

WPŁYW DZIAŁANIA PLAZMY H_2O_2 NA WŁAŚCIWOŚCI FILMÓW POLISULFONOWYCH

J.KOWAL*, B.CZAJKOWSKA**, S. MURATÓW-BODUCH*, A.ORGANISCIAK*, B.TRYBALSKA***

*WYDZIAŁ CHEMII, UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, KRAKÓW,

**COLLEGIUM MEDIUM, UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, KRAKÓW,

***WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AGH, KRAKÓW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),148-151]

Wprowadzenie

Polisulfon należy do materiałów stosowanych do produkcji membran filtracyjnych (np. do hemodializy [1]) oraz różnego rodzaju implantów medycznych [2]. W prezentowanej pracy dokonano próby modyfikacji powierzchni polisulfonu w wyniku działania plazmy H_2O_2 . Badano zmiany powierzchni polimeru oraz oddziaływania fibroblastów i osteoblastów z polimerem oryginalnym i modyfikowanym. Zwrócono szczególną uwagę na proces adhezji bakterii Staphylococ-

THE EFFECT OF PLASMA H_2O_2 TREATMENT ON THE PROPERTIES OF POLYSULFONE FILMS

J.KOWAL*, B.CZAJKOWSKA**, S. MURATÓW-BODUCH*, A.ORGANISCIAK*, B.TRYBALSKA***

*FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKÓW

**COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKÓW

***FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY, AGH-UST, KRAKÓW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),148-151]

Introduction

Polysulfone is frequently used as a material for filtration membranes (eg., for haemodialysis [1]) and medical implants of various types [2]. In this paper we tried to modify the surface of polysulfone films by means of the plasma H_2O_2 treatment. The changes of the polymer surfaces were

cus epidermidis, które, ze względu na zdolność do tworzenia biofilmów, są jedną z ważniejszych przyczyn zakażeń szpitalnych [3].

Materiały i metody

Polysulfon (PSU) (Aldrich, Mn=16 000); ludzkie linie komórkowe ATCC (American Type Culture Collection): osteoblasts: hFOB 1.19, (2×10^4 komórek/cm³), fibroblasts: HS-5, (2×10^4 komórek/cm³), hodowane w inkubatorze w atmosferze powietrza (95%) i CO₂ (5%) w 37°C (fibroblasty) i 34°C (osteoblasty); Staphylococcus epidermidis: szczepy 35547 i 12228, (1.5×10^8 cfu/ml), hodowane w Tryptic Soy Broth (DIFCO).

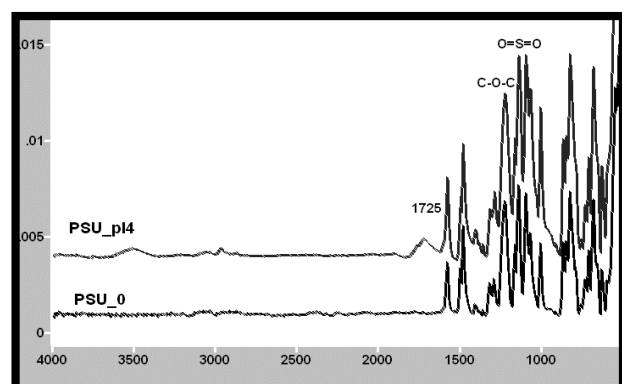
Oryginalne filmy polisulfonowe (oznaczone jako PSU_0) poddano działaniu plazmy H₂O₂ w układzie Sterrad 100 (13,56 MHz, ciśnienie: 0.07-2.0 kPa, temperatura 57°C) (1-4 cykle, próbki oznaczone jako PSU_pl1 - PSU_pl4). Widma próbek polimerowych rejestrowano przy pomocy spektrofotometrów: 8452A Hewlett Packard (UV-VIS), EQIUNOX 55, Bruker (FTIR), DIGILAB FTS 60 (ATR). Obserwacje SEM prowadzono stosując przyrząd JSM-5400 Jeol (5kV i 10 kV). Kąty zwilżania wodą badanych filmów mierzono techniką leżącej kropli przy pomocy SurfTens Universal (OEG GmbH Germany). Żywotność komórek określono metodą MTS, a stężenie kolagenu typu I wyznaczono metodą ELISA (DSLabs Inc., USA).

Wyniki i dyskusja

Analiza spektralna (widma absorpcyjne UV i FTIR, widma IR ATR) potwierdziły zachodzenie procesu degradacji polisulfonu oraz tworzenia grup karbonylowych i hydroksylowych (RYS.1). Zaobserwowano stopniowe zmniejszanie pasm absorpcyjnych z maksimami przy 272 nm (gupa fenylowa), 1152 cm⁻¹ (grupa sulfonowa), 1245 cm⁻¹ (grupa eterowa). Zmianom tym towarzyszył wzrost absorpcji w zakresie 300-400nm, przypisany tworzeniu sprzężonych układów polifenylowych, odpowiedzialnych za żółknięcie próbek polimeru. Obserwowano także wzrost absorpcji charakterystycznej dla fenolowych grup -OH (~3500 cm⁻¹) i grup karbonylowych (~1725 cm⁻¹).

Kąty zwilżania wodą badanych próbek (RYS.2) uległy znacznemu zmniejszeniu w wyniku działania plazmy (PSU_0: 84°, PSU/pl4: 36°), potwierdzając wzrost hydrofilowości modyfikowanych powierzchni.

W następnym etapie badań przeprowadzono hodowle fibroblastów i osteoblastów w obecności niemodyfikowanych filmów PSU oraz filmów PSU poddanych działaniu plazmy w ciągu jednego lub dwóch cykli. Wyniki oznaczeń żywot-



RYS. 1. Widma IR ATR filmu PSU oryginalnego i modyfikowanego plazmowo.

FIG. 1. IR ATR spectra of original and plasma modified PSU film.

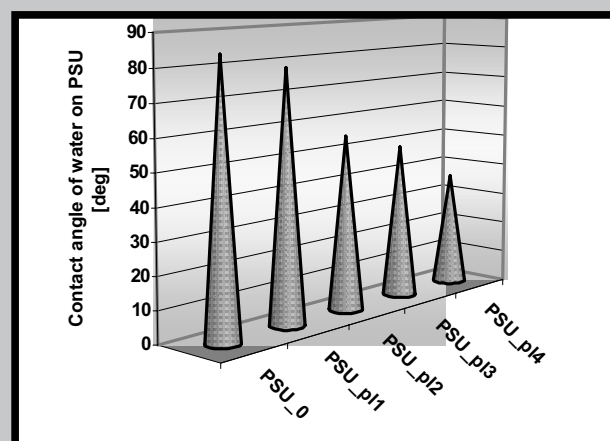
investigated and the interactions of fibroblasts and osteoblasts with polysulfone and modified polysulfone samples were monitored. Attention was paid to the adhesion of Staphylococcus epidermidis, being the important cause of nosocomial infections due to the ability to form biofilms on medical devices [3].

Materials and methods

Polysulfone (PSU) (Aldrich, Mn = 16 000); human cell lines ATCC (American Type Culture Collection): osteoblasts: hFOB 1.19, (2×10^4 cells/cm³), fibroblasts: HS-5, (2×10^4 cells/cm³), cultured in an incubator in the atmosphere of air (95%) and CO₂ (5%) at 37°C (fibroblasts) and 34°C (osteoblasts); Staphylococcus epidermidis: strains 35547 and 12228, (1.5×10^8 cfu/ml), cultured in Tryptic Soy Broth (DIFCO).

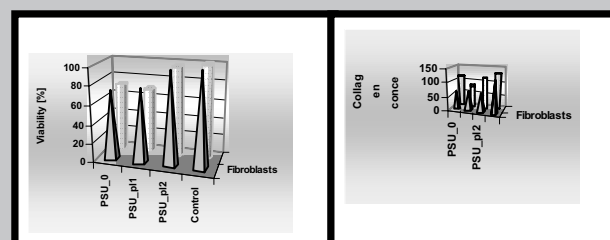
The original films (denoted as PSU_0) were subjected to plasma H₂O₂ treatment in a Sterrad 100 system (13,56 MHz, pressure: 0.07-2.0 kPa, temperature 57°C) (1-4 cycles, samples denoted as PSU_pl1 - PSU_pl4). The spectra of polymer samples were recorded with 8452A Hewlett Packard (UV-VIS), EQIUNOX 55, Bruker (FTIR), DIGILAB FTS 60 (ATR) spectro-photometers. SEM observations were performed with the use of JSM-5400 Jeol instrument (5kV and 10 kV). The sessile drop technique with SurfTens Universal OEG GmbH Germany was applied to determine contact angles of water on the investigated films. The viability of the cells was determined using MTS method and the concentration of collagen type I was evaluated by means of ELISA tests (DSLabs Inc., USA).

Results and discussion



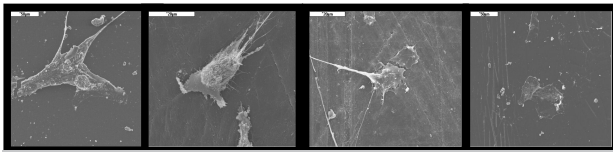
RYS. 2. Kąty zwilżania wodą.

FIG. 2. Contact angles of water.



RYS. 3. Żywotność komórek (a) i wydzielanie kolagenu (b); komórki hodowane w obecności oryginalnych i modyfikowanych plazmowo filmów polisulfonowych.

FIG. 3. The viability of the cells (a) and the secretion of collagen (b); cells cultured in the presence of original polysulfone film and plasma modified ones.



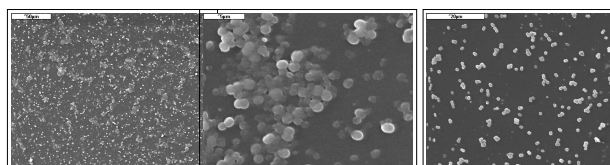
RYS. 4. Fibroblasty na filmach PSU_0 (a) oraz PSU_pl2 (b).
FIG. 4. Fibroblasts on PSU_0 (a) and PSU_pl2 (b) films.

ności komórek, przedstawione na RYS.3a, wskazują, że żywotność fibroblastów i osteoblastów hodowanych z próbkami PSU_pl1 jest porównywalna z żywotnością komórek inkubowanych z filmem PSU_0 oraz, że w wyniku działania plazmy w czasie 2 cykli żywotność wzrasta do wartości zbliżonej dla próby kontrolnej. Stopień aktywacji komórek oceniono poprzez oznaczenie stężenia kolagenu wydzielanego przez fibroblasty i osteoblasty (RYS.3b). Ilości kolagenu produkowanego przez fibroblasty są zbliżone dla filmów niemodyfikowanych oraz modyfikowanych (PSU_0, PSU_pl1 i PSU_pl2), natomiast w przypadku osteoblastów stężenie kolagenu jest obniżone w obecności filmów PSU_pl1; dla PSU_pl2 jest ono porównywalne z wartością uzyskaną dla filmów oryginalnych (PSU_0).

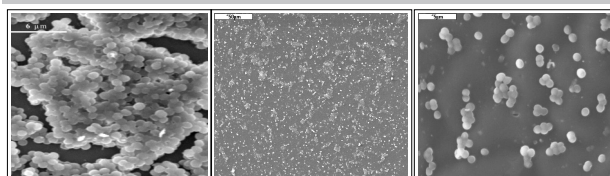
Ocena in vitro adhezji fibroblastów i osteoblastów oraz bakterii *Staphylococcus epidermidis* została dokonana w oparciu o obserwacje SEM. Próbki komórek lub bakterii nałożono na badane filmy polimerowe i inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 24 godzin. Komórki utrwalano aldehydem glutarowym, odwadniano etanolem, suszono (fibroblasty i osteoblasty: w punkcie krytycznym CO₂) i napyłano grafitem. Analiza obrazów SEM (RYS.4 i 5) wskazuje, że fibroblasty i osteoblasty dobrze przylegają do oryginalnych filmów PSU. Rozpłaszczone fibroblasty z wykształconymi filopodiami obserwowano również na filmach PSU poddanych działaniu plazmy. Osteoblasty na filmach modyfikowanych plazmowo przyjmowały kształt bardziej zwarty i kulisty.

Obrazy SEM bakterii *Staphylococcus epidermidis* utrwaloonych na filmach niemodyfikowanych i modyfikowanych przedstawiono na RYS.6 i 7.

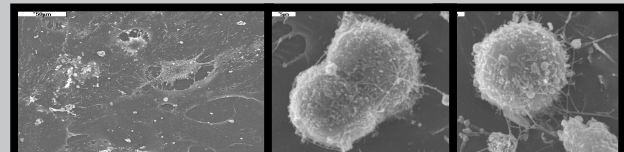
Stwierdzono, że bakterie wykazują tendencję do tworzenia agregatów (*S. epidermidis* 12228) i biofilmów (*S. epidermidis* 35547) na oryginalnych filmach PSU, podczas gdy tego typu skupiska bakteryjne nie występują na powierzchniach modyfikowanych plazmowo.



RYS. 6. Staphylococcus epidermidis 12228 na filmach polisulfonowych: (a) PSU_0, (b) PSU_p2.
FIG. 6. Staphylococcus epidermidis 12228 on polysulfone films: (a) PSU_0, (b) PSU_p2.



RYS. 7. Staphylococcus epidermidis 35547 na filmach polisulfonowych: (a) PSU_0, (b) PSU_pl1, (c) PSU_pl2.
FIG. 7. Staphylococcus epidermidis 35547 on polysulfone films: (a) PSU_0, (b) PSU_pl1, (c) PSU_pl2.



RYS. 5. Osteoblasty na filmach PSU_0 (a) and PSU_pl2 (b).
FIG. 5. Osteoblasts on PSU_0 (a) and PSU_pl2 (b) films.

Spectral analysis (UV and FTIR absorption spectra, IR ATR spectra) confirmed the degradation of polysulfone as well as the formation of carbonyl and hydroxyl groups (FIG.1). The gradual diminishing of the absorption bands with maxima at 272 nm (phenyl group), 1152 cm⁻¹ (sulfone group), 1245 cm⁻¹ (ether group) was observed. Those changes were accompanied by the growth of absorption in the range of 300-400nm, attributed to the formation of conjugated polyphenyl structures, responsible for the yellowing of the samples. The increase of the absorption, characteristic for OH - phenol type groups (~3500 cm⁻¹) and carbonyl groups (~1725 cm⁻¹) was also observed.

The contact angles of water on the investigated samples (FIG.2) considerably decreased after plasma treatment (PSU_0: 84o, PSU/pl4: 36o), confirming the increase in the hydrophilic character of the modified surfaces.

Fibroblasts and osteoblasts were then cultured in the presence of unmodified PSU films and the films subjected to 1 or 2 cycles of plasma treatment. The results of the determination of the cell viability, presented in FIG.3a, show that the viability of fibroblasts and osteoblasts cultured with PSU_pl1 samples is comparable to the PSU_0 and the two cycles of plasma treatment leads to the increase of the viability which becomes close to the control. The level of cell's activation was estimated by the determination of the amount of collagen type I secreted by osteoblasts and fibroblasts (FIG.3b). The collagen secretion by fibroblasts for original film and modified PSU_pl1 and PSU_pl2 is similar, while in the case of osteoblasts it is lowered in the presence of PSU_pl1; for PSU_pl2 it is comparable with the value characteristic of PSU_0.

In vitro evaluation of the adhesion of fibroblasts and osteoblasts as well as bacteria *Staphylococcus epidermidis* to the investigated samples was done by means of SEM observation. Samples of cells or bacteria were put on the films and incubated at 37°C for 24 h. Cells were then fixed with glutaraldehyde, dehydrated in ethanol gradient, dried (fibroblasts and osteoblasts: CO₂ critical point) and coated with graphite.

The analysis of SEM data (FIGs.4 and 5) indicates that fibroblasts and osteoblasts are well attached to the original PSU films. The flattened fibroblasts with filopodial extensions are also observed on the plasma treated PSU. By contrast, osteoblasts on plasma modified PSU displayed a more condensed rounded shape.

SEM images of *Staphylococcus epidermidis* fixed on polysulfone original films and plasma treated films are presented in FIGs.6 and 7.

It has been observed that bacteria showed a tendency to form aggregates (*S. epidermidis* 12228) and biofilms (*S. epidermidis* 35547) on original PSU films whereas such forms of bacterial colonies are not observed on plasma treated surfaces.

Conclusions

Taking into account the presented results, one can conclude that the treatment with H₂O₂ plasma changes

Wnioski

Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki badań można stwierdzić, iż działanie H_2O_2 zmienia powierzchnię polisulfonu; staje się ona bardziej hydrofilowa dzięki wprowadzeniu grup polarnych (karbonylowe, hydroksylowe). Tego typu modyfikacja prowadzi do znacznego obniżenia kąta zwilżania wodą powierzchni polimeru. Biogodność, oceniona jako żywotność fibroblastów i osteoblastów hodowanych w obecności modyfikowanych filmów, jest zadowalająca; komórki ulegają adhezji na badanych materiałach. Tworzenie biofilmów i agregatów bakteryjnych *Staphylococcus epidermidis* na materiałach poddanych działaniu plazmy jest znacznie zahamowane.

polysulfone surface making it more hydrophilic due to the introduction of polar groups containing oxygen (carbonyl, hydroxyl). This type of the modification results in the diminished contact angles of water on polymer surfaces. The biocompatibility, estimated as the viability of human fibroblasts and osteoblasts cultured in the presence of modified samples, is satisfactory; the cells adhere to the films. The formation of biofilms and aggregates of *Staphylococcus epidermidis* is strongly inhibited on H_2O_2 plasma treated PSU surfaces.

151

Piśmiennictwo

References

- [1] F. Gores, P. Montag, C. Schall, J. Vienken, S. K. Bowry, *Biomaterials* 23 (2002) 3131.
- [2] S. Savariar, G. S. Underwood, E. M. Dickinson, P. J. Schielke, A. S. Hay, *Desalination* 144 (2002) 15.
- [3] C. Vuong, M. Otto, *Microbes and infections* 4 (2002) 481.