

sowej (jak dla próbki bez warstwy anodowej), co potwierdza przerwanie warstwy tlenkowej i jej porowaty charakter na całej grubości warstwy do podłoża materiału w rejonie odkształcenia. Pogorszenie odporności korozyjnej w wyniku naruszenia spójności anodowej warstwy wierzchniej przejawia się też spadkiem potencjału korozyjnego  $E_{kor}$  w miarę wzrostu odkształcenia (dla kątów 0°, 10°, 20°, 20°x2, 30°, odpowiednio  $E_{kor}$  +492mV, 480mV, 467mV, 436mV, 388mV). Próbki nie anodowane i nie odkształcone przyjmowały ujemne wartości  $E_{kor} \approx -20$ mV (NEK).

## Wnioski

Rezultaty badań dowodzą, że śródoperacyjne kształtowanie elementów prętowych wykonanych ze stopu Ti6Al4V wpływa na znaczny wzrost parametrów chropowatości oraz zmianę charakterystyki nierówności, a w przypadku gięcia dwukrotnego (przeгинania) na pojawienie się mikropęknięć, które mogą niekorzystnie wpływać na bezpieczną eksploatację pooperacyjną. Ze wzrostem kąta gięcia zmienia się również charakterystyka warstwy. Miejsce struktury dwupoziomowej (szczelna warstwa anodowa pokryta na powierzchni warstwą porowatą) zajmuje jednopoziomowa warstwa porowata z porami (mikropęknięciami) sięgającymi podłoża (wyniki EIS). Pogarsza się odporność korozyjna przejawiająca się spadkiem potencjałów korozyjnych  $E_{kor}$ . Stopy tytanu należą do biomateriałów, które podczas przechowywania w środowisku zawierającym tlen (środowisko płynów ustrojowych) potrafią odnawiać uszkodzoną warstwę pasywną. Jak dowodzą badania [7,8] powierzchnie gięte posiadają również duże powinowactwo do pokrywania się składnikami roztworu - hydroksyapatytem. Nie wyjaśniona jednak pozostaje kwestia wpływu eksploatacyjnych obciążeń wynikających z czynności życiowych pacjenta, które często mają charakter zmęczeniowy na przebieg procesów "naprawiania" uszkodzonej śródoperacyjnie ochronnej warstwy anodowej.

Non-anodized and non-deformed samples are characterized by much lower corrosion potential values  $E_{cor} \approx -20$ mV (SCE).

## Conclusions

Shaping of implant rods made with the Ti6Al4V alloy during the intra-surgical treatment induces significant increase of roughness parameters. Characteristic two layered structure of the anodic films at bending angles bigger than 30° (and for samples doubly bent) change into the porous structure with pores reaching the surface of the substrate materials and microcracks of the anodic film. The decrease of corrosion potentials values also confirms worse protective properties of deformed surface layers. Titanium alloys are susceptible to passive layer regeneration in media, which contain oxygen (physiological solutions). Studies [7,8] give an evidence that deformed surface layers show higher susceptibility of being coated by solution components - hydroxyapatite. However, the question of the influence of external loads (freeing corrosion) on the "self-repairing" processes of anodic layers on titanium alloys is still open and studies on this issue in progress.

## Piśmiennictwo

- [1] J. Marciniak: Inżynieria biomateriałów, 1(1997), ss.13-19.
- [2] J. Marciniak, Z. Paszenda: Spondyloimpl. zaawanswanego leczenia kręgosłupa. Z. Góra 2005; ss.133-142.
- [3] Clarke E.G.C., Hickman J. J. Bone. Jt. Surg. 35-A (1953); pp. 467-471.
- [4] T. Burakowski, T. Wierchoń: Inżynieria powierzchni. Warszawa 1995.
- [5] J. Marciniak, W. Chrzanowski, J. Żak, Inżynieria Biomateriałów, 30-33 (2003); ss. 56-58.
- [6] J.R. Goldberg, J.L. Gilbert, Biomaterials, 25 (2004); pp. 851-864.
- [7] E. Krasicka-Cydzik, A. Kierzkowska. Inżynieria biomateriałów. 37 (2004); ss.53-56.
- [8] E. Krasicka-Cydzik, I. Głazowska, M. Michalski. Inżynieria Biomateriałów 38-42 (2004); ss.57-59.

## References

## 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

Polysufon (PSU) (Aldrich, Mn=16 000); ludzkie linie komórkowe ATCC (American Type Culture Collection): osteoblasts: hFOB 1.19, ( $2 \times 10^4$  komórek/cm<sup>3</sup>), fibroblasts: HS-5, ( $2 \times 10^4$  komórek/cm<sup>3</sup>), hodowane w inkubatorze w atmosferze powietrza (95%) i CO<sub>2</sub> (5%) w 37°C (fibroblasty) i 34°C (osteoblasty); Staphylococcus epidermidis: szczepy 35547 i 12228, ( $1.5 \times 10^8$  cfu/ml), hodowane w Tryptic Soy Broth (DIFCO).

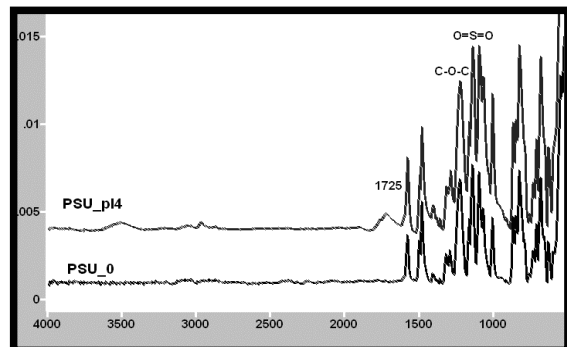
Oryginalne filmy polisulfonowe (oznaczane jako PSU\_0) poddano działaniu plazmy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w układzie Sterrad 100 (13,56 MHz, ciśnienie: 0.07-2.0 kPa, temperatura 57°C) (1-4 cykle, próbki oznaczane jako PSU\_pl1 - PSU\_pl4). Widma próbek polimerowych rejestrowano przy pomocy spektrofotometrów: 8452A Hewlett Packard (UV-VIS), EQUINOX 55, Bruker (FTIR), DIGILAB FTS 60 (ATR). Obserwacje SEM prowadzono stosując przyrząd JSM-5400 Jeol (5kV i 10 kV). Kąty zwilżania wodą badanych filmów mierzone techniką leżącej kropli przy pomocy Surftens Universal (OEG GmbH Germany). Żywołność 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 zmieszanie pasm absorpcyjnych z maksimami przy 272 nm (gupa fenylowa), 1152 cm<sup>-1</sup> (grupa sulfonowa), 1245 cm<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup>) i grup karbonylowych (~1725 cm<sup>-1</sup>).

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.

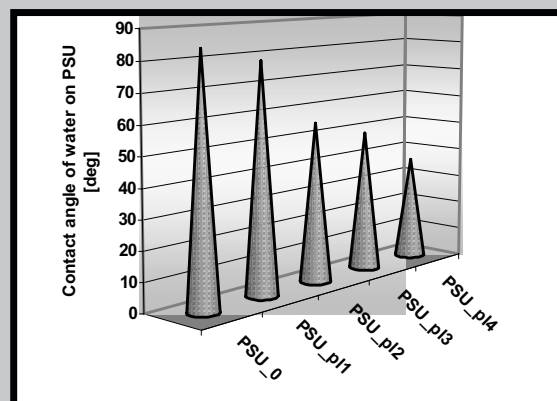
investigated and the interactions of fibroblasts and osteoblasts with polysulfone and modified polysulfone samples were monitored. Attention was paid to the adhesion of Staphylococcus epidermidis, being the important cause of nosocomial infections due to the ability to form biofilms on medical devices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

## Materials and methods

Polysulfone (PSU) (Aldrich, Mn = 16 000); human cell lines ATCC (American Type Culture Collection): osteoblasts: hFOB 1.19, ( $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>3</sup>), fibroblasts: HS-5, ( $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>3</sup>), cultured in an incubator in the atmosphere of air (95%) and CO<sub>2</sub> (5%) at 37°C (fibroblasts) and 34°C (osteoblasts); Staphylococcus epidermidis: strains 35547 and 12228, ( $1.5 \times 10^8$  cfu/ml), cultured in Tryptic Soy Broth (DIFCO).

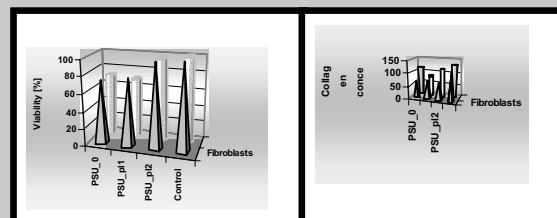
The original films (denoted as PSU\_0) were subjected to plasma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in a Sterrad 100 system (13,56 MHz, pressure: 0.07-2.0 kPa, temperature 57°C) (1-4 cycles, samples denoted as PSU\_pl1 - PSU\_pl4). The spectra of polymer samples were recorded with 8452A Hewlett Packard (UV-VIS), EQUINOX 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



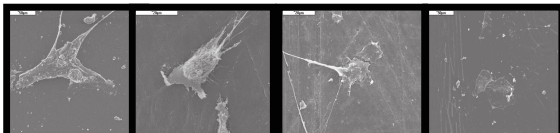
RYS. 2. Kąty zwilżania wodą.

FIG. 2. Contact angles of water.



RYS. 3. Żywołność 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.

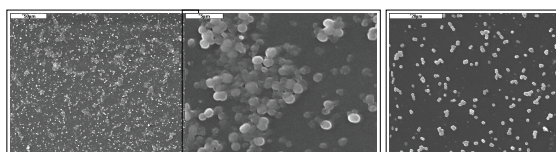


**RYS. 4. Fibroblasty na filmach PSU\_0 (a) oraz PSU\_pl2 (b).**  
**FIG. 4. Fibroblasts on PSU\_0 (a) and PSU\_pl2 (b) films.**

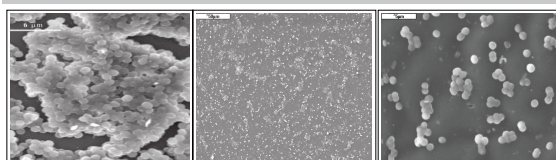
ności komórek, przedstawione na RYS.3a, wskazują, że żywotność fibroblastów i osteoblastów hodowanych z próbkami PSU\_pl1 jest porównywalna z żywotnością komórek inkubowanych z filmem PSU\_0 oraz, że w wyniku działania plazmy w czasie 2 cykli żywotność wzrasta do wartości zbliżonej dla próby kontrolnej. 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 CO<sub>2</sub>) i napyłano grafitem. Analiza obrazów SEM (RYS.4 i 5) wskazuje, że fibroblasty i osteoblasty dobrze przylegają do oryginalnych filmów PSU. Rozplaszczony 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* utrwalonych na filmach niemodyfikowanych i modyfikowanych przedstawiono na RYS.6 i 7.

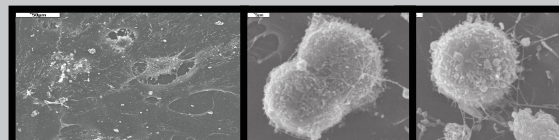
Stwierdzono, że bakterie wykazują tendencję do tworzenia agregatów (*S. epidermidis* 12228) i biofilmów (*S. epidermidis* 35547) na oryginalnych filmach PSU, podczas gdy tego typu skupiska bakteryjne nie występują na powierzchniach modyfikowanych plazmowo.



**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<sup>-1</sup> (sulfone group), 1245 cm<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup>) and carbonyl groups (~1725 cm<sup>-1</sup>) 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: CO<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. Biozgodność, 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.

## 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. Produkuje 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 należy do nich np. *Staphylococcus epidermidis* (S.E) zasiedlający skórę i błony śluzowe. S.E, nie wydziela uszkodzających tkanki 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-

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

- [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.

## References

## 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