materials based on calcium carbonate have been prepared in response for the demand for resorbable materials for use in bone surgery. Calcium carbonate in the form of crystalline aragonite or calcite with various amount of lithium fluoride was the raw material. Material CC-1FA from crystalline aragonite (99% CaCO_3 and 1% LiF), CC-5FA - from crystalline aragonite (95% CaCO_3 and 5% LiF) and CC-1FK - material from crystalline calcite (99% CaCO_3 and 1% LiF) was studied. To evaluate their biocompatibility and inflammatory effect we investigated the activity of nuclear factor kappaB (NF- κ B) and proinflammatory cytokine concentrations: tumor necrosis factor TNF- α , interleukins IL-6 and IL-8 in peripheral human leukocytes (PBL) after stimulation *in vitro* with tested calcite materials. Evaluation of local soft tissue reaction after implantation was also the aim of our study.

Proinflammatory cytokines take part in inflammatory reaction caused by biomaterials. Expression of these proteins is controlled by proinflammatory regulatory transcription factors including the commonly appearing NF- κ B (Nuclear Factor κ B). In a quiescent cell NF- κ B resides in the cytosol in an inactive form which its activated under the influence of kinases. The activated NF- κ B protein translocates from cytosol to nucleus of cell and binding to specific DNA sequence it initiates transcriptions. Thanks to the quick regulation of immunological response it ensures the survival of cells in unfavorable reactions of environmental factors. It regulates the expression of many genes mainly connected with the course of the inflammatory process (of some cytokines, proteins of acute phase, collagenesis,

stromilozine other enzymes decomposing the elements of matrix) and with proliferation and differentiating of cells. However its excessive activity can lead to unfavorable reactions, for example uncontrollable division of cells, appearance of giant cells of foreign body type. In our study protein expression of NF- κ B in PBL were assessed using anti-c-Rel- antibody (PBL expressing c-Rel in the nucleus = labelled NF- κ B (+) cells. The NF- κ B activation in PBL was expressed as: the percentage of NF- κ B(+)cells. The level of cytokines: IL-6, IL-8 and TNF- α level in the supernatants from leukocytes culture with tested materials was determined by an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) after 24 and 72 hours incubation. The local tissue reaction in vivo was evaluated 1 and 3 months after implantation calcite devices into dorsal muscles of rats.

The achieved results showed that the tested calcite material incubated 24 and 72 hours with PBL culture didn't synthesized higher amounts of the cytokines IL-6 and IL-8 in comparison with the untreated cells. All tested materials after 24 and 72 hours stimulated PBL culture to produce a significant level of TNF- α ($p < 0.05$) (higher level after CC-5FA and CC-1FA materials and lower after CC-1FK). Activation of transcription factor nuclear factor NF- κ B in leukocytes after 24 hours incubation with CC-5FA, CC-1FA was higher than CC-1FK but significantly was only after CC-5FA stimulating. The expression of NF- κ B after 72 hours of incubation decreased and was on the level comparable with control group.

Histological observation 1 month after implantation showed that the carbonate ceramic devices were surrounded with connective tissue capsule with presence of macrophages. Additionally after 3 month in the dense connective tissue cartilaginous and calcification focus was visible. Soft tissue reaction showed chronic inflammatory reaction connected with resorbtion of biomaterials, the most increased after implantation of CC-5FA, than CC-1FA and CC-1FK CONCLUSION: Transcription nuclear factor NF- κ B was activated after in vitro stimulation in short time by the tested calcite material CC-5FA. This activity was correlated with induction in vitro of

TNF- α in short and long time. The most increased soft tissue reaction 1 and 3 month after implantation of CC-5FA material was found. Our study showed that calcite materials can activate NF- κ B and demonstrated differences in biocompatibility of tested materials.

Key words: nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), TNF- α , IL-6, IL-8, local tissue reaction, human peripheral blood leukocytes

WPROWADZENIE

W chirurgii kostnej ciągle istnieje zapotrzebowanie na kościotwórcze tworzywa resorbowalne, zwiększające miejscowo podaż wapnia [1]. W odpowiedzi na to rosnące zapotrzebowanie przygotowano syntetyczną ceramikę, opartą na węglanie wapnia w postaci krystalicznego aragonitu lub kalcytu z dodatkiem fluorku litu. Wstępne badania toksyczności *in vitro* wykazały zalety nowo wytworzonych materiałów. Nieznana jest jednak reakcja tkanek żywego organizmu na nowe preparaty kalcytowe oraz szersze ich oddziaływanie. Materiały implantacyjne wszczepione śródtkankowo przejmując określone funkcje w organizmie żywym, nie powinny wykazywać niekorzystnego wpływu na układ immunologiczny i w jak najmniejszym stopniu zakłócać jego homeostazę [1-2]. Jednakże biomateriały wszczepione w tkanki żywego organizmu podlegają podstawowym prawom patofizjologii ciał obcych, wywołując procesy zapalne o różnym stopniu nasilenia [3-10]. Prowadzić mogą one w efekcie do opóźnionych aseptycznych reakcji zapalnych, odspojenia na granicy faz: implant-tkanka organizmu i odrzucenia implantu [11].

Miejscem szczególnej wagi w procesie wgajania się wszczepów jest granica faz implant–tkanka biorcy. Odczyn tkankowy wokół wszczepów może charakteryzować reakcją

zapalną z udziałem komórek linii monocytarno-makrofagowej, neutrofilów, eozynofii, bazofii, komórek tucznych i powstałych w wyniku ostatecznych przekształceń jednojądrzastych komórek żernych (monocytów i makrofagów) w wielojądrzaste komórki olbrzymie, a w kościach ich odpowiedników osteoklastów [2, 12].

Uwalniane cząsteczki biomateriałów lub związki, chemiczne szczególnie z grupy tworzyw resorbowalnych, mogą indukować liczne mediatory zapalenia [13 -19]. Jednak nie ma zgodnych danych, które z nich odgrywają kluczową rolę w toczących się procesach zapalnych.

Wykazano, że w reakcji zapalnej wywoływanej przez biomateriały biorą udział cytokiny prozapalne. W otaczających implant tkankach obserwowany jest wzrost poziomu IL-1, IL-6, TNF- α [4,7,10,11]. TNF- α jest jednym z głównych mediatorów w procesie zapalnym, nie oddziałuje on jednak pojedynczo, a efekty jego współoddziaływania z mediatorami zapalnymi innych klas są przedmiotem licznych badań. Ważnymi mediatorami zapalenia są IL-8 i IL-6. IL-8 jest drobnocząsteczkową cytokiną z grupy chemokin odpowiedzialną za zapalny naciek neutrofilów, jest także czynnikiem chemotaktycznym dla aktywowanych eozynofii [2, 20]. IL-6 charakteryzuje się wielostronnością oddziaływań i uznawana jest za jeden z głównych czynników, regulujących mechanizmy obronne o znaczącym udziale w reakcjach zapalnych i krwiotworzeniu[2].

Ekspresja tych białek kontrolowana jest przez prozapalne regulatorowe czynniki transkrypcyjne, do których należy NF- κ B (nuclear factor κ B) [2, 21-26]. Dzięki szybkiej regulacji odpowiedzi immunologicznej, zapewnia on przetrwanie komórkom niekorzystnych oddziaływań czynników środowiskowych. Reguluje ekspresję wielu genów głównie związanych z przebiegiem procesu zapalnego (niektórych cytokin, białek ostrej fazy, kolgenazy, stromilozyny i innych enzymów rozkładających składniki macierzy), oraz z proliferacją i różnicowaniem komórek. Jednak jego nadmierna aktywność może prowadzić do

działań niepożądanych np. nie kontrolowanego podziału komórek, powstawania komórek olbrzymich typu ciała około obcego. Aktywacja NF- κ B została wykazana w stanach zapalnych w różnych jednostkach chorobowych [27, 28]. Nieaktywny czynnik transkrypcyjny NF- κ B znajduje się w cytoplazmie w nieczynnym kompleksie z inhibitorem I κ B. Fosforylacja I κ B przez odpowiednią kinazę białkową powoduje rozpad tego kompleksu i uwalnianie aktywnego NF- κ B, który ulega translokacji do jądra komórkowego i aktywuje ekspresję specyficznych genów [2]. Do białek kodowanych przez geny, których ekspresja jest zależna od NF- κ B należą cytokiny prozapalne IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, RANTES. Cytokiny, które są stymulowane przez NF- κ B mogą bezpośrednio zwrotnie aktywować szlak NF- κ B, co w efekcie może prowadzić do chronicznych stanów zapalnych.

Oznaczenie aktywności NF- κ B jako kluczowego modulatora odpowiedzi immunologicznej i zapalnej, umożliwiłoby wczesną skuteczniejszą ocenę biogodności materiałów implantacyjnych na poziomie molekularnym. Prześledzenie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B wraz z określeniem poziomu cytokin TNF- α , IL-8, IL-6 w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej *in vitro* oraz oceną miejscowej reakcji tkankowej, pozwoli na skuteczną selekcję nowo wytworzonej ceramiki węglanowej przed jej zastosowaniem klinicznym.

Celem badań było określenie aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, poziomu cytokin TNF- α i IL-8, IL-6 po stymulacji leukocytów ludzkiej krwi obwodowej nowymi dokostnymi materiałami kalcytowymi *in vitro* oraz ocena odczynu tkankowego po implantacji.

MATERIAŁ

Badano trzy rodzaje tworzyw opartych na węglanie wapnia o symbolach:

1. CC-1FA – materiał składający się z 99%mas. węglanu wapnia (CaCO_3)
i 1%mas. fluorku litu (LiF).
2. CC-5FA- tworzywo zbudowane z 95%mas. węglanu wapnia (CaCO_3)
i 5%mas. fluorku litu (LiF).

Surowcem w tych tworzywach był węglan wapnia w postaci krystalicznego aragonitu.

3. CC-1FK - tworzywo składające się z 99%mas. węglanu wapnia (CaCO_3)
i 1%mas. fluorku litu (LiF).

Surowcem w tym materiale był węglan wapnia w postaci krystalicznego kalcytu.

Z przygotowanych tworzyw po obróbce termicznej sporządzono implanty w kształcie cylindrów o średnicy 3mm i wysokości 7mm, które do dalszych badań biologicznych poddano sterylizacji radiacyjnej.

METODY

Badania *in vitro* obejmowały ocenę poziomu cytokin $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-8 w nadsączach z nadhodowli leukocytów ludzkiej krwi obwodowej, stymulowanej badanymi preparatami oraz określenie aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej.

Izolacja leukocytów z ludzkiej krwi obwodowej i indukcja NF-kappaB

Krew pobierano na heparynę w stosunku 1:10, leukocyty izolowano przez wirowanie w gradiencie gęstości z użyciem Gradisolu Agua-Medica (1ml krwi na 0,6 gradisolu). Płukano dwukrotnie w medium hodowlanym RPMI1640 z dodatkami. Na płytkę 24 dołkową firmy Costar nanoszono po 1ml zawiesiny leukocytów o gęstości 1×10^6 /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_2 . Supernatant z nad komórek i biomateriałów zbierano po 24 i 72 godzinach inkubacji i zamrażano w -70°C do czasu oznaczeń. W supernatantach z nad komórek i biomateriałów określano poziom cytokin TNF- α , IL-6 i IL-8. W leukocytach oznaczano ekspresję czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB.

Oznaczanie poziomu cytokin TNF- α , IL-6 i IL-8

Poziom cytokin w nadsączach hodowli leukocytów krwi ludzkiej po stymulacji materiałami kalcytowymi, oznaczony został testem immunoenzymatycznym ELISA (Pharmingen). 96-dołkową płytkę firmy Nunc Maxisorp opłaszczano monoklonalnymi przeciwciałami (anty IL), skierowanymi przeciwko poszczególnym cytokinom w stężeniu $2 \mu\text{l/ml}$ po $100 \mu\text{l}$ na dołek i inkubowano przez 24h w 4°C . Następnie płukano 3-krotnie po $200 \mu\text{l}$ roztworem PBS/Tween (11 PBS + 0,5 ml Tween 20) i dodawano PBS wzbogacony w 10% surowicę cielęcą płodową (FCS). Płytkę indukowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej i płukano 3-krotnie PBS/Tween., po czym nanoszono po $100 \mu\text{l}$ badanych materiałów do każdego dołka i dla kontroli różne rozcieńczenia standardowej rHu IL.

Płytkę inkubowano przez 2 godziny i płukano 5-krotnie PBS/Tween, po czym nanoszono biotynylowane przeciwciała anty IL po $100 \mu\text{l}$ badanych do każdego dołka i inkubowano 1 godzinę w

temperaturze pokojowej. Po tym czasie płukano 7-krotnie PBS/Tween i наносono po 100 µl do dołka substratu (tetrametylobenzydyna i H₂O₂ w stosunku 1/1). Zmianę barwy substratu na kolor niebieski obserwowano po 30 minutowej inkubacji w ciemni. Reakcje zatrzymywano dodając do dołków po 50 µl 1M H₂PO₃ - następowała zmiana barwy na żółtą. Pomiar absorbancji wykonywano po 30 minutach na czytniku (Multiscan RCv 150) do testów ELISA przy długości fali λ= 450 nm. Wartości absorbancji w badanych materiałach odnoszono do stężenia standardowej rHu IL. Poziom cytokin w badanych materiałach oznaczano przy wykorzystaniu programu LABSYSTEMS GENESIS V. 3.05.

Ocena aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB

Badania obejmowały ocenę ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB w leukocytach ludzkich po stymulacji kalcytowymi materiałami dokostnymi i wykonane zostały z wykorzystaniem metody immunocytochemicznej. Leukocyty ludzkiej krwi obwodowej umieszczone zostały na mikroskopowych szkiełkach przy zastosowaniu cytowirówki (wirowanie 5 minut / 500 rpm), a następnie utrwalane w 4% formaldehydzie. Po płukaniu H₂O destylowaną, blokowano aktywność endogennej peroksydazy przez inkubację w 3% roztworze H₂O₂ w metanolu przez 5 min., następnie płukano w 10 mM buforze fosforanowo-sodowym pH-7,5, 0,9% (PBS). Cytospinowe preparaty blokowano surowicą (Novostain Super ABC Kit (universal), Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK przez 20min, w temperaturze pokojowej, a następnie preparaty były inkubowane przez 60 minut w komorze wilgotnej z poliklonalnym króliczym przeciwciałem IgG przeciw NF-kB (c-Rel subunit) (Chemicon International, Inc. Temecula, CA) w rozcieńczeniu 1:100.

Jako kontrolę negatywną zastosowano surowicę króliczą (Normal Rabbit Serum, Novocastra Laboratories Ltd.). Po płukaniu w PBS preparaty inkubowano z biotynylowanym drugim przeciwciałem skierowanym przeciw króliczemu IgG (1:50 rozcieńczenie; Novostain Super ABC Kit -universal, Novocastra) w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po płukaniu

w PBS nałożono Substrat-chromogen (3,3'-diaminobenzidyna) na 2-10 min. (Liquid DAB Substrate Kit for peroxidase, Novocastra). Preparaty podbarwiono hematoksyliną (Mayer's, DakoCytomation, Glostrup, DK) i po odpłukaniu zamknięto w medium (Novomount Permanent Slide Mounting Medium, Novocastra). Na każdym preparacie policzone zostało 100 komórek. Ekspresja c-Rel w jądrach komórkowych leukocytów została oznaczona jako NF-kB(+)komórki. Aktywacja NF-kB w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej wykazana została w procentowym udziale NF-kB(+) komórek. Jako kontrolę pozytywną zastosowano preparaty leukocytów stymulowanych E.coli O111:B4 LPS 5 ug /ml (Sigma).

Badania implantacyjne

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 53/03 z dnia 15.10.2003

Badania miejscowej reakcji tkanki mięśniowej wykonano na 18 szczurach szczepu Wistar, samcach w wieku ok. 3 miesięcy i wadze ok. 200g. Szczury znieczulano podając dootrzewnowo pentobarbital w dawce 2mg /100g wagi szczura.

Operacje przeprowadzono z zachowaniem aseptyki chirurgicznej. Skórę i tkankę podskórną przecinano w linii środkowej grzbietu na długości około 5 cm. Lekko przesuwając skórę na stronę lewą a następnie prawą, na tępo preparowano mięśnie, w które implantowano próbkę na wysokości odcinka piersiowego kręgosłupa. Mięśnie i ranę skórę zaszywano pojedynczymi szwami Polysorb 3/0 (Johnson&Johnason).

Badania makroskopowe i mikroskopowe wykonano 1 i 3 miesiące po implantacji, przeznaczając po 4 zwierzęta na każdy termin sekcyjny i po trzy na każdy rodzaj materiału..

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu komputerowego *Statistica*.

WYNIKI

Poziom cytokin IL-6, IL-8, TNF- α w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej

– badania *in vitro*

Badane ceramiczne materiały kalcytowe nie indukowały zwiększonych ilości cytokin IL-6, IL-8 zarówno po 24 jak 72 godzinnej stymulacji (wykres 1A i B, wykres 2 A i B). Poziom tych cytokin w supernatantach znad hodowli leukocytów ludzkiej krwi obwodowej z testowanymi materiałami, był porównywalny z grupą kontrolną. Badania wykazały, że wszystkie testowane tworzywa kalcytowe stymulowały leukocyty (PBL) do zwiększonej produkcji TNF- α po 24 i 72 godzinnej inkubacji (wykres 3 A i B).

Ekspresja NF-kappaB w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej – badania

Ekspresja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej, była wyższa po 24 godzinnej stymulacji materiałami CC-5FA i CC-1FA niż po inkubacji z CC-1FK. Aktywację NF- κ B statystycznie znamienne stwierdzono po 24 stymulacji tworzywem CC-5FA w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.05$). Po 72 godzinnej stymulacji tworzywem CC-5FA ekspresja NF- κ B obniżała się i była porównywalna z kontrolą (wykres 4A i B). Pozostałe testowane materiały wywoływały zwiększoną ekspresję NF-kappaB po 72 godzinne

inkubacji, w porównaniu do stwierdzonej w leukocytach kontrolnych. Jednak te różnice nie były znamienne statystycznie.

BADANIA IMPANTACYJNE

Badania makroskopowe

Obraz makroskopowy 1 i 3 miesiące po wszczepieniu wszystkich badanych materiałów był podobny. Mięśnie w bezpośrednim sąsiedztwie implantów miały wygląd prawidłowy. Po odpreparowaniu mięśni, stwierdzono pokrycie wszczepu cienką błoną silnie związaną z ich powierzchnią. Po jej nacięciu implanty dość łatwo pozwalały się usunąć.

Badania mikroskopowe

Ceramika węglanowa CC-5FA

Wokół wszczepów 1miesiąc po operacji, widoczne było pasmo łącznotkankowe (o szerokości 10,8 μ m, miejscami nieostro odgraniczone od mięśni poprzecznie prążkowanych. Otaczająca wszczep luźna tkanka łączna była niejednolitej grubości, a wokół szczytów cylindrycznych implantów była najszersza. W miejscach tych mięśnie miejscami ulegały zanikowi. Od strony mięśni w barwieniu metodą Van Gieson, wyeksponowano liczne włókna kolagenowe ułożone wzdłuż implantu. W łącznotkankowym paśmie widoczne były nagromadzenia erytrocytów (ryc. 1.). Po 3 miesiącach wszczepy otaczało pasmo łącznotkankowe o szerokości 8,79 μ m z przewagą fibrocytów, które miało charakter zbitej włóknistej tkanki łącznej z cechami szkliwienia i kostnienia od strony mięśni i bardziej komórkowy od strony wszczepu. W

mięśniach otaczających wszczep znajdowano nagromadzenia makrofagów, limfocytów i komórek olbrzymich (ryc. 2).

Ceramika węglanowa CC1FA

W 1 miesiącu po wszczepieniu, przestrzeń po ceramice ograniczało ostro oddzielone od mięśni pasmo bogatokomórkowej tkanki łącznej o szerokości 9,28 μm , w którym stwierdzano liczne naczynia krwionośne oraz makrofagi (ryc. 3). W 3 miesiącu po wszczepieniu implanty otaczała szersza zbita włóknista tkanka łączna o szerokości 28,56 μm z cechami szkliwienia i kostnienia, poza którą od strony mięśni stwierdzano obecność pojedynczych, aktywnych komórek żernych, głównie makrofagów. W miejscach tych mięśnie ulegały miejscami zanikowi (ryc. 4).

Ceramika węglanowa CC-1FK

Ceramikę w 1miesiącu po wszczepieniu otaczało pasmo luźnej tkanki łącznej, które od strony mięśni miało włóknisty charakter. W paśmie tym obecne były pozostałości biomateriału otoczone pluripotencjalnymi komórkami, powodując znaczne jego miejscowe poszerzenie o szerokości 17,33 μm (ryc. 5). W 3 miesiącu pasmo włóknistej tkanki łącznej o szerokości 6,84 μm było ostro odgraniczone od mięśni poprzecznie prążkowanych, jedynie wokół zakończeń cylindrycznych próbek widoczny był rozplem tkanki tłuszczowej. W opisywane paśmie znajdowano ogniska szkliwienia i kostnienia (ryc. 6).

OMÓWIENIE I DYSKUSJA

W odpowiedzi na zapotrzebowanie na resorbowalne materiały do zastosowania w chirurgii kostnej, przygotowano ceramikę węglanową. Surowcem dla niej był węglan wapnia w postaci krystalicznego aragonitu lub kalcytu z różną zawartością fluorku litu. Badano tworzywo CC-1FA - z krystalicznego aragonitu (99% CaCO_3 i 1% LiF), CC-5FA - z krystalicznego aragonitu (95% CaCO_3 i 5% LiF) i CC-1FK - materiał z krystalicznego kalcytu (99% CaCO_3 i 1% LiF).

Badania *in vitro* biogodności preparatów obejmowały ocenę poziomu cytokin TNF- α , IL-6, IL-8 (metodą ELISA) w nadsączach z nad hodowli leukocytów ludzkiej krwi obwodowej, stymulowanej testowanymi preparatami oraz określenie aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB w leukocytach ludzkiej krwi obwodowej, z wykorzystaniem metody immunocytochemicznej.

Badania implantacyjne obejmowały oceną makroskopową i mikroskopową miejscowej reakcji tkanki mięśniowej, po wszczepieniu tworzyw w mięśnie grzbietu szczurów na okres 1 i 3 miesięcy.

Uzyskane dane wykazały, że badana ceramika węglanowa nie stymulowała leukocytów ludzkiej krwi obwodowej do produkcji IL-6 i IL-8, zarówno po 24 jak po 72 godzinnej inkubacji, a stwierdzone w czasie badań ilości były porównywalne z ich poziomem w grupie kontrolnej. Wszystkie testowane materiały indukowały w leukocytach ponad dwukrotnie wyższe ilości TNF- α , w porównaniu do ilości wytwarzanych przez komórki nie stymulowane, zarówno po 24 i 72 godzinnej inkubacji. Różnice te były znamienne statystycznie ($p < 0.05$), w jednym tylko przypadku (CC-1FK po 24 godzinnej inkubacji), wynik nie miał znamienności statystycznej. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B po

24 godzinach była wyższa po stymulacji materiałami CC-5FA, CC-1FA niż CC-1FK. Statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej była tylko po stymulacji tworzywem CC-5FA ($p < 0.05$). Po 72 godzinach ekspresja NF- κ B obniżała się i była porównywalna z kontrolą.

W badaniach implantacyjnych makroskopowo nie znajdowano różnic w sposobie wstawiania się testowanych tworzyw. Wszczyty tkwiły w makroskopowo nie zmienionych mięśniach. W badaniach mikroskopowych reakcja tkanek miękkich charakteryzowała się nieswoistą reakcją zapalną związaną z resorpcją badanych materiałów, najbardziej nasiloną po implantacji CC-5FA, mniej po CC-1FA i najmniej po CC-1FK. Prowadziła ona do wytworzenia w 1 miesiącu po wszczepieniu materiałów kalcytowych torebki łącznotkankowej z widocznymi makrofagami, a w przypadku wszczepu CC-5FA - nagromadzeniami erytrocytów.

W 3 miesiącu po implantacji wszczyty otaczała zbita tkanka łączna, najwięzsza wokół CC-1FK z widocznymi ogniskami szkliwienia i kostnienia. W otaczających implanty mięśniach stwierdzano obecność makrofagów - pojedynczych wokół CC-1FA i licznej nagromadzonych wokół CC-5FA. W otaczającym implant CC-5FA w mięśniach znajdowano także wielojądrowe komórki olbrzymie.

Badania własne wykazały, że materiał CC-5FA wywoływał najbardziej nasilony odczyn tkanek miękkich 1 i 3 miesiące po implantacji. Ceramika ta aktywowała NF- κ B w okresie wczesnym oraz indukowała produkcję TNF- α po 24 i 72 godzinnej stymulacji.

Aktywacja odpowiedzi zapalnej na zewnętrzny stymulator wymaga skoordynowanej ekspresji licznych czynników. Nasuwa się pytanie, czy istnieją kluczowe modulatory reakcji zapalnej, których obserwacja mogłaby być celem skuteczniejszej oceny biogodności materiałów implantacyjnych. Rolę jednego z ważniejszych potencjalnych immunoregulatorów odgrywa jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Wykazano, że NF- κ B (nuclear factor κ B) jest regulatorowym czynnikiem transkrypcyjnym, zaangażowanym

w regulację ekspresji wielu genów głównie związanych z przebiegiem procesu zapalnego, proliferacją i różnicowaniem komórek, w tym w ekspresje cytokin prozapalnych IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8 [2, 29 –36]. NF-kB wiązany jest także z powstawaniem komórek olbrzymich typu ciała obcego. NF-kB aktywowany przez różne czynniki prozapalne i immunoregulatorowe: cytokiny, lipopolisacharydy, ligandy CD30 i CD 40, mitogeny, może być także indukowany przez czynniki zewnętrzne np.; laboratoryjnie *in vitro* przez LPS i inne substancje. Wykazano, że niektóre biomateriały *in vitro* i *in vivo* także mogą stymulować ekspresję NF-kB [17, 19, 23, 26, 35]. W badaniach nad implantami metalicznymi stwierdzono, że drobiny tytanu indukują TNF- α w makrofagach mysich *in vitro* i odbywa się to - przynajmniej częściowo - z wykorzystaniem szlaku sygnałowego NF-kB [23].

Lewis i inni w swoich badaniach *in vitro* wykazali, że jony metali Au, Ni, Hg aktywują NF-kB w komórkach monocytów. Aktywacja tu uzależniona była od stężenia jonów i dla różnych metali miała inną charakterystykę. Autorzy wykazali ponadto, że wszystkie badane jony metali, nawet w stężeniach podprogowych, podwyższały aktywację NF-kB wywoływaną przez LPS bakteryjne, sugerując tym samym, że biologiczne efekty oddziaływania jonów badanych metali na monocyty, mogą się ujawnić dopiero po ich aktywowaniu [25].

W badaniach *in vivo* nad implantami metalowymi wykazano, że tworzywa o różnym stopniu toksyczności (tytan o niskiej i miedź o wysokiej), w okresie wczesnym w różny sposób aktywowały NF-kB, wskazując tym samym na użyteczność metody do oceny biogodności [19]. Jednym z głównych stymulatorów NF-kB jest TNF- α , który w zależności od stanu funkcjonalnego komórki, może wywoływać w niej dwa przeciwstawne procesy apoptozy lub aktywacji NF-kB i indukcji ekspresji licznych genów [2, 30].

Wykonane badania własne potwierdziły, że testowane materiały ceramiki węglanowej mogą indukować TNF- α *in vitro*. Aktywacja NF-kappaB *in vitro*, stwierdzona została po

stymulacji tworzywem CC-5FA. Materiał ten także w badaniach *in vivo* w okresie do 3 miesięcy po implantacji, wywoływał w tkance mięśniowej nasilony zapalny. Badania cytokin prozapalnych, aktywacji NF- κ B oraz odczynu tkankowego, pozwalają na zróżnicowanie stopnia biogodności badanych biomateriałów.

Prześledzenie stymulacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF κ -B i mediatorów zapalenia, może udzielić odpowiedzi o potencjalnej wczesnej i późnej reakcji tkankowej na nowe biomateriały i okazać się czułym testem do praktycznej selekcji materiałów, przeznaczonych do zastosowania w tkankach podporowych. Wyniki badań mogą być użyteczne przy ustalaniu standardów postępowania z materiałami implantacyjnymi, w celu skutecznej selekcji nowych materiałów przed zastosowaniami klinicznymi.

WNIOSKI

1. Ceramika CC-5FA wywoływała najbardziej nasilony odczyn tkanek miękkich do 3 miesiąca po implantacji, aktywowała NF- κ B w okresie wczesnym oraz indukowała produkcję TNF- α po 24 i 72 godzinnej stymulacji.

2. Wykonane badania pozwalają stwierdzić, że materiały kalcytowe mogą aktywować transkrypcyjny czynnik NF- κ B w PBL.

3. Badania cytokin prozapalnych, NF- κ B oraz odczynu tkankowego, pozwala na zróżnicowanie biogodności badanych biomateriałów.

LITERATURA

- [1] Błażewicz S., Stoch L.: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna (2000), T. 4.
Biomateriały. Warszawa, Akad. Ofic. Wydaw. EXIT, (2003), 425-497.
- [2] Gołąb J., Jakóbisiak M., Jasek W.: Immunologia, PWN, Warszawa (2002).
- [3] Pielka S., Czarny A., Zaczyńska E., Karaś J., Żywicka B. J., Solski L., Paluch D.,
Szymonowicz M.: The comparative assessment of the influence of bone implant materials
for the tissue reaction and inflammatory reaction and inflammatory mediators level. Pol.
J. Pathol.,(2004), 55, 2, 4.
- [4] Marciniak J.: Biomateriały w chirurgii kostnej. Wyd. Polit. Śląsk., Gliwice (1992),
- [5] Domagała Z., Śliwa J., Hajek E.: The preliminary evaluation of HAP +TCP composite
material biodegradation after implantation in muscular tissue of rats. Polim. Med.
(2001), 31, 3-4, 52-60.
- [6] Żywicka B., Zaczyńska E., Czarny A., Pielka S., Ślósarczyk A., Paluch D., Staniszevska-
Kuś J.: The effect of hydroxyapatite based composite materials on TNF- α , no induction
and soft tissue reaction. An experimental stud., Cent.Eur.J.Immunol., (2005), 30, 1, 131.
- [7] Chang C. K, Wu J. S., Mao D. L, Ding C. X.: Mechanical and histological evaluations of
hydroxyapatitecoated dnd noncoated TiA14V implants in tibia bone. J. Biomed. Mater.
Res. (2001), 56, 1, 17.
- [8] Żywicka B., Zaczyńska E., Czarny A., Pielka S., Ślósarczyk A., Staniszevska-Kuś J.:
The effect of hydroxyapatite based composite materials on TNF- α , no induction and soft
tissue reaction. Cent. Eur. J. Immunol. (2005), 30, 1, 131, 441.
- [9] Zaczyńska E., Pielka S., Staniszevska-Kuś J., Czarny A., Żywicka B., Dawidowicz A.:
Influence of hydroxyaptite implants (HAP/TCP and HAP) on TNF level in rat`s blood
and local soft response. Centr. Europ. J. Immunol., (2002), 27, I.

- [10] Misterka S., Paluch D., Staniszevska-Kuś J., Żywicka B., Pobiedzińska J.: Zmiany w poziomie interleukiny-1B i interleukiny-6 po implantacji wybranych materiałów medycznych. Doniesienie wstępne. Polimery w Medycynie (1998), T. XXVIII, 1-2, 15-24.
- [11] Nagasae M., Udagawa E., Schumacher H.R., Baker D. G., Prolonged Inflammatory reactions induced by ceramic powders the rat pouch model. Nipon Seieigeka Gakkkai Zasshi, (1990), 64, 602-11.
- [12] Ono I., Zhou L. J., Matsui T., Kuboki Y.: Study on the secretion of cytokines from osteoblasts stimula with prostaglandin E1. J. Craniocfac. Surg. (2000), 11, 2, 189-93.
- [13] Ninomiya J.T., Struve J. A., Stelloh C. T., Toth J. M., Crosby K.: Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. J. Orthop. (2001), 19, 4, 621-628.
- [14] Nagase M., Baker D. G., Schumacher H. R. Jr.: Prolonged inflammatory reactions induced by artificial ceramics in the air pouch model. J Rheumatol. (1988), 15, 9, 1334-1338.
- [15] Żywicka B., Czarny A., Zaczynska E., Pielka S., Solski L.: The effect of polyester vascular prostheses on synthesis TNF- α , IFN-g[amma] and NO by human peripheral blond leukocytes - in vitro. Polim.Med., (2005), 35, 3, 3-9.
- [16] Czarny S., Pielka S., Żywicka B., Zaczynska E., Solski L., Szymonowicz M., Paluch D., Staniszevska-Kuś J., Błazewicz S.: TNF, IFN and NO after in vitro stimulation of human blood leukocytes by carbon implants. Immunobiol., (2003), 208 ,1-3, 129.
- [17] Von Knoch F., Heckelei A., Wedemeyer C., Saxler G., Hilken G., Brankampl, Sterner T., Landagraeber S., Henschke F., Loer F., von Knoch M.: Suppression of polyethylene particle-induced osteolysis by exogenous osteoprotegerin. J. Biomed. Mater. Res. A. (2005) 1, 75 , 2, 288-294

- [18] Moro T., Takatori Y., Ishihara K., Konno T., Takigawa_Y., Matsushita T., Chung U., Nakamura K., Kawaguchi H.: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat. Mater.* (2004), 3, 11, 829-836.
- [19] Suska F., Gretzer C., Esposito M., Emanuelsson L., Wennerberg A., Tengvall P., Thomsen P.: In vivo cytokine secretion and NF-kappaB activation around titanium and copper implants. *Biomater.* (2005), 26, 5, 519-527.
- [20] Robak T.: *Biologia i farmakologia cytokin*. PWN, Warszawa-Łódź, (1995).
- [21] Wu S. M., Patel D. D., Pizzo S. V.: Oxidized alpha 2-macroglobulin (alpha 2M) differentially regulates receptor binding by cytokines /growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation. (1998).
- [22] Aston A.W., Ware G. M, Kaul D. K., Ware J. A.: Inhibition of Tumor Necrosis Factor alpha-mediated NFkappaB Activation and Leukocyte Adhesion, with Enhanced Endothelial Apoptosis, by G Protein-linked Receptor (TP) Ligands. *J. Biol. Chem.*, (2003), 278, 14, 11, 858-866.
- [23] Soloviev A., Schwarz E. M., Kuprash D. V, Nedosopasov S. A., Puzas J. E., Rosier R. N., O'Keefe R. J.: The role of p105 protein in NFkappaB activation in ANA-1 murine macrophages following stimulation with titanium particles. *J. Orthop. Res.*, (2002), 20, 4, 714-722.
- [24] Alexander G., Carlsen H., Blomhoff R.: Strong in vivo activation of NF-kappaB in mouse lenses by classic stressors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2003), 44, 6, 2683-2688.
- [25] Lewis J. B., Wataha J. C., McCloud V., Lockwood P. E., Messer R. L., Tseng W. Y.: Au(III), Pd(II), Ni(II), and Hg(II) alter NF kappa B signaling in THP1 monocytic cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* (2005), 1, 74, 3, 474-481.
- [26] Lewis J. B, Randol T. M., Lockwood P. E., Wataha J. C.: Effect of subtoxic concentrations of metal ions on NFkappaB activation in THP-1 human monocytes. *J.*

- Biomed. Mater. Res., (2003), 1, 64A, 2, 217-224.
- [27] Jankowska E., Czarny A., Zaczynka E., Banasiak W., Anker S., Ponikowski P.: The activation of the NFkB system in chronic heart Failure. J. Americ. Colleg. Card. (2003), 41, 6, 157.
- [28] Jankowska E., Haehing S., Czarny A., Zaczynka E., Kus A., Anker S., Banasiak W., Ponikowski P.: Activation of the NFkB system in peripheral blood leukocytes from patients with chronic heart failure. The Europ. J. of Heart Failure, (2005), 1-7.
- [29] Wu T., Chiang S. K, Chau F.Y, Tso MO.: Light-induced photoreceptor degeneration may involve the NFkappaB/caspase-1 pathway in vivo. Brain. Res (2003), 28, 967, 1-2, 19-26.
- Loraine I., McKay Cidlowski J. A.: Molecular Control of Immune/Inflammatory Resopnse: Interactions Between Nuclear Factor-KB and Steroid Recptor-Signalinnng Pathways. Enodcr. Rev., (1999), 4, 435-459.
- [30] Amsterdam A., Tajima K., Sasson R.: Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. Biochem. Pharmacol (2002), 64, 5-6,,843-850.
- [31] Rahman I., Gilmour P. S., Jimenez L. A., Biswas S. K., Antonicelli F., Aruoma Ol.: Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. (2003), 21, 302, 4, 860-864.
- [32] Shi X. Z., Lindholm P. F., Sarna S. K.: NF-kappa B activation by oxidative stress and inflammation suppresses contractility in colonic circular smooth muscle cells. Gastreuter., (2003), 124, 5, 1369-1380.
- [33] Franek W. R., Morrow D. M., Zhu H., Vancurova L., Miskolci L. Y., Darley-USmar K., Simms H. H., Mantell L. L.: NF-kappaB protects lung epithelium against hyperoxia-induced

nonapoptotic cell death-oncosis. Free. Radic. Biol. Med. (2004), 15, 37, 10, 1670-1679.

[34] Lewis J. B, Wataha J. C., Randol T. M., McCloud W., Lockwood P. E.: Metal ions alter lipopolysaccharide-induced NF kappa B binding in monocytes. J. Biomed. Mater. Res. A.. (2003), 1, 67, 3, 868-875.

[35] Tucci M., Baker R., Benghuzzi H., Hughes J.: Levels of hydrogen peroxide in tissues adjacent to failing implantable devices may play an active role in cytokine production. Biomed. Sci. Instrum., (2000), 36, 215-220.

[36] Kishida A., Matsuyama T., Kitajima I., Maruyama I., Akashi M.: Study of cell-material interaction by estimating NF-kappaB activation in HeLa S3 cells adhered onto hydrophilic substrates. Biomat., (2001), 22 6, 541-546.

***Praca została wykonana w ramach badań własnych Akademii Medycznej we Wrocławiu
- nr projektu 1064.***

Adres autorów:

Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów AM

ul. Poniatowskiego 2, 50-326 Wrocław

tel. 071 78 40 136

e-mail: implant@cheksp.am.wroc.pl

Opis rycin :

Żywicka B. inni : „Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i”

Ryc. 1. Obraz mikroskopowy 30 dni po implantacji tworzywa kalcytowego CC-1FA w mięśnie grzbietu szczura. Po prawej przestrzeń po usuniętym implancie ograniczona pasmem bogato komórkowej tkanki łącznej. Barw. HE. Pow. 280x

Fig. 1. Microscopic view 30 days after implantation of calcite material CC-1FA into back muscles. On the right visible space after removed implant surrounded by rich-cell connective tissue. Stain. HE. Magn. 280x

Ryc. 2. Obraz mikroskopowy 90 dni po implantacji tworzywa kalcytowego CC-1FA w mięśnie grzbietu szczura. W centrum widoczne pasmo włóknistej tkanki łącznej ograniczające implant. W mięśniach widoczne komórki żerne. Barw. HE. Pow. 280x

Fig. 2. Microscopic view 90 days after implantation of calcite material CC1FA into rat back muscles. In the center the layer connective tissue surrounding implant. In the skeletal muscles phagocyte cells are visible. Stain HE. Magn. 280x.

Ryc.3. Obraz mikroskopowy 30 dni po implantacji tworzywa kalcytowego CC-5FA w mięśnie grzbietu szczura. Po lewej przestrzeń po usuniętym implancie ograniczona pasmem tkanki łącznej z nagromadzeniami erytrocytów. Barw. HE. Pow. 280x

Fig.3. Microscopic view 30 days after implantation of calcite material CC-5FA into rat back muscles. On the left visible the space after removed implant surrounded by connective tissue with increased concentration of erythrocytes. Stain. HE. Magn. 280x

Ryc. 4. Obraz mikroskopowy 90 dni po implantacji tworzywa kalcytowego CC-5FA w mięśnie grzbietu szczura. U góry widoczne pasmo włóknistej tkanki łącznej ograniczające implant. W mięśniach widoczne makrofagi i komórki olbrzymie. Barw. HE. Pow. 280x

Fig. 4 . Microscopic view 90 days after implantation of calcite material CC-5FA into rat back muscles. On the top layer connective tissue surrounding implant is visible. In the skeletal muscles macrophages and foreign body cells are visible. Stain. HE. Magn. 280x

Ryc. 5. Obraz mikroskopowy 30 dni po implantacji tworzywa kalcytowego CC-1FK w mięśnie grzbietu szczura. U góry przestrzeń po usuniętym implancie ograniczona pasmem bogato komórkowej tkanki łącznej, w której widoczny jest fragment tworzywa. Barw. HE. Pow. 280x

Fig. 5. Microscopic view 30 days after implantation of calcite material CC1FK into rat back muscles. On the top the space after removed implant surrounded by rich-cell connective tissue with particle of biomaterial. Stain. HE. Magn. 280x

Ryc. 6. Obraz mikroskopowy 90 dni po implantacji tworzywa kalcytowego CC-1FK w mięśnie grzbietu szczura. W centrum widoczne pasmo włóknistej tkanki łącznej ograniczające usunięty implant.. Barw. HE. Pow. 280x

Fig. 6. Microscopic view 90 days after implantation of calcite material CC1FK into rat back muscles. In the center layer connective tissue surrounding removed implant. Stain. HE. Magn. 280x.

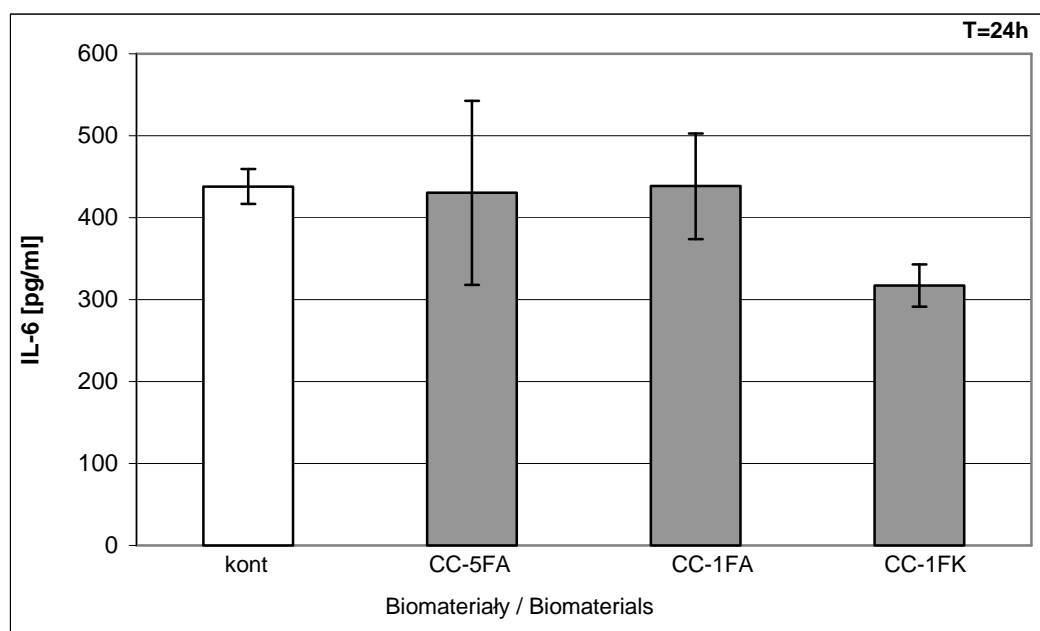
Opis wykresów :

Żywicka B. inni : „Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i”

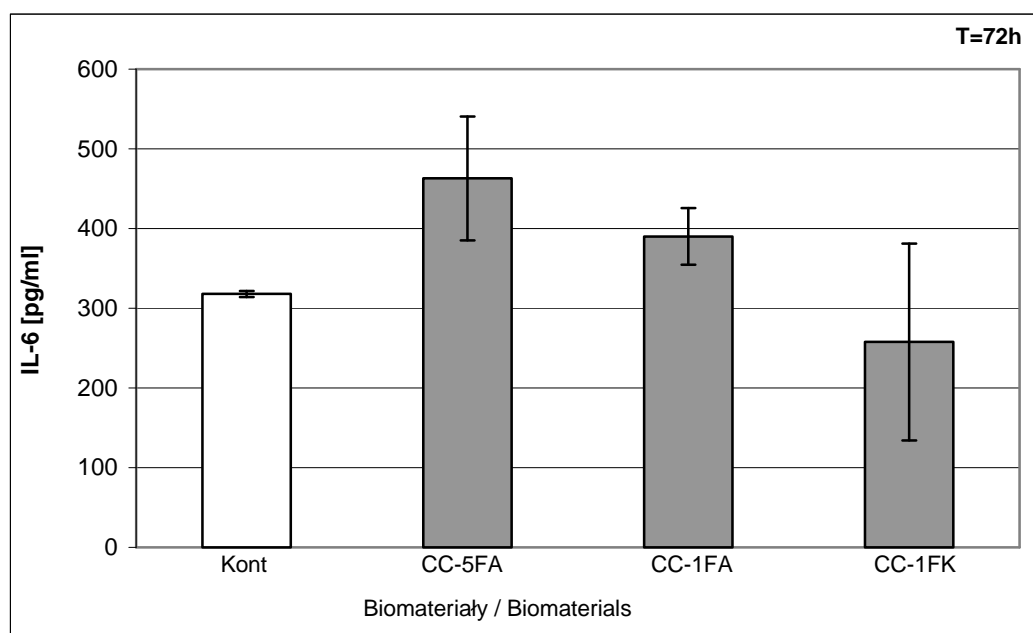
Wykres 1. Poziom IL-6 w nadsączach z nad hodowli ludzkich leukocytów po stymulacji *in vitro* materiałami kalcytowymi po A) 24 godz. B) po 72 godz.

Graph. 1. The IL-6 level in the supernatants of the human leukocytes culture after stimulation with the calcite materials, *in vitro* A) after 24h B) after 72h

1A)



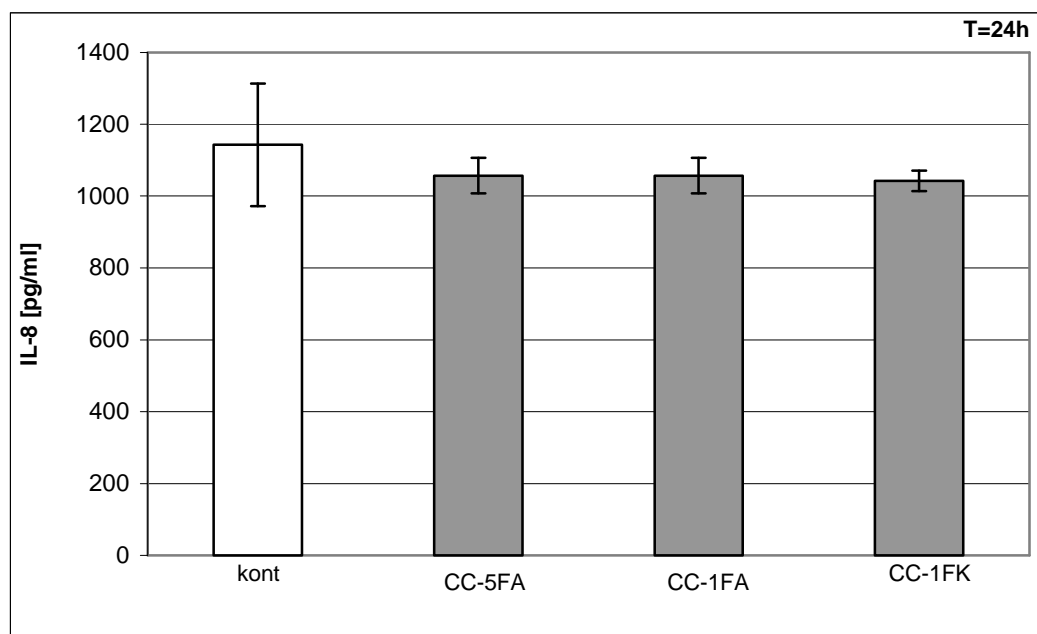
1B)



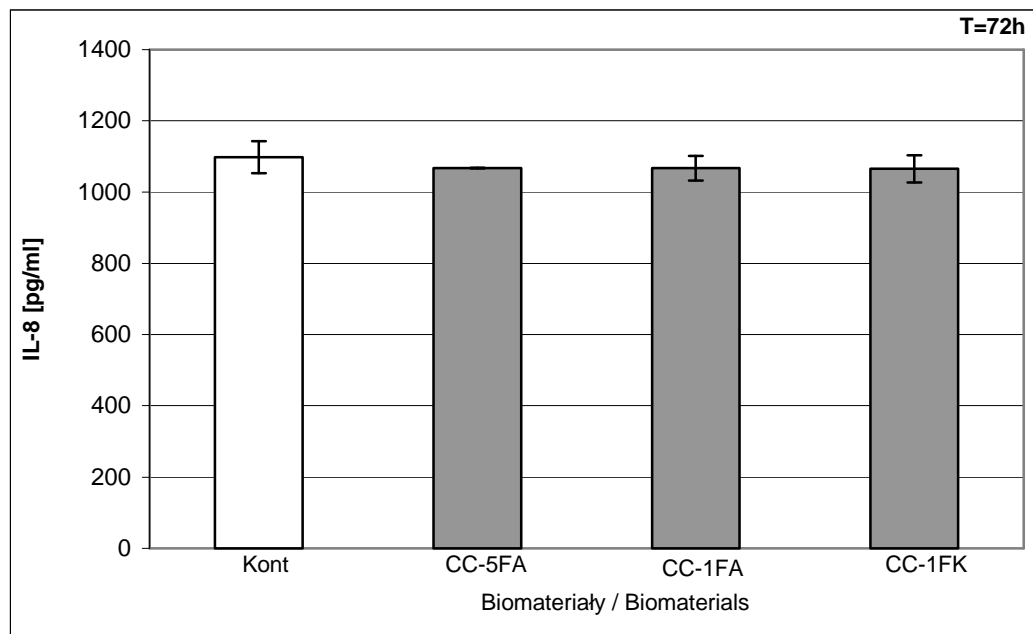
Wykres 2. Poziom IL-8 w nadsączach z nad hodowli ludzkich leukocytów po stymulacji *in vitro* materiałami kalcytowymi A) po 24 godz. B) po 72 godz.

Graph.2. The IL-8 level in the supernatant of the human leukocytes culture after stimulation with the calcite materials, *in vitro* A) after 24h B) after 72h

2A)



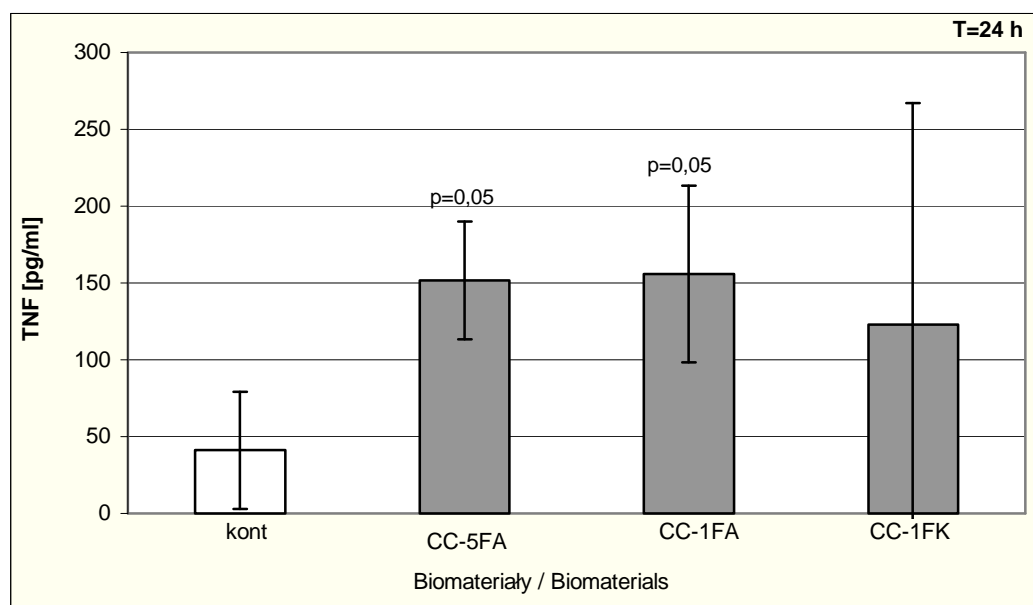
2B)



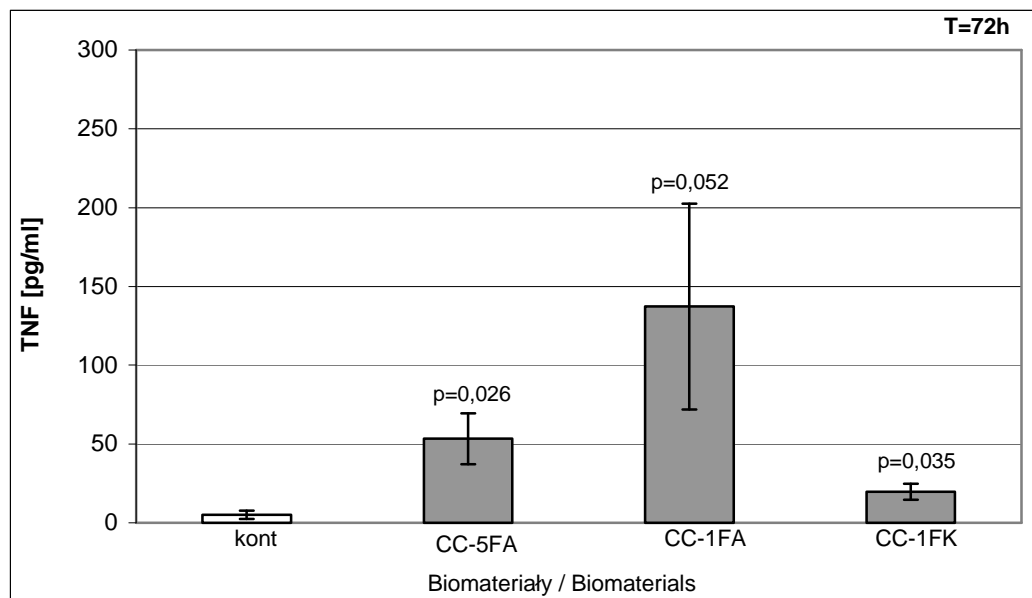
Wykres 3. Poziom $\text{TNF-}\alpha$ w nadsączach znad hodowli ludzkich leukocytów po stymulacji *in vitro* materiałami kalcytowymi A) po 24 godz. B) po 72 godz.

Graph 3. The $\text{TNF-}\alpha$ level in the supernatant of the human leukocytes cells culture after stimulation with the calcite materials, *in vitro* A) after 24h B) after 72h

3A)



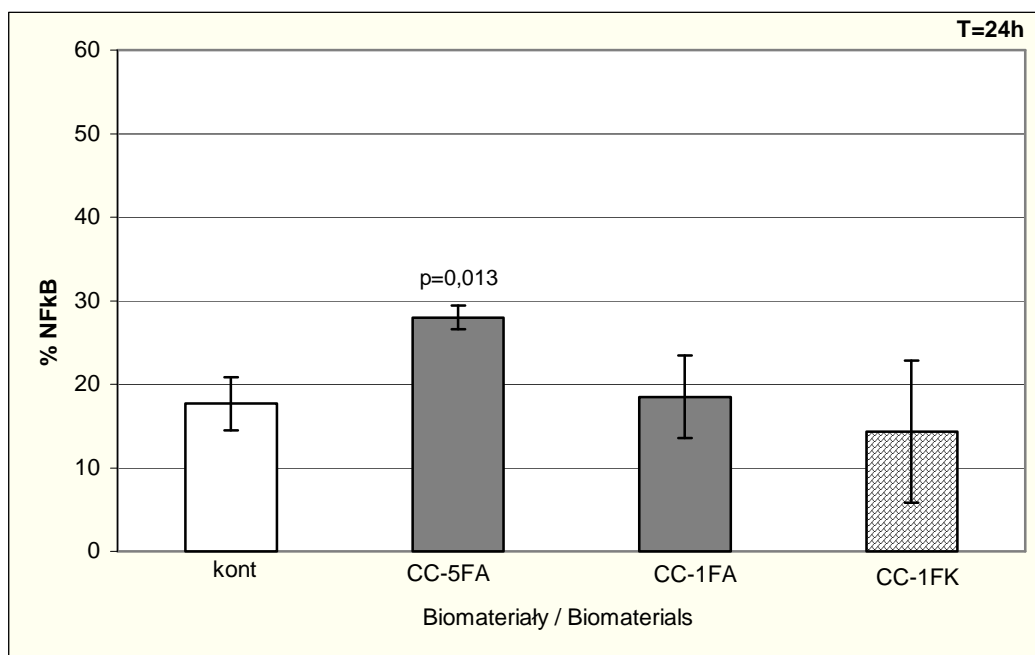
3B)



Wykres 4. Aktywacja NF-kappaB w nadsączach z nad hodowli ludzkich leukocytów po stymulacji *in vitro* materiałami kalcytowymi A) po 24 godz. B) po 72 godz.

Graph. 4. Activation of the NF-kappaB in the supernatant of the human leukocytes culture after stimulation with the calcite materials, *in vitro* A) after 24h B) after 72h

4A)



4B)

