

SKRÓT RAPORTU Z BADANIA CYTOTOKSYCZNOŚCI TLENKU GRAFENU

Wykonane przez Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek, Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego przez dr Ewę Olender, dla Centrum Inżynierii Biomedycznej WAT

Wprowadzenie:

Ze względu na bezpieczeństwo pacjenta, materiały potencjalnie przeznaczone do zastosowań medycznych muszą zostać poddane badaniom właściwości biologicznych zgodnie z wymogami prawa Unii Europejskiej: dyrektywy 93/42/EEC, 2007/47/WE dotyczących wyrobów medycznych, dyrektywy 90/385/EEC dotyczącej wyrobów medycznych aktywnego osadzania oraz rozporządzenia Parlamentu Europejskiego 1394/2007 w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej.

Testy cytotoksyczności są podstawowymi testami, którym materiały do zastosowań medycznych winny zostać poddane. Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna opracowała na wniosek Komisji Europejskiej normę europejską opisującą podstawowe wymogi techniczne oraz protokoły wykonania testów cytotoksyczności – *PN-EN ISO 10993-5 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – część 5: Badania cytotoksyczności in vitro*.

W oparciu o powyższą normę przeprowadzono na dostarczonym materiale dwa rodzaje testów cytotoksyczności, opierające się na różnych mechanizmach:

- 1) Badanie wpływu testowanego materiału na aktywność komórkowych enzymów mitochondrialnych (MTT)
- 2) Badanie wpływu testowanego materiału na wychwytywanie czerwieni obojętnej przez lizosomy komórkowe (*NRU uptake*)

Badania przeprowadzono na hodowlach komórkowych. Metoda ta jest uznaną alternatywą w stosunku do badań na zwierzętach.

Cele:

Celem przeprowadzonych doświadczeń była ocena potencjalnej cytotoksyczności powłoki wykonanej z grafenu oraz wpływu jej obecności na właściwości cytotoksyczne materiału o znanym działaniu cytotoksycznym (miedź).

Testy cytotoksyczności są podstawowymi testami, którym materiały do zastosowań medycznych winny zostać poddane. Badania przeprowadzano na hodowlach komórkowych. Metoda ta jest uznana alternatywą w stosunku do badań na zwierzętach. Celem przeprowadzonych doświadczeń była ocena potencjalnej cytotoksyczności powłoki wykonanej z grafenu oraz wpływu jej obecności na właściwości cytotoksyczne materiału o znanym działaniu cytotoksycznym (miedź).

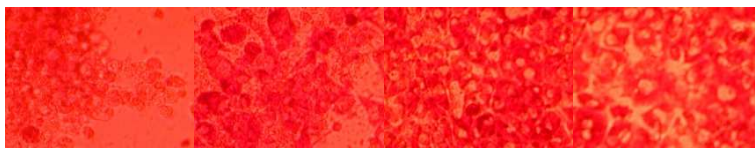
Obserwacje i wyniki:

1. W ocenie mikroskopowej (powiększenie x 800) komórek hodowanych w środowisku eluatów zaobserwowano zmiany morfologiczne w zależności od rodzaju materiału użytego do sporządzenia eluatu oraz stopnia rozcieńczenia eluatu. Wstępna ocena wzrokowa pozwalała na zaobserwowanie silnego efektu cytotoksycznego dla eluatów drutu miedzianego nierozcieńczonego i w rozcieńczeniu 1:2 oraz efektu cytotoksycznego dla eluatów drutu miedzianego pokrytego grafenem nierozcieńczonego i w rozcieńczeniu 1:2. Obserwacja taka dotyczyła zarówno testu MTT jak i NRU. Poniżej zdjęcia hodowli po inkubacji z czerwienia obojętną i MTT. Zastosowane eluaty (od lewej): bez rozcieńczenia, 1:2, 1:4, 1:8.

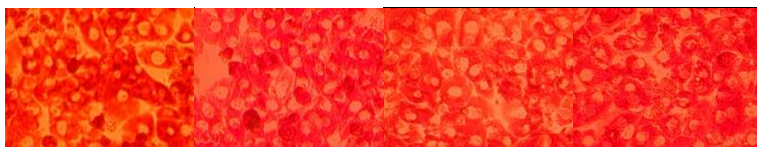
Test NRU



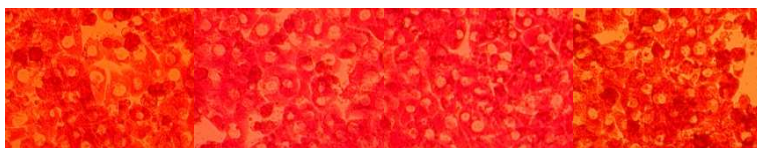
Drut miedziany bez powłoki grafenowej



Drut miedziany z powłoką grafenową

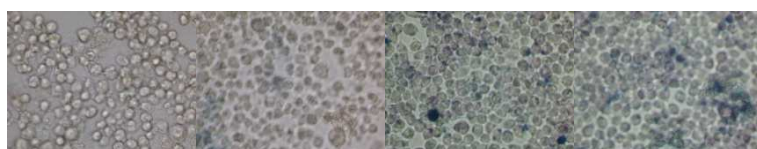


Drut Kirschnera bez powłoki grafenowej

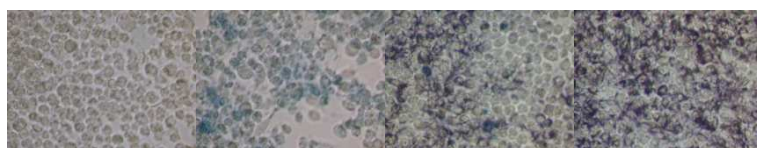


Drut Kirschnera z powłoką grafenową

Test MTT:



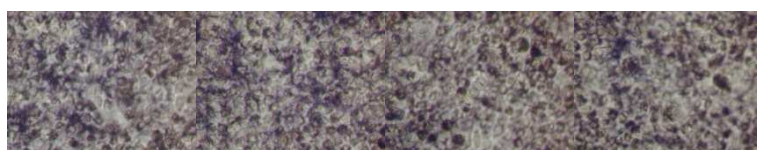
Drut miedziany bez powłoki grafenowej



Drut miedziany z powłoką grafenową



Drut Kirschnera bez powłoki grafenowej



Drut Kirschnera z powłoką grafenową

Ryc. 1. Zdjęcia mikroskopowe hodowli komórkowych poddanych działaniu eluatów z badanych materiałów (od lewej): bez rozcieńczenia, 1:2, 1:4, 1:8. Widoczne zmiany morfologiczne świadczące o cytotoksyczności (zaokrąglone, słabo przylegające komórki, brak lub słabe pobieranie barwnika).

Wnioski:

1. **Powłoka grafenowa nie wywołuje efektu cytotoksycznego**, co zostało stwierdzone na podstawie wyników obserwacji morfologii eksponowanych komórek i testów redukcji soli tetrazolowej MTT oraz wychwytu czerwieni obojętnej – porównanie wpływu pożywek inkubowanych z drutem Kirschnera oraz z drutem Kirschnera pokrytym grafenem.
2. Grafen stanowi barierę pomiędzy środowiskiem medium hodowlanego a materiałem, który pokrywa, która zapobiega/opóźnia występowanie interakcji między materiałem a środowiskiem pożywki – obserwacja zmiany koloru badanego materiału oraz pH pożywki.
3. Na podstawie przeprowadzonych badań rekomendujemy grafen i tlenek grafenu do zastosowań medycznych.

Opracowanie: dr nauk med. Ewa Olender, mgr inż. Jerzy Barański

Kwiecień-sierpień 2014r