

## ČELIJSKI ODGOVOR NA INTRAPERITONEALNI IMPLANT KOMPOZITA PDMS/HAp

Stevo Najman<sup>1</sup>, Ljubiša Đorđević<sup>2</sup>, Vojin Savić<sup>1</sup>, Nenad Ignjatović<sup>3</sup>, Miroslav Miljković<sup>1</sup>, Perica Vasiljević<sup>2</sup> i Dragan Uskoković<sup>3</sup>

Siloksanški polimeri široko se koriste u biomedicini i farmaciji. Hidroksiapatit (HAp) je prirodni konstituent kosti i zato je u širokoj upotrebi u maksilofacijalnoj i ortopedskoj hirurgiji. Sam HAp je amorfan i nema elastičnosti, pa se njegove osobine poboljšavaju kombinovanjem sa polimerima. Ispitali smo interakciju ćelija i kompozita izrađenog od polidimetilsiloksana (PDMS) i HAp-a skening elektronskom mikroskopijom (SEM) 10 dana posle intraperitonealne implantacije ovih materijala u Balb/c miševe. Analizirana su dva kompozita koji se razlikuju u količini HAp-a. Oba se karakterišu visokom adhezivnošću za različite tipove ćelija. Eritrociti se vide u ćelijskim klasterima na površini kompozita sa većom količinom HAp-a. *Acta Medica Medianae* 2005;44(3): 5 – 8.

**Ključne reči:** SEM, polisiloksan/hidroksiapatit, implant, peritoneum

Medicinski fakultet u Nišu<sup>1</sup>  
Prirodno-matematički fakultet u Nišu<sup>2</sup>  
Institut tehničkih nauka SANU u Beogradu<sup>3</sup>

Kontakt: Stevo Najman  
Medicinski fakultet  
Bulevar dr Zorana Đinđića 81  
18000 Niš  
Srbija i Crna Gora

### Uvod

Primena sintetičkih polimernih biomaterijala danas pokazuje izrazitu tendenciju širenja u biomedicini i farmakologiji (1). Time je potreba za izradom novih polimernih biomaterijala sve izraženija. U razvoju ovih materijala ističu se dva trenda (2). Jedan je dobijanje polimera sa dobro definisanom strukturom i specifičnim mehaničkim, biološkim i fizičko-hemijskim osobinama. Drugi pristup je razvoj fleksibilnih biomaterijala, koji se u različitim sredinama ponašaju različito. Različite osobine sintetičkog biomaterijala istog tipa dobijaju se variranjem uslova u sintezi komponenti koje ulaze u njegov sastav (3).

U našim ranijim istraživanjima ispitivani su biomaterijali na bazi hidroksiapatita (HAp) koji se naročito mnogo koriste u maksilofacijalnoj hirurgiji i ortopediji (4,5). HAp je prirodna mineralna komponenta kosti, koja se za primenu može pripremiti kao keramički materijal. I pored dobrih bioaktivnih osobina HAp, ograničavajuće svojstvo za široku ortopedsku primenu je njegova krtoš. Ovaj nedostatak se obično prevazilazi mehaničkim ojačavanjem HAp organskim polimerima koji mogu da simuliraju neke karakteristike fibrilarne organske komponente koštanog matriksa (3,4,5).

Tragom ove ideje napravljen je biokompozit od HAp i polidimetilsiloksana (PDMS) (6).

Polisiloksanški polimeri, zahvaljujući dobroj biokompatibilnosti, nalaze široku primenu u ortopedskoj i plastičnoj hirurgiji za korekciju koštanih i drugih defekata, za pravljenje srčanih zalistaka, pejsmejкера, katetera, sočiva, zubnih implanata, kao i za izradu silikonskih mamarnih implanata (2). Dodavanjem hidroksiapatita u polisiloksan dobija se biomaterijal sa visokim stepenom elasticiteta, stabilan, otporan na hemikalije, hidrofoban i propustljiv za gasove. Uz to, ovakav biokompozit može biti aplikovan injektovanjem da bi se izbegla hirurška trauma (6).

Interakcija implantiranog materijala i tkiva je jedan od glavnih pokazatelja njegove biokompatibilnosti. Pri tome su modeli *in vivo* u prednosti nad *in vitro* modelima, jer omogućavaju validno sagledavanje raznih interakcija u fiziološkim uslovima. Intraperitonealna implantacija je čest izbor u ovakvim istraživanjima zato što je to vrlo brza, osetljiva i pouzdana metoda za testove biosenzibilnosti (7).

### Cilj rada

U ovom radu procenjivali smo interakciju ćelija i intraperitonealnih implanata napravljenih od kompozita polisiloksana i hidroksiapatita primenom skening elektronske mikroskopije deset dana posle implantacije.

### Materijal i metode

Analizirane su dve vrste kompozita polidimetilsiloksana i hidroksiapatita. Jedan kompozit je u

matriksu od polisiloksana sadržao nizak procenat HAp (5 mas%) i obeležen je kao PDMS/HAp1, a drugi je u polisiloksanskom matriksu sadržao visok procenat HAp (60 mas%) i obeležen je kao PDMS/HAp2 (6).

Kao eksperimentalne životinje korišćeni su beli miševi soja Balb/c iz vivarijuma Medicinskog fakulteta u Nišu. Životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima. Anesteziranim životinjama, starosti 6 nedelja, hirurški je ubacivan u peritoneum implant u obliku blokova dimenzija 1x1,5x5 mm. U jednu životinju implantirana je samo jedna vrsta implanta. Za implantaciju svakog od ispitivanih materijala odvojeno je po 6 miševa. Posle 10 dana od implantacije životinje su žrtvovane u anesteziji i implanti su ekstrahovani.

Nakon ekstrakcije iz peritoneuma implanti su fiksirani u gluteraldehidu. Fiksirani uzorci dehidrirani su u rastućim koncentracijama alkohola, a zatim u rastućim koncentracijama acetona. Posle dehidratacije uzorci su sušeni u tečnom CO<sub>2</sub> na kritičnoj tački. Osušeni uzorci su spaterovani zlatom u jonskom naparivaču JFC-1100E JEOL. Pripremljeni uzorci su analizirani na skening elektronskom mikroskopu (SEM) JSM-5300 JEOL.

## Rezultati

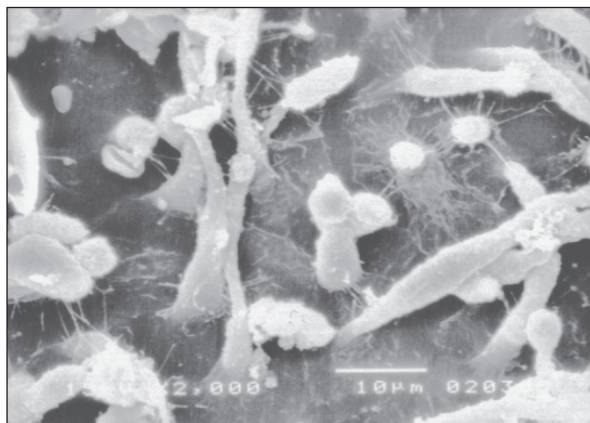
### SEM analiza implanta PDMS/HAp1

Skening elektronsko-mikroskopska analiza pokazuje da je kompozit PDMS/HAp1 relativno homogene i kompaktne strukture. U njemu se mogu videti sitne pore i komorice. Homogeno raspoređeni blokovi HAp uobičajeno su vrlo sitni za razliku od drugog ispitivanog kompozita.

Slika 1 pokazuje velike ćelijske aglomerate u kojima dominiraju međusobno isprepletene vezivno-tkivne ćelije koje su obično u udubljenim delovima površine implanta. Ponegde se i na ravnim površinama mogu videti gusta polja sa ćelijama adherentnog fenotipa, kao što su makrofagi, fibroblasti i retikularne ćelije. Prisutni limfociti su ili direktno adherirani na materijal, ili na površinu drugih ćelija.

### SEM analiza implanta PDMS/HAp2

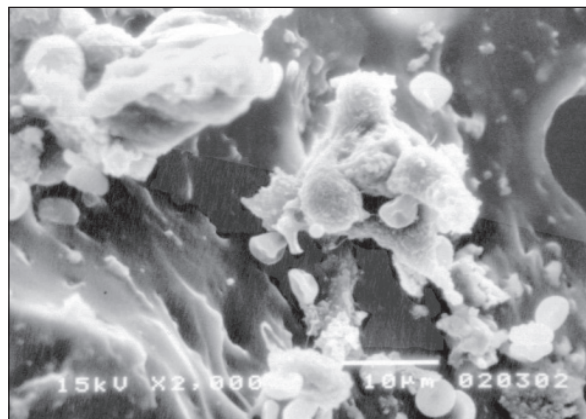
Skening elektronska mikroskopija preseka kompozita PDMS/HAp2 daje sliku mnoštva HAp



Slika 1. Ćelije adherentnog tipa na površini kompozita PDMS/HAp1

blokova različite veličine i oblika utopljenih u polimer PDMS. Ispitivani kompozit je poroznog tipa i u njemu dominiraju komorice i mehurići različitih dijametara.

Na implantu PDMS/HAp2 uočljive su razne aglomeracije od limfoidnih i vezivno-tkivnih ćelija. U šupljinama kompozita vide se agregacije krupnih vezivno-tkivnih ćelija sa limfoidnim. Uočljivo je da se ćelijski klasteri obično formiraju oko zrnaca hidroksiapatita koja izviru iz polisiloksanskog matriksa. Vezivno-tkivne ćelije na svojoj površini često nose adherirane eritrocite (Slika 2).



Slika 2. Eritrociti adherirani na vezivno-tkivne ćelije na udubljenjima površine kompozita PDMS/HAp2

## Diskusija

Oba kompozitna materijala pokazuju visoke adhezivne karakteristike za više tipova ćelija. Na osnovu veće gustine ćelija na površini može se zaključiti o izraženijim adhezivnim karakteristikama PDMS/HAp1. Na oba tipa kompozita HAp partikule na površini predstavljaju nukleacione centre i adherencione tačke za sve prisutne tipove ćelija. Osim hemijskog sastava, verovatno i struktura materijala ima uticaj na njegovu interakciju sa ćelijama. To je naročito vidljivo na materijalu PDMS/HP2, gde se ćelijski agregati češće nalaze u mehurastim udubljenjima nego na ravnoj površini.

Očigledno je da su sastav adheriranih ćelija i njihov izgled različiti na ispitivanim implantima. Na površini PDMS/HAp1 vide se ćelije sa tipičnim adherentnim fenotipom, kao što su makrofagi, retikularne ćelije i fibroblasti. S druge strane, na PDMS/HAp2 ćelije manjom površinom naležu na materijal, a osim ćelija adherentnog tipa, vidljivo je i dosta eritrocita. To bi moglo da znači veću angiogenezu na ovakvom materijalu, a takva pojava bi se mogla dovesti u vezu sa većom poroznošću PDMS/HAp2.

Drugi materijali su takođe korišćeni kao nosači HAp. Heisel (8) je napravio suspenziju hidroksiapatita u tečnom visokomolekularnom želatini i injekcijom aplikovao u koštani defekt zeca u kojem je potom formiran kalus i premošćen defekt.

Istraživanja procesa ćelijske adhezije pomoću transmisiona i skening elektronske mikroskopije pokazala su da se fibroblastima slične ćelije i limfocitni klasteri javljaju na očnoj sočivu zeca, koje je

eksperimentalno implantirano u peritoneum miša (9). Pri tome su nađene ćelije sa izduženim pseudopodijama uz određene morfološke varijacije. Pošto posle implantacije sočiva u oko zeca, na mebranama okolnih ćelija nisu primećene promene, pojava velikog broja fibroblastima sličnih ćelija oko implanta u peritoneumu miša objašnjena je pozitivnom reakcijom na antigene, gde su limfocitni klasteri poslužili kao indikator imunološke aktivnosti.

Neka istraživanja su pokazala da stepen ćelijskog odgovora u peritoneumu varira u zavisnosti od implantiranog materijala (7). S druge strane, postoje nalazi da reakcije organizma zavise od ispitivane vrste ili soja organizma (10). Tako je uvođenje plastike i parafinskog ulja u peritonealnu šupljinu osetljivih sojava miševa, kao što je Balb/c, izazvalo hroničnu inflamatornu reakciju sa konsekventnim razvojem plazmocitoma. Kod istih životinja ni silikonsko ulje, ni silikonski gel, koji se koristi za izradu mamarnih implanata, nisu kroz više od godinu dana ispitivanja doveli do indukcije plazmocitoma.

Kao razlog za veću adherenciju ćelija za HAp partikule u odnosu na polisiloksanski matriks moguće je tražiti u razlici površinske reakcije ove dve komponente kompozita. Za razliku od HAp, polisiloksan pokazuje hidrofobna svojstva. Neki istraživači pratili su ponašanje

površine polisiloksanskih polimera u ćelijskoj adheziji. Pokazali su da se na površinskom filmu polimera uspostavlja hidrofobno-hidrofilni balans, koji se onda odražava na kinetiku adsorpcije albumina i fibrinogena iz plazme od kojih onda zavisi adhezija ćelija (11).

Studija kinetike siloksanskih derivata iz polisiloksanskih tkivnih implanata pokazuje da se deo startnog materijala u fiziološkim uslovima razgrađuje na siloksanske oligomere i silikon dioksid i distribuira u okolno tkivo (12). Iako migracija i distribucija siloksanskih derivata nisu još uvek dovoljno proučeni, u razmatranja mehanizama interakcije polisiloksana i ćelija u *in vivo* sistemima svakako bi trebalo uključiti takve pojave.

### Zaključak

Oba ispitivana kompozita na bazi polisiloksana pokazuju visoke adhezivne karakteristike za više tipova ćelija, sa izraženijim adhezivnim karakteristikama PDMS/HAp1. Na oba tipa kompozita obično su HAp partikule adherencione tačke za ćelije. Na materijalu PDMS/HAp2 ćelijski klasteri se češće nalaze u mehurastim udubljenjima nego na ravnoj površini. Prisustvo eritrocita u ćelijskim klasterima je karakteristika PDMS/HAp2.

### Literatura

- Guerin P. Use of synthetic polymers for biomedical application. Clin Elektrophysiol 1983;6:449-53
- Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. Trends in Biotechnology 1999;17:409-21.
- Ignjatović N, Tomić S, Dakić M, Miljković M, Plavšić M, Uskoković D. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. Biomaterials 1999;20:809-16.
- Ignjatović N, Savić V, Najman S, Plavšić M, Uskoković D. A study of HAp/PLLA composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy. Biomaterials 2001;22:571-5.
- Najman S, Savić V, Djordjević L, Ignjatović N, Uskoković D. Biological evaluation of hydroxyapatite/poly-L-lactide (HAp/PLLA) composite biomaterials with poly-L-lactide of different molecular weights intraperitoneally implanted into mice. Bio-Medical Materials and Engineering 2004;14:61-70.
- Ignjatović N, Jovanović J, Suljovrujić E, Uskoković D. Injectable polydimethylsiloxane-hydroxyapatite composite cement. Bio-Medical Materials and Engineering 2003;13:401-10.
- Freyria AM, Chignier E, Guidollet J, Louisot P. Peritoneal macrophage response: an *in vivo* model for the study of synthetic materials. Biomaterials 1991;12:111-8.
- Heisel J. Animal experiment studies of callus formation by hydroxyapatite injection. Unfallchirurgie 1987;13:179-86.
- Uenoyama K, Kanagawa R, Tamura M, Matoba M, Enomoto Y, Ohmi S. Experimental intraocular lens implantation in the rabbit eye and in the mouse peritoneal space. Part IV: Cell adhesion, fibroblast-like cell, and lymphocytic cluster observed on the implanted lens surface. J Cataract Refract Surg 1989;15:559-66.
- Potter M, Morrison S, Wiener F, Zhang XK, Miller FW. Induction of plasmacytomas with silicone gel in genetically susceptible strains of mice. J Natl Cancer Inst 1994;86:1058-65.
- Okano T, Aoyagi T, Kataoka K, Abe K, Sakurai Y, Shimada M, et al. Hydrophilic-hydrophobic microdomain surfaces having an ability to suppress platelet aggregation and their *in vitro* antithrombogenicity. J Biomed Mater Res 1986;20:919-27.
- Raimondi ML, Sassara C, Bellobono IR, Matturri L. Kinetic study of release of silicon compounds from polysiloxane tissue expanders. J Biomed Mater Res 1995; 29:59-63.

## CELL RESPONSE TO INTRAPERITONEAL PDMS/HAP COMPOSITE IMPLANT

*Stevo Najman, Ljubisa Djordjevic, Vojin Savic, Nenad Ignjatovic, Miroslav Miljkovic,  
Perica Vasiljevic and Dragan Uskokovic*

Siloxane polymers have been widely used in biomedicine and pharmacy due to their biocompatibility. Hydroxyapatite (HAp) is a natural constituent of bones, and therefore widely used in maxillofacial and orthopedic surgery. HAp itself is amorphous and without elasticity, so its characteristics can be improved when combined with organic polymers. We evaluated the interaction of cells and composites made of polydimethylsiloxane (PDMS) and HAp by scanning electron microscopy (SEM) 10 days after their intraperitoneal implantation into Balb/c mice. Two composites which were different in the quantity of HAp were analyzed. Both of them showed high adhesive characteristics for different cell types. The erythrocytes in cell clusters could be seen on the surface of the composite with higher quantity of HAp. *Acta Medica Medianae* 2005; 44 (3): 5–8.

**Key words:** SEM, polysiloxane/hydroxyapatite, implant, peritoneum