

## WPŁYW PROMIENIOWANIA UV NA ODDZIAŁYWANIE POWIERZ- CHNI POLISULFONU Z KOMÓRKAMI

B.CZAJKOWSKA\*, J.KOWAL\*\*, A.BIAŁECKA\*\*\*, A.STOBIERSKA\*,  
M.PTAK\*, M.BOBEK\*, J.MARCINKIEWICZ\*\*

\*KATEDRA IMMUNOLOGII,

UNIwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

\*\*WYDZIAŁ CHEMICZNY UNIwersytetu Jagiellońskiego

\*\*\*CENTER OF MICROBIOLOGICAL RESEARCH AND AUTOVACCINES  
LTD., CRACOW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),151-154]

### Wstęp

Polisulfon (PSU) jest polimerem o dużym zastosowaniu w medycynie. Produkują się z niego elementy wszczepiane na stałe do organizmu takie jak: sztuczne naczynia, zastawki czy elementy sztucznego serca i również sprzęt medyczny jak wenflony, cewniki, błony do hemodializy. Powierzchnia PSU jest silnie hydrofobowa, co według niektórych autorów nie sprzyja adhezji komórek, natomiast wzmacnia adsorpcję białek. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że naświetlanie powierzchni PSU promieniowaniem UV zmienia charakter powierzchni z hydrofobowej na hydrofilową, co pociąga za sobą odmienne reakcje komórkowe.

Wykonywany z PSU, podobnie jak i z innych materiałów sprzęt medyczny typu cewniki czy wenflony bardzo często jest miejscem powodującym zakażenia.

W ostatnich latach pojawia się wiele doniesień o zakażeniach szpitalnych spowodowanych przez bakterie występujące jako normalna flora bakteryjna człowieka należą do nich np. *Staphylococcus epidermidis* (S.E) zasiedlający skórę i błony śluzowe. S.E, nie wydziela uszkodzających tkanek toksyn a jego patogenność spowodowana jest wytwarzaniem biofilmu. Zakażenia związane z S.E mają najczęściej charakter chroniczny a spowodowane są kontaktem z ciałem obcym takim jak np. cewnik czy element wszczepu. Pierwszym etapem powstawania biofilmu jest przyleganie bakterii do powierzchni. Następnie formowana jest wielowarstwowa kolonia i wytwarzana zewnątrzkomórko-

## EFFECT OF UV RADIATION ON POLYSULFONE SURFACE - CELL INTERACTION

B.CZAJKOWSKA\*, J.KOWAL\*\*, A.BIAŁECKA\*\*\*, A.STOBIERSKA\*,  
M.PTAK\*, M.BOBEK\*, J.MARCINKIEWICZ\*\*

\*DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY,

COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY

\*\*FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY

\*\*\*CENTRE OF MICROBIOLOGICAL RESEARCH AND AUTOVACCINES  
LTD., CRACOW

*Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),151-154]*

### Introduction

Polysulfone (PSU) is a polymer of a wide range of applications in medicine. It is used for producing permanent implants such as artificial vessels, cardiac valves or elements of artificial heart as well as medical devices such as catheters, or hemolysis membranes. PSU surface is strongly hydrophobic, which, according to many researchers, contributes to cellular adhesion, while enhancing protein adsorption. Our previous research proved that exposure of PSU surface to UV radiation changes its hydrophobic character into hydrophilic, which results in different reactions of cells.

Medical devices such as catheters or intravascular catheters made from PSU and other materials are often a place where infections are induced.

In recent years there have been many reports of hospital infections caused by bacteria which represent a normal bacterial flora of the human body. They include *Staphylococcus epidermidis* (S.E.) which colonizes the skin and mucous membranes. S.E. does not excrete tissue damaging toxins, and its pathogenicity is caused by formation of a biofilm. The S.E. related infections are usually chronic and are caused by a contact with a foreign body such as e.g. catheter or implant part. The first stage of the biofilm formation is bacteria adherence to the surface. Next a multi-layered cluster is formed extracellular polysaccharide (EPS) matrix is produced. The mature biofilm is a separate organisation, isolated from the surroundings by a tight impermeable barrier which protects it against external agents, including the cells of the immunological system and the

wa polisacharydowa matrix- EPS. Powstały, dojrzały biofilm jest samodzielną organizacją, odgranieczoną od otoczenia szczelną barierą, nieprzepuszczalną dla czynników zewnętrznych, w tym komórek układu immunologicznego i większości antybiotyków. Dlatego też główna strategia walki z zakażeniami powodowanymi przez S.E polega na profilaktyce. Składają się na nią specjalne procedury higieny podczas zakładania np. cewników, podawanie rutynowo antybiotyków podczas zabiegów chirurgicznych, pokrywanie wszczepianych implantów substancjami antibakteryjnymi. Innym podejściem jest stosowanie przeciwciał przeciwko PIA (polysaccharide intercellular adhesin), swoistej adhezynie biorącej udział w przyleganiu do siebie warstw w biofilmie. Podejmuje się także próby stosowania substancji o własnościach immunomodulacyjnych takich jak interferon gamma.

Niewątpliwie najprostszą metodą zatrzymania wytworzenia biofilmu jest niedopuszczenie do adhezji pierwszej warstwy bakterii do powierzchni materiału. Powszechnie uważa się że to przyleganie powodują wiązania hydrofobowe powstające pomiędzy powierzchnią, najczęściej w przypadku stosowanych plastików hydrofobową, a błoną bakteryjną. Stosowanie substancji typu detergenty, które interferują z wiązaniami hydrofobowymi, powoduje zmniejszenie adhezji bakterii do powierzchni.

W naszych badaniach chcieliśmy sprawdzić czy inne metody hamowania powstawania wiązań hydrofobowych poprzez zmianę charakteru powierzchni także spowodują mniejszą adhezję bakterii a przez to zmniejszą warunki do powstawania biofilmu. Do badań stosowaliśmy PSU-hydrofobowy i PSU naświetlany UV-hydrofilowy (PSUN). Oprócz oddziaływań z bakteriami sprawdzaliśmy także reakcje fibroblastów (fb) i osteoblastów (osteo) na taką modyfikację powierzchni.

## Materiały i metody

Folie z PSU

Folie z PSU naświetlane 5godz. UV lampą ASH 400

### Komórki

Ludzka linia fibroblastyczna HS-5 ATCC CRL-11882

Ludzka linia osteoblastyczna hFOB 1,19 ATCC CRL-11372

Bakterie Staphylococcus epidermidis ATCC 35547

### Badanie powierzchni materiałów

Widma UV-VIS-wykonano na spektrofotometrze Hewlett Packard 8452A w zakresie 200-400nm

Widma IR- wykonano na spektrofotometrze Bruker Equinox 55 w zakresie 400-4000  $\text{cm}^{-1}$

Kąt zwilżania oznaczono na aparacie Surfens Universal f-my OEG z użyciem oprogramowania Surfens 3.0

Zdjęcia komórek i bakterii wykonano mikroskopem SEM, JOEL JSM-5400

### Techniki komórkowe

Hodowle fibroblastów i osteoblastów w stężeniu  $2 \times 10^4$  prowadzono na badanych materiałach w 12-dołkowych płytkach hodowlanych.

fb-medium hodowlane: RPMI+15% surowicy płodowej (FCS) temp. 37°C

Osteo-medium hodowlane: 1:1 podłoże Ham F12 i modyfikacja Dulbecco podłoża Eagla bez czerwieni fenolowej+10% FCS. Temp. 34°C

Podłoże wymieniano po czterech dniach a po siedmiu dniach oznaczano żywotność komórek a w supernatantach stężenie kolagenu typu I.

Zdjęcia SEM komórek na badanych powierzchniach wyko-

majority of antibiotics. This is why the main strategy of fighting against S.E. caused infections is prophylactic measures including hygienic procedures during, for example, the insertion of catheters, routine antibiotic use during surgery, coating the implanted devices with antibacterial substances. Another approach is the application of antibodies against PIA (polysaccharide intercellular adhesin), a special adhesin contributing to adhesion of layers within the biofilm. Attempts are also made at applying substances of immuno-modulating properties, such as interferon gamma.

Undoubtedly, the simplest method to stop biofilm formation is to prevent the adhesion of the first layer of bacteria to the material surface. It is commonly believed that this adhesion is caused by hydrophobic interaction between the surface, hydrophobic in case of used plastic materials, and the bacterial membrane. The application of detergent-like substances that interfere with hydrophobic interaction lowers the degree of bacteria adhesion to the surface.

The aim of our investigations was to check whether other methods of impeding hydrophobic interaction formation by changing the character of the surface also lower the bacteria adhesion, which would reduce the conditions for biofilm formation. In our tests we used PSU-hydrophobic and UV radiated PSU (PSUN). Apart from interactions between bacteria we have also analysed the response of fibroblasts (fb) and osteoblasts (osteo) to such modification of the surface.

## Materials and methods

PSU foils

PSU foils exposed to 5hr UV radiation with ASH 400 lamp

### Cells

Human fibroblastic line HS-5 ATCC CRL-11882

Human osteoblastic line hFOB 1,19 ATCC CRL-11372

Staphylococcus epidermidis ATCC 35547

### Investigation of materials surfaces

UV-VIS spectra made with Hewlett Packard 8452A spectrophotometer in the 200-400nm range

IR spectra made with Bruker Equinox 55 spectrophotometer in the 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  range

Wetting angle determined by Surfens Universal apparatus with Surfens 3.0 software

Photographs of cells and bacteria made under SEM, JOEL JSM-540 microscope

### Cellular technics

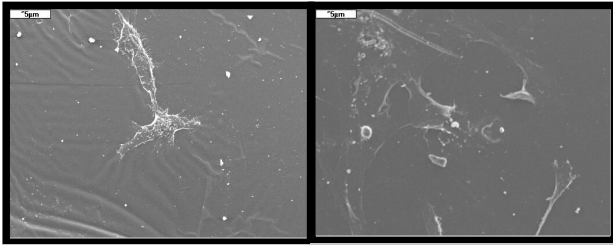
Fibroblast and osteoblast cultures of concentration of  $2 \times 10^4$  were run in 12-well plates.

fb-culture medium: RPMI+15% fetal serum (FCS) at 37°C  
osteo-culture medium: 1:1 medium nutrient Ham F12 and Dulbecco modified Eagle medium nutrient with no phenol red+10% FCS, at 34°C.

The medium nutrient was changed after four days, and after seven days the cell proliferation was determined, in the supernatants the concentration of collagen type I.

SEM photos of cells on the investigated surfaces were taken after three days of culture, after fixation with 2.5% glutaraldehyde, dehydration with increasing concentrations of ethanol and drying the specimens in Anderson apparatus.

2 ml portions of S.E. bacteria of 0.5 density in McFarland scale were put on the tested materials in a 12-well plate and placed in an incubator for 24 hours. Next the materials were rinsed with a buffer solution, and the bacteria were fixed with 3% aldehyde for 15 minutes to be next alcoholized with increasing from 25% to 100% ethanol, and dried



FOT. 1. osteo PSU.

FOT. 2. osteo PSUN.

nywano po trzech dniach hodowli po utrwaleniu 2,5% aldehydem glutarowym, odwodnieniu wzrastającymi stężeniami alkoholu etylowego i wysuszeniu próbek w aparacie Andersona.

Po 2ml bakterii S.E o gęstości 0,5 w skali McFarlanda nakładano na badane materiały w 12-dołkowej płytce hodowlanej i umieszczano na 24 godziny w inkubatorze hodowlanym. Po tym czasie materiały przepłukiwano buforem a bakterie utrwalało 3% aldehydem glutarowym przez 15 min a następnie zadawano wzrastającym od 25% do 100% stężeniem alk.etylowego i suszono na powietrzu przed wykonaniem zdjęć SEM.

Żywołność komórek wykonano przy użyciu zestawu CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay f-my Promega

Stężenie kolagenu typu I oznaczono testem ELISA stosując przeciwciała i standard f-my Bioproducts

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu Fishera i t-Studenta

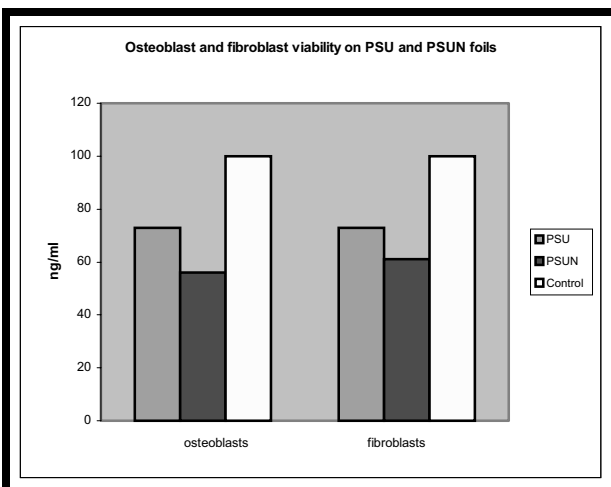
### Wyniki i interpretacja

Analiza widm UV i IR wykazała degradację PSU pod wpływem naświetlania promieniowaniem UV, na co wskazują malejące wartości absorpcji w zakresie pasm grupy sulfonowej i eterowej. Stwierdzono także zachodzenie procesu utleniania czego dowodem jest pojawianie się pików dla grupy karboksylowej i hydroksylowej.

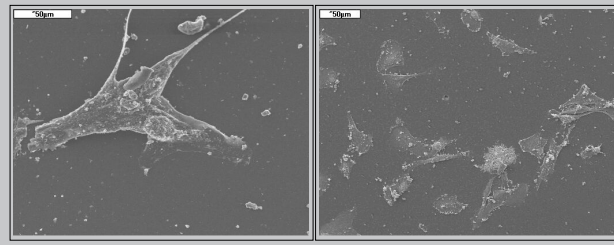
Pomiar kąta zwilżania.

Kąt zwilżania dla powierzchni PSU wynosił 83,96+/- 0,68 a dla powierzchni naświetlanej PSUN 14,94+/-3,11

Zarówno analiza spektralna jak i pomiar kąta zwilżania wskazują na zmianę charakteru powierzchni PSU pod wpływem



RYS. 1. Żywołność osteoblastów i fibroblastów.



FOT. 3. fb PSU.

FOT. 4. fb PSUN.

in the air before the SEM pictures were taken.

Cell vitality was tested by means of CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega.

Collagen I concentration was determined by ELISA test using antibodies and Bioproducts standard.

The statistical analysis was made by Fisher test and t-Student.

### Results and interpretation

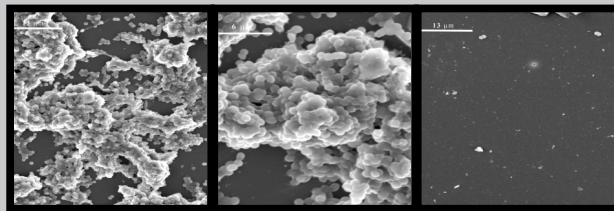
The analysis of UV and IR spectra showed PSU degradation due to exposure toUV radiation, which is proved by the decreasing values of absorbance in the range of the sulfone group and ether bands. The process of oxidation was also observed, which is proved by the appearance of peaks for the carboxyl and hydroxyl groups.

Measurement of wetting angle

The wetting angle for PSU surface was 83,96+/-0,68, for PSUN surface exposed to radiation 14,94+/-3,11.

Both spectral analysis and wetting angle measurement point to the change in the character of the PSU surface under UV radiation from hydrophobic into hydrophilic.

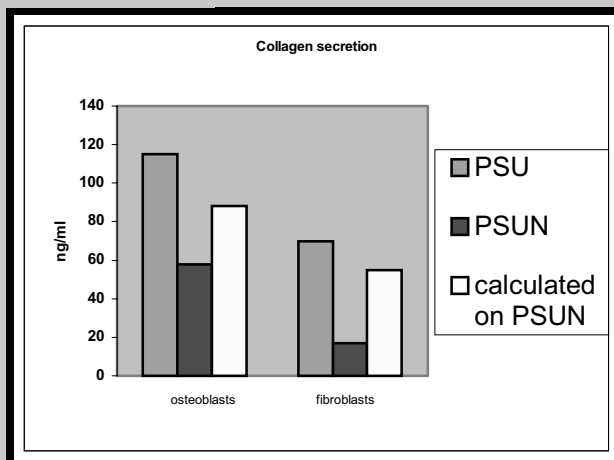
The responses of osteoblasts and fibroblasts to such modi-



FOT.5. PSU +S.E 35547 (SEM 2000x).

FOT.6. PSU +S.E 35547 (SEM 5000x).

FOT.7. PSUN +S.E 35547 (SEM 2000x).



RYS. 2. Wydzielanie kolagenu przez osteoblasty i fibroblasty.

promieniowania UV z hydrofobowej na hydrofilową. Reakcje osteoblastów i fibroblastów na taką modyfikację przedstawiono na FOT.1-4 i RYS.1

Jak widać na FOT.1-4 oba rodzaje komórek adherują do powierzchni PSU i PSUN i przy pomocy tej metody trudno stwierdzić jakiegokolwiek różnice w zachowaniu komórek.

Żywotność osteoblastów na PSUN jest istotnie obniżona w stosunku do PSU (poziom istotności 0,05), natomiast fibroblasty nie reagują zmianą żywotności na taką modyfikację. Wartości wyprodukowanego kolagenu typu I wraz z wartościami obliczonymi po uwzględnieniu żywotności przedstawiono na RYS.2 Jak widać oba typy komórek produkują mniej kolagenu na PSUN w porównaniu z PSU

Zachowanie bakterii S.E na PSU i PSUN przedstawiono na FOT.5-7. Bakterie szczepu 35547 wytwarzają po 24 godz. na powierzchni PSU zorganizowaną strukturę biofilmu, natomiast na powierzchni PSUN obserwuje się tylko pojedyncze bakterie.

## Wnioski

Modyfikacja folii z PSU poprzez 5 godzinne naświetlenie promieniowaniem UV zmienia charakter powierzchni z hydrofobowej na hydrofilową, co pociąga za sobą zahamowanie syntezy kolagenu przez fibroblasty i osteoblasty, nieznaczne obniżenie żywotności osteoblastów i całkowitą utratę zdolności tworzenia biofilmu przez bakterie *Staphylococcus epidermidis*.

fications have been shown in PHOTOS 1-4 and FIG.1.

As can be seen in photos 1-4 both types of cells adhere to PSU and PSUN surfaces. With this method it is difficult to observe any differences in cell behaviour relative to the reference sample, polystyrene coat in this case.

Osteoblast proliferation on PSUN is significantly lower than that of PSU (significance level 0,05), while the proliferation of fibroblasts does not change.

The value of the produced collagen I together with the values calculated with proliferation taken into account have been shown in FIG.2. Both types of cells evidently produce less collagen on PSUN than on PSU surfaces.

The behaviour of S.E. bacteria on PSU and PSUN has been shown in photos 7-10. Bacteria strain 35547 produce an organised biofilm on the PSU surface after 24 hours, while on the PSUN surface only individual bacteria are observed.

## Conclusions

Modification of PSU foil exposed to 5hr UV radiation changes the character of surface from hydrophobic into hydrophilic, which impedes collagen synthesis by fibroblasts and osteoblasts, causes slightly lower proliferation of osteoblasts and complete loss of ability to form the biofilm by *Staphylococcus epidermidis* bacteria.

## Piśmiennictwo

[1] Czajkowska B., Kowal J., Błażewicz M., Ptak M., Bobek M., Cieślak J "The impact of chemical and physical modification of polysulfone surface on cellular reactions in vitro" *Inżynieria Biomateriałów* (2004) 38-42; 157-160.

[2] Harris L.G., Tosatti S., Wieland M., Texor M., Richards R.G. "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* (2004) 25;4135-4148.

## References

[3] Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., Hussain M., Buck F. "Induction of staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases" *Molecular Microbiology* (2005) 55; 1883-1896.

[4] Vuong C., Otto M. "Staphylococcus epidermidis infections" *Microbes and Infection* (2002), 4; 481-489.