

WPŁYW CHEMICZNEJ I FIZYCZNEJ MODYFIKACJI POWIERZCHNI POLISULFONU NA REAKCJE KOMÓRKOWE IN VITRO

B. CZAJKOWSKA*, J. KOWAL**, M. BŁA EWICZ*** M. PTAK*, M. BOBEK*, J. CIE LIK*

*KATEDRA IMMUNOLOGII COL.MED. U.J

**WYDZIAŁ CHEMII U.J

*** WYDZIAŁ IN YNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

[In ynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 157-160]

Polisulfon od wielu lat stosowany jest w ró nych działach medycyny, zarówno do produkcji sprz tu medycznego, membran do dializy, jak i ró nego rodzaju implantów. T ró norodno zastosowa PSU zawdzi cza swoim własno ciom fizykochemicznym i ogólnie uznanej biouzgodności. Nowoczesne podej cie do zastosowa biomateriałów nie uznaje uniwersalnego pojecia biouzgodności, a odnosi je raczej do miejsca anatomicznego zastosowania lub te (w przypadku sprz tu medycznego) zaproponowanego przeznaczenia. Istnieje wiec mo liwo doboru materiału o

THE IMPACT OF CHEMICAL AND PHYSICAL MODIFICATION OF POLYSULFONE SURFACE ON CELLULAR REACTIONS IN VITRO

B. CZAJKOWSKA*, J. KOWAL**, M. BŁA EWICZ***, M. PTAK*, M. BOBEK*, J. CIE LIK*

*DEPT. OF IMMUNOLOGY, COLL. MED., JAGIELLONIAN UNIVERSITY

**FACULTY OF CHEMISTRY JAGIELLONIAN UNIVERSITY

***FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS , AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 157-160]

Polysulfone has for years been used in various medical applications in both manufacture of medical equipment, dialysis films and implants of various types. This wide variety of PSU applications is due to its physico-chemical properties and generally recognised biocompatibility. In the present

optymalnym oddziaływaniu na żywy organizm, przy założeniu, że znane jest miejsce jego zastosowania. Pierwszy kontakt płynów ustrojowych i komórek ma miejsce na powierzchni materiału i oddziaływania te zależą zarówno od chemicznych jak i fizycznych właściwości powierzchni. Ogólnie panuje pogląd, że powierzchnie hydrofobowe silnie wiążą białka na powierzchniach hydrofilowych, które z kolei sprzyjają adhezji komórek. W warunkach in vivo adhezja komórek zachodzi równocześnie nie z adsorpcją białek z płynów ustrojowych i ustala się pewna dynamiczna równowaga, uzależniona od czynników zarówno materiałowych jak i ustrojowych. Pewnym przybliżeniem reakcji organizmu na różnego typu modyfikacje powierzchni PSU są podjęte przez nas badania in vitro. W badaniach tych sprawdzaliśmy reakcję wybranych komórek na różnego typu modyfikacje powierzchni PSU. Zastosowane modyfikacje miały na celu zasymulowanie zmian powierzchni, jakie mogą zachodzić na PSU podczas sterylizacji (oddziaływanie promieniowaniem UV i plazmy H_2O_2) lub, gdy PSU występuje w kompozycie z innym materiałem (połączenie z siatką polipropylenową i włóknami włóknistymi). Reakcje komórkowe oceniano poprzez oznaczenie żywotności makrofagów, fibroblastów i osteoblastów i ilości zsyntetyzowanego kolagenu i IL-1 pod wpływem zmodyfikowanej lub nie powierzchni PSU w porównaniu do kontrolnych hodowli.

Materiał i metody

Folie z PSU (0,2 g PSU, Aldrich Chemical Comp. Inc. rozpuszczano w 10 cm³ dichlorometanu, wlewano na płytkę szklaną o wymiarach 10x10 cm i suszono folie z PSU na wietlane U.V (na wietlanie prowadzono lampę rtęciową pod ciśnieniem przez 12 godz. $\lambda = 254$ nm) folie z PSU poddane działaniu plazmy H_2O_2 przez 40 min kompozyt PSU z siatką PP kompozyt PSU z włóknami C ludzka linia makrofagowa KMA ludzka linia fibroblastyczna HS-5 ludzka linia osteoblastyczna hFOB 1,19

Hodowle komórkowe prowadzono w 12-dobkowych płytkach, w których na dnie umieszczano krążki z badanych materiałów o średnicy 20mm i dodawano 2ml zawiesiny komórek

Stosowano następujące stężenia komórek i media hodowlane:

Mf 2×10^5 komórek /ml medium (RPMI, 0,1mM hipoksantyna, 0,016mM tymidyna, 0,05mM merkaptioetanol, 10% FCS)
Fb 2×10^4 komórek/ml medium (RPMI + 10% FCS)

osteo 2×10^4 komórek / ml medium (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM, 0,3 mg/ml G-418, 10% FCS)

Żywotność komórek po 7 dniach hodowli oznaczano zaadoptowując do potrzeb eksperymentu metodę przy użyciu MTT.

Stężenie kolagenu typu I i IL-1 wykonano metodą ELISA.

Wyniki i dyskusja

Wpływ promieniowania UV i plazmy H_2O_2 na żywotność komórek przedstawiono na RYS. 1 i 2.

Zarówno promieniowanie UV, jak i działanie plazmy H_2O_2 powoduje zmianę charakteru powierzchni PSU z hydrofobowej w kierunku hydrofilowej, co zostało wykazane przez pomiary widm i kątów zwilżenia. Jak widać z RYS. 1 i 2 tego typu modyfikacja powierzchni powoduje obniżenie żywotności fibroblastów i osteoblastów, natomiast makrofagi nie reagują na nią.

In approach to biomaterials there is no universal notion of biocompatibility; instead, it is referred to the place of anatomic application, or (in case of equipment) its proposed use. It is possible then to select a material of optimal effect on a living organism, assuming the place of its application is known. Body fluids and cells first get in contact on the material surface and these interactions depend on both chemical and physical properties of the surface. Hydrophobic surfaces are generally thought to bind proteins stronger than hydrophilic surfaces which facilitate cellular adhesion. In in vivo environment cellular adhesion takes place simultaneously with protein adsorption from body fluids, and a certain dynamic equilibrium occurs, dependent on both material and organism factors. The aim of our in vitro experiments was an attempt to explain the organism's reactions to different types of PSU surface modifications. The purpose of our modifications was to simulate surface changes that can take place on the PSU during sterilization (impact of UV irradiation and plasma H_2O_2), when PSU is used in a composite material (with polypropylene mesh and carbon fibres). The cells' reactions were evaluated by determination of the vitality of macrophages, fibroblasts and osteoblasts, and the amount of synthesized collagen and IL-1 under the influence of modified or non-modified PSU surface against the control cultures.

Material and methods

PSU foils (0,2 g PSU, Aldrich Chemical Comp. Inc., were dissolved in 10 cm³ of dichloromethane, poured on a glass plate of 10x10 cm in size and dried.

PSU foils UV irradiated (by a mean pressure mercury discharge lamp over 12 hours. $\lambda = 254$ nm)

PSU foils treated with plasma H_2O_2 over 40 min

PSU composite with PP mesh

PSU composite with C fibres

human macrophagous line KMA

human fibroblastic line HS-5

human osteoblastic line hFOB 1, 19

Cell cultures were run in 12-well plates at the bottom of which disks of the tested materials 20 mm in diameter were placed and 2 ml suspension of cells was added.

The following concentrations of cells and culture media were used:

Mf 2×10^5 of cells/ml medium (RPMI, 0,1 mM hypoxanthine, 0,016mM thymidine, 0,05mM mercaptoethanol, 10% FCS)
Fb 2×10^4 of cells/ml medium (RPMI+10% FCS)

Osteo 2×10^4 of cells/ml medium (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM, 0,3 mg/ml G-418, 10% FCS)

Cell viability after seven-day culture was determined by a method, adapted for the present research, using MTT.

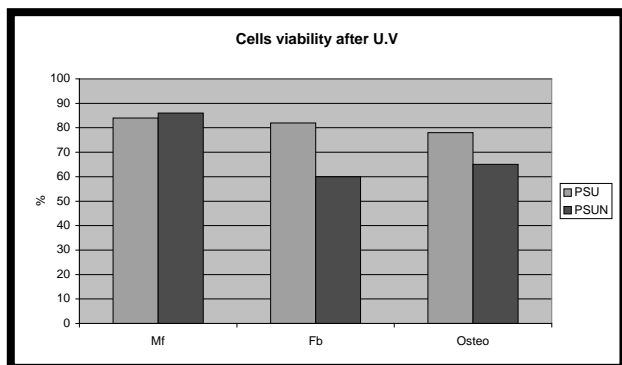
Collagen I and IL-1 concentration was performed by ELISA tests.

Results and discussion

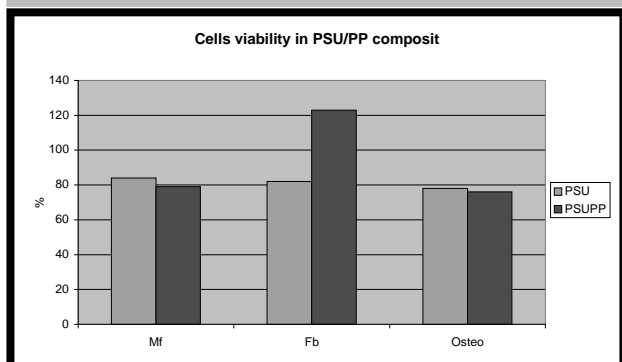
The impact of UV irradiation and plasma H_2O_2 on cell viability has been shown in FIGS. 1 and 2.

Both UV irradiation and reaction of plasma H_2O_2 change the PSU surface character from hydrophobic toward hydrophilic, which has been proved by measurement of spectra and wetting angle. As seen in FIGS. 1 and 2, this type of surface modification lowers the viability of fibroblasts and osteoblasts, while macrophages remain unaffected.

The effect of polypropylene mesh or carbon fibres placed



RYS. 1.
FIG. 1.



RYS. 3.
FIG. 3.

Wpływ siatki polipropylenowej lub włókien w głowach umieszczonych pod powierzchni PSU na ywotno przedstawiono na RYS. 3 i 4.

Różne rodzaje komórek rozpoznają w sposób odmienny substancję umieszczoną pod powierzchni PSU; osteoblasty wyraźnie nie reagują na zmiany powierzchni PSU spowodowane zarówno włóknami w głowicy jak i siatką PP.

W celu zbadania wpływu zastosowanych modyfikacji na zdolność metaboliczną komórek oznaczono ilość wydzielonego przez fibroblasty i osteoblasty kolagenu typu I.

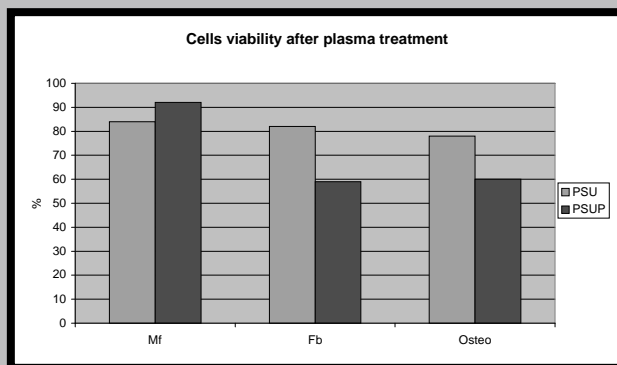
Całkowita ilość kolagenu oznaczona w supernatantach po 7-dniowej hodowli przedstawiono na RYS. 5. Jak widać z RYS. 5 modyfikacja PSU poprzez działanie promieniowania UV i plazmy H_2O_2 nie wpływa istotnie na ilość wyprodukowanego kolagenu przez oba rodzaje komórek, natomiast siatka PP i włókna w głowie zmieniają ilość wyprodukowanego i wydzielonego na zewnątrz komórki kolagenu.

Oznaczenie całkowitej ilości kolagenu wyprodukowanego przez komórki na badanych powierzchniach wnosi istotne informacje praktyczne dotyczące np. doboru metod sterylizacji czy też dogodnego miejsca anatomicznego zastosowania. Jednak całkowita ilość wydzielonego kolagenu nie obrazuje wpływu modyfikacji na zdolność do jego syntezy, ponieważ nie uwzględnia ywotności komórek, która na ogół jest obniżona na zmodyfikowanym materiale. Uwzględniając

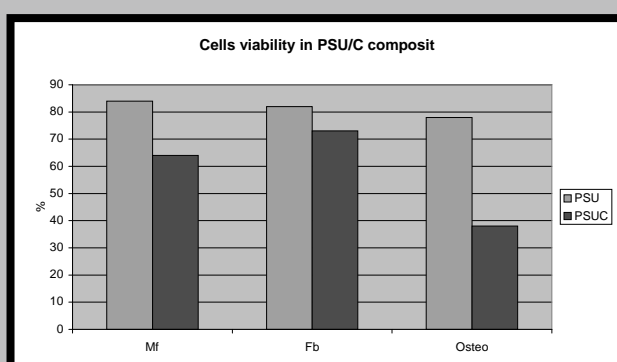
	Fb viability [%]	Collagen [ng/ml]	Collagen* [ng/ml]	Osteo. viability [%]	Collagen [ng/ml]	Collagen* [ng/ml]
PSU	82	148	-----	78	134	---
PSUN	60	147	108	65	107	111
PSUP	59	139	106	60	126	103
PSUPP	123	196	222	76	159	130
PSUC	73	115	130	38	187	65

TABELA I.
TABLE I.

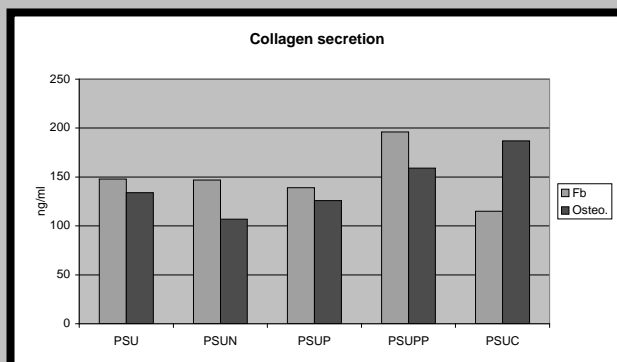
TABELA II.
TABLE II.



RYS. 2.
FIG. 2.



RYS. 4.
FIG. 4.



RYS. 5.
FIG. 5.

under the PSU surface on the viability has been shown in FIGS. 3 and 4.

Different types of cells recognise the substance placed under the PSU surface in different ways; osteoblasts clearly react to the PSU change caused by both carbon fibres and PP mesh with lowered viability.

In order to check the effect of applied modifications on cells' metabolic abilities the amount of collagen I secreted by fibroblasts and osteoblasts was determined.

The total amount of collagen determined in supernatant (liquids) after a seven-day culture has been shown in FIG. 5. As can be observed, PSU modification by UV irradiation and plasma H_2O_2 treatment does not significantly affect the

control [Fb]	126
PSU	109
PSUN	100
PSUP	159
PSUPP	141

TABELA III.
TABLE III.

niaj c ywotno komórek wyliczono warto ci teoretyczne (collagen*), które zestawiono w TABELACH 1 i 2 w porównaniu do warto ci oznaczonych.

Jak widać z RYS. 5 i TABEL fibroblasty i osteoblasty odmiennie reagują na zastosowane modyfikacje PSU. Fibroblasty rozpoznają modyfikację samej powierzchni spowodowaną promieniowaniem UV i działaniem plazmy H_2O_2 , osteoblasty reagują przede wszystkim na substancję umieszczoną pod powierzchnią, t.j. w tym przypadku na siatkę PP i włókno w głoze.

Poziom wydzielanej IL-1 oznaczono w celu sprawdzenia czy badane modyfikacje indukują wzrost syntezy tej interleukiny w fibroblastach. Wyniki w pg/ml przedstawiono w TABELI 3.

Z uzyskanych wyników widać, że żadna z zastosowanych modyfikacji nie powoduje wzrostu syntezy IL-1, co po rednio mo na interpretować jako brak własności prozapalnych tych materiałów.

Wnioski

Stwierdzono odmienną reakcję fibroblastów i osteoblastów na różne modyfikacje powierzchni PSU. Fibroblasty wzmagają syntezę kolagenu pod wpływem promieniowania UV i działania plazmy H_2O_2 na powierzchni PSU. Osteoblasty nie reagują na tego typu modyfikację, natomiast wzmagają syntezę kolagenu pod wpływem umieszczonych pod powierzchnią włókien w głozy lub siatki polipropylenowej. Uzyskane dane mogą być zastosowane przy doborze metod sterylizacji a także przy planowaniu materiałów kompozytowych do różnych zastosowań.

amount of collagen produced by both types of cells, while PP mesh and carbofibres do change the amount of collagen produced and secreted by the cells. Determination of the total amount of collagen produced by cells on the tested surface gives important practical information as to e.g. choice of sterilization method, or a convenient place for anatomic application. However, the total amount of secreted collagen does not represent the effect of modification on the capability for its synthesis, because it does not consider the cell vitality, which is generally lowered on the modified material. Considering the cell viability theoretical values have been calculated (collagen*) and tabulated in TABLES 1 and II, in comparison with the determined values.

As can be seen in FIG. 5 and the TABLES, fibroblasts and osteoblasts react differently to the PSU modifications. Fibroblasts recognise the modification of the surface itself, caused by UV irradiation and plasma H_2O_2 action, while osteoblasts react first of all to the substance placed under the surface, i.e. PP mesh and carbofibre in this case.

The level of secreted IL-1 was determined in order to check whether the tested modifications induce the increase of interleucine synthesis in fibroblasts. The results in pg/ml have been shown in TABLE 3.

From the results it follows that none of the modifications used causes an increase of IL-1 synthesis, which indirectly can be interpreted as lack of inflammatory properties of these materials.

Conclusions

Different reactions of fibroblasts and osteoblasts to different PSU surface modifications have been observed. Fibroblasts induce collagen synthesis under the influence of UV irradiation and plasma H_2O_2 action on PSU surface. Osteoblasts remain unaffected by this type of modification, however they induce collagen synthesis under the influence of carbofibres or polypropylene mesh placed under the surface. The obtained data can be used in the selection of sterilization methods and design of composite materials for various applications.