

porów jest zbliżony do średniego rozmiaru cząsteczek porogenów.

Tak więc można stwierdzić, że otrzymane gąbki mają taką samą budowę chemiczną powierzchni i udział objętościowy porów; różnią się natomiast rozmiarem porów.

RYSUNKI 2 i 3 przedstawiają odpowiednio przeżywalność osteoblastów i produkcję kolagenu przez osteoblasty w obecności badanych gąbek w porównaniu z TCPS. Z badań wynika, że najlepszą przeżywalność i najwyższą produkcję kolagenu, porównywalną z kontrolą, uzyskano w przypadku gąbki 1 o największym rozmiarze porów, około 600  $\mu\text{m}$ . Najniższą przeżywalność i produkcję kolagenu otrzymano w przypadku gąbki 3 o porach o rozmiarze około 40  $\mu\text{m}$ . Gąbka 2 o porach około 200  $\mu\text{m}$  wykazywała pośrednie wartości przeżywalności i produkcji kolagenu przez osteoblasty. Wyniki te mogą być porównane z danymi literaturowymi dotyczącymi wpływu mikrostruktury na odbudowę kości [8], w których stwierdzono, że optymalny rozmiar porów dla regeneracji tkanki kostnej mieści się w zakresie 100-350  $\mu\text{m}$ . Badania nasze pokazują jednak, że gąbki polimerowe o większych porach są bardziej odpowiednie dla hodowli osteoblastów *in vitro*.

## Podziękowania

Autorzy dziękują Panu Prof. P.G. Rouxhet za użycie XPS i Pani Mgr B. Trybalskiej za badania SEM. Badania były finansowane z projektu KBN 'Nowe materiały i technologie dla inżynierii biomedycznej (Nr PBZ-KBN-082/T08/2002).

## Acknowledgements

The authors thank Prof. P.G. Rouxhet for the use of XPS and B. Trybalska, MSc for SEM studies. This study was supported by the research program of the Polish Committee for Scientific Research "New materials and technologies for biomedical engineering" (project PBZ-KBN-082/T08/2002).

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Hutmacher D.W., *Biomaterials* 21, 2000, 2529-2543.
- [2] Ponsoinet L., Reybier K., Jaffrezic N., Comte V., Lagneau C., Lissac M., Martelet C., *Materials Science and Engineering C* 23, 2003, 551-560.
- [3] Yang S., Leong K.-F., Du Z., and Chua C.-K., *Tissue Engineering* 7, 2001, 679-689.
- [4] Dobrzyński P., Kasperczak J., Janeczek H., Bero M., *Macromolecules*, 2001, 5090-5098.
- [5] Pamuła E., Simon S., Dobrzyński P., *Engineering of Biomaterials (Inżynieria Biomateriałów)*, 2003, submitted.
- [6] Pamuła E., Rouxhet P.G. *Carbon* 41, 2003, 1905-1915.
- [7] Pamuła E., Błażewicz M., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J., *E-MRS - Proceedings, Warsaw Fall Meeting*, 2003.
- [8] Whang K., Healy E., Elenz D.R., *Tissue Engineering* 5, 1999, 35-45.

## WPŁYW FOTOCHEMICZNEJ MODYFIKACJI POWIERZCHNI POLISULFONU NA REAKCJE KOMÓRKOWE IN VITRO

BARBARA CZAJKOWSKA\*, JOANNA KOWAL\*\*, MARTA BŁAŻEWICZ\*\*\*, MARIA PTAK\*, MAŁGORZATA BOBEK\*

\*KATEDRA IMMUNOLOGII COL.MED.U.J.

\*\*WYDZIAŁ CHEMII U.J.

\*\*\*WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Polisulfon (PSU) jest amorficznym polimerem termoplastycznym charakteryzującym się wysokimi temperaturami przemian fazowych i dużą energią wiązań między atomami w łańcuchach, co nadaje mu doskonałe własności użytkowe w szerokim zakresie temperatur. W medycynie znajduje zastosowanie zarówno do produkcji sprzętu (butelki, błony dializacyjne części aparatów oddechowych) jak i *in vivo* w postaci różnego rodzaju implantów. Powszechnie uznany jest za materiał biozgodny, łatwy do sterylizacji a także przydatny do wytwarzania materiałów kompozytowych np. z włóknami węglowymi. Powierzchnia nie modyfikowanego polisulfonu ma charakter hydrofobowy wynikający z jego budowy chemicznej. Powierzchnie takie mają zdolność silnego i nieodwracalnego wiązania różnego rodzaju białek. Z drugiej strony komórki w kontakcie z takimi materiałami

## EFFECT OF PHOTOCHEMICAL MODIFICATION OF POLYSULFONE SURFACE ON CELLULAR REACTIONS IN VITRO

BARBARA CZAJKOWSKA\*, JOANNA KOWAL\*\*, MARTA BŁAŻEWICZ\*\*\*, MARIA PTAK\*, MAŁGORZATA BOBEK\*

\*CHAIR OF IMMUNOLOGY, COLL. MED., JAGIELLONIAN UNIVERSITY,

\*\*FACULTY OF CHEMISTRY, J. U.,

\*\*\*FACULTY OF MATERIAL ENGINEERING AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Polysulfone (PSU) is an amorphous thermoplastic polymer, of high phase transition temperatures and high energy of bonding between the atoms in a chain, which makes it perfectly applicable in a wide range of temperatures. In the field of medicine it is used in both manufacture of equipment (bottles, dialysis films of respirator elements) and *in vivo* as implants of various types. It is commonly recognised as a biocompatible material, easy to sterilise, also useful in the production of composite materials with, for instance, carbon fibres. Due to its chemical composition the surface of non-modified polysulfone is hydrophobic. Such surfaces are capable of strong and irreversible bonding of various kinds of proteins. However, in contact with such materials cells have low adhesive capacity, which may un-

wykazują niską zdolność adhezji co może być niekorzystne dla zaadoptowania się implantu z hydrofobową powierzchnią w żywym organizmie. W warunkach in vivo problem wzajemnych oddziaływań komplikuje się, ponieważ zastosowany materiał najczęściej najpierw kontaktuje się z endogennymi białkami znajdującymi się w różnych płynach ustrojowych a dopiero potem z komórkami. W efekcie oddziaływanie między materiałem a komórkami zachodzi poprzez białka zaadsorbowane na powierzchni materiału. Proces taki wymaga pewnego czasu, podczas którego komórki rozpoznają samą powierzchnię materiału a białka ustrojowe współzawodniczą o powierzchnię do zaadsorbowania. W naszej pracy badaliśmy jak reagują in vitro wybrane rodzaje komórek na subtelne zmiany charakteru powierzchni polisulfonu, związane z pojawianiem się grup karboksylowych i fenolowych powstałych na skutek naświetlania promieniowaniem U.V

Prowadziliśmy hodowle 7 i 14 dniowe, zakładając że w pierwszych dniach komórki kontaktują się z materiałem a potem ustala się stan równowagi pomiędzy zaadsorbowanymi białkami i komórkami. Oddziaływanie komórek z powierzchnią polisulfonu (PSU) i polisulfonu naświetlanego (PSUN) oceniano na podstawie żywotności makrofagów, fibroblastów i osteoblastów. Stopień aktywacji komórek oceniano poprzez oznaczenie ilości wydzielanego przez fibroblasty i osteoblasty kolagenu I, IL-6 przez fibroblasty i osteokalcyny przez osteoblasty.

## Materiał i metody

Folie polisulfonowe uzyskiwano przez rozpuszczenie 0,2g PSU (Aldrich Chemical Comp. Inc.) w 10cm<sup>3</sup> dichlormetanu, wylanie na płytkę szklaną o wymiarach 10x10cm i następnie wysuszenie. Z wysuszonej folii wycinano krążki o średnicy 20 mm.

Naświetlanie folii - krążki z folii PSU naświetlano promieniowaniem o długości  $\lambda=254$  nm lampą rtęciową średniociśnieniową ASH-400 przez kolejne okresy 3h, 5h, 10h.

Jałowienie materiałów - krążki folii PSU jałowiono pod lampą U.V po 3min z każdej strony. Stosowano lampę o następujących parametrach:

$\lambda=254$  nm moc 1,896 mW/cm<sup>2</sup>

$\lambda=312$  nm moc 0,065 mW/cm<sup>2</sup>

$\lambda=365$  nm moc 0,019 mW/cm<sup>2</sup>

Komórki

ludzka linia osteoblastyczna hFOB 1.19

ludzka linia fibroblastyczna HS-5

ludzka linia makrofagowa KMA

Hodowle komórkowe - prowadzono w 12 - dołkowych płytkach hodowlanych, w których na dnie umieszczano badane folie i dodawano zawiesinę komórek w odpowiednim medium hodowlanym. Hodowle prowadzono w inkubatorze w atmosferze 5%CO<sub>2</sub>/95% powietrza w temperaturze 37°C (makrofagi i fibroblasty) lub 34°C (osteoblasty) przez 7 i 14 dni.

Żywotność komórek - oznaczano zaadoptowaną do potrzeb oznaczania metodą wykorzystującą metabolizm barwika MTT w mitochondriach żywych komórek. Oznaczenia wykonywano po 7 i 14 dniach hodowli.

Oznaczenie stężenia kolagenu typ I, IL-6 i osteokalcyny - wykonano przy użyciu testów ELISA

## Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczenia żywotności makrofagów fibroblastów i osteoblastów na foliach PSU przedstawiono na RYSUNKACH 1,2, i 3.

*favourably affect implant adaptation to the hydrophobic surface in a living organism. In vivo the problem of the interaction gets complicated because the material applied first gets in contact with endogenous proteins present in different body fluids, next with the cells. Consequently the interaction between the material and the cells takes place via the proteins adsorbed on the material surface. Such process requires certain time in which the cells recognise the material surface itself, and the organism's proteins compete for the surface to be adsorbed. In our research we tested how certain types of cells react in vitro to subtle changes of polysulfone surface, changes caused by the occurrence of carboxyl and phenol groups formed due to UV irradiation. We have run seven and fourteen-day cultures, assuming that in the first days the cells contact the materials first and next an equilibrium state between the adsorbed proteins and cells settles. The effect of the cells with polysulfone (PSU) and irradiated polysulfone (PSUN) surfaces was evaluated on the basis of the vitality of macrophages, fibroblasts and osteoblasts. The level of cells activation was estimated by the determination of the amount of collagen type I secreted by fibroblasts and osteoblasts, IL-6 by fibroblasts and osteocalcine by osteoblasts.*

## Material and methods

Polysulfone foils were obtained by the dissolution of 0.2g PSU (Aldrich Chemical Comp. Inc.) in 10 cm<sup>3</sup> of dichloromethane, pouring it on a glass plate 10x10 cm in size followed by drying. From the dried foil discs 20 mm in diameter were cut out.

Foil irradiation - the PSU foil discs were exposed to radiation of  $\lambda = 254$  nm length by a mean pressure mercury discharge lamp ASH-400 over the subsequent periods of 3 h, 5 h and 10 h.

Material sterilisation - the PSU foil discs were sterilised under a UV lamp 3 min each side. The parameters of the lamp were:

$\lambda=254$  nm power 1,896 mW/cm<sup>2</sup>

$\lambda=312$  nm power 0,065 mW/cm<sup>2</sup>

$\lambda=365$  nm power 0,019 mW/cm<sup>2</sup>

Cells

human osteoblastic line hFOB 1.19

human fibroblastic line HS-5

human macrophagous line KMA

Cell cultures - were run in 12-well plates at the bottom of which the tested foils were placed and the suspension of cells in an adequate culture medium was added. The cultures were run in an incubator in the atmosphere of 5%CO<sub>2</sub>/95% air at the temperature of 37°C (macrophages and fibroblasts) or 34°C (osteoblasts) over seven and fourteen days.

Cell viability - was determined by a method, adapted for the present research, in which the metabolism of a dye MTT in living cells mitochondria is used. The determination was done after seven and fourteen days of culture.

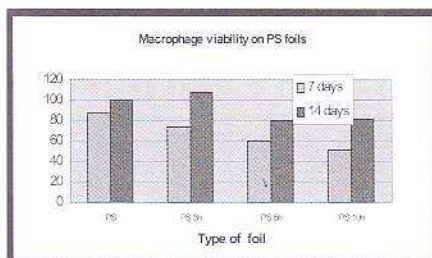
Determination of concentration of collagen I, IL-6 and osteocalcine - was performed by means of ELISA tests.

## Results and discussion

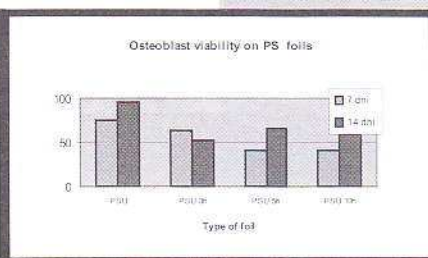
The results of determination of macrophage, fibroblast and osteoblast viability on PSU foils have been presented in FIGURES 1, 2 and 3.

Po 7 dniach hodowli żywotność wszystkich rodzajów badanych komórek maleje wraz ze wzrostem czasu naświetlania folii. Po 14 dniach hodowli żywotność wszystkich komórek jest wyższa niż po 7 dniach, nie stwierdza się też wyraźnych różnic w żywotności komórek w zależności od

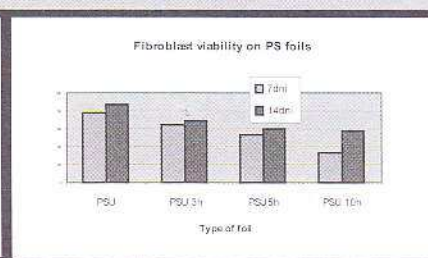
After seven-day culture the viability of all the types of tested cells decreases with the increase of foil irradiation time. After fourteen-day culture the viability of all the cells is higher than after seven days and no significant differences in cell viability dependent on PSU foil exposure are found.



RYS. 1.  
FIG. 1.



RYS. 2.  
FIG. 2.



RYS. 3.  
FIG. 3.

czasu naświetlania folii PSU. Wynik ten wskazuje na to, że modyfikacja powierzchni PSU związana z tworzeniem grup karboksylowych i fenolowych nie sprzyja żywotności makrofagów, fibroblastów i osteoblastów. Trudno na tym etapie badań stwierdzić czy związane jest to z bezpośrednim oddziaływaniem komórek z powierzchnią PSU czy też z faktem obniżonej adsorpcji białek na powierzchniach naświetlonych czyli hydrofilowych. Zwiększona żywotności po 14 dniach nie wnosi już informacji na temat bezpośredniego oddziaływania komórek z badanym materiałem, ponieważ po tym czasie folie pokryte są warstwą zaadsorbowanych białek i z adherowanych komórek maskujących powierzchnię materiału. Należy jednak pamiętać że w warunkach in vivo takie sytuacje mogą polepszać biogodność stosowanych materiałów.

Fibroblasty i osteoblasty mają zdolność wytwarzania kolagenu typ I i wydzielania go do środowiska hodowlanego. Oznaczano stężenie kolagenu w supernatantach z siedmiodniowych hodowli na foliach PSU i foliach naświetlanych 5h promieniowaniem U.V. (PSUN) Wyniki (RYS.4) przedstawiono jako % ilości kolagenu wyprodukowanego przez komórki hodowane na PSU i PSUN w odniesieniu do komórek kontrolnych.

W TABELI 1 i 2 przedstawiono wyniki produkcji kolagenu w porównaniu z żywotnością produkujących go komórek.

Material	Żywotność	Kolagen
Material	Vitality	Collagen
	[%]	[%]
PSU	76	90
PSUN	63	57

TABELA 2. Zależność między żywotnością osteoblastów a wyprodukowanym kolagenem po 7 dniach hodowli na PSU i PSUN.

TABLE 2. Dependence between osteoblast vitality and collagen production after seven-day PSU and PSUN culture.

Jak widać, nie naświetlane folie PSU wzmagają syntezę kolagenu typ I w fibroblastach i osteoblastach, natomiast folie naświetlane tracą tę zdolność i żywe komórki produkują kolagen w takiej samej ilości jak komórki kontrolne. Podobne wyniki uzyskano dla IL-6. (RYS.5.i TABELA 3)

Osteocalcyna jest markerem osteoblastów o wysokiej swoistości. Chociaż jest najistotniejszym białkiem niekolagenowym w macierzy kości jej funkcjonalna rola nie jest w

This result points to the fact that PSU surface modification due to carboxyl and phenol groups formation is not conducive to the viability of macrophages, fibroblasts and osteoblasts. At this stage of research it is difficult to state whether it is connected with the direct interaction of cells and PSU surface or with the reduced adsorption of proteins on the exposed or hydrophilic surfaces. The increased viability after fourteen days does not give information on the direct interaction of the cells and the tested material because after this period of time the foils are covered with a layer of adsorbed proteins and adherent cells masking the material surface. However, it should be remembered that in vivo such conditions may improve the biocompatibility of the materials used.

Fibroblasts and osteoblasts have the capacity to produce collagen I and secrete it to the culture environment. Collagen concentration was determined in the supernatant liquids from above the seven-day cultures on PSU foils and foils exposed to 5 h UV radiation (PSUN). The results (Fig. 4) have been presented as percentage of collagen produced by PSU and PSUN culture cells referred to reference cells.

TABLES 1 and 2 present the results of collagen production compared with the vitality of cells producing it.

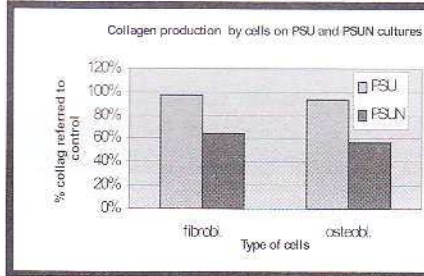
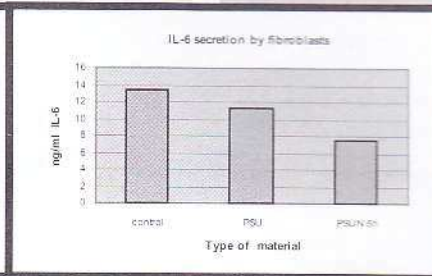
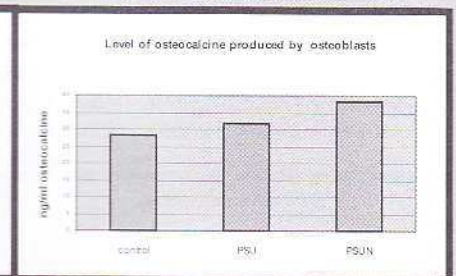
Material	Żywotność	Kolagen
Material	Vitality	Collagen
	[%]	[%]
PSU	78	97
PSUN	65	65

TABELA 1. Zależność między żywotnością fibroblastów a wyprodukowanym kolagenem po 7 dniach hodowli na PSU i PSUN.

TABLE 1. Dependence between fibroblast vitality and collagen production after seven-day PSU and PSUN culture.

As can be seen, the non-exposed PSU foils increase the synthesis of collagen type I in fibroblasts and osteoblasts, while the exposed foils lose this capacity and the living cells produce the same amount of collagen as the control cells. Similar results have been obtained for IL-6 (FIG. 5 and TABLE 3).

Osteocalcine is a marker of osteoblasts of high specificity. Although it is the essential non-collagen protein in bone matrix, its functional role is not quite clear. Besides its contribution in osteogenesis, it has also been proved to partici-

RYS. 4.  
FIG. 4.RYS. 5.  
FIG. 5.RYS. 6.  
FIG. 6.

pełni jasna. Oprócz udziału w kościotworzeniu istnieją dowody na jej rolę w resorpcji kości, polegającą na chemotaktycznym działaniu na prekursorzy osteoklastów. Stosowane w naszych badaniach osteoblasty (hFOB1,19..) wytwarzają różne ilości osteokalcyny w zależności od materiału na którym są hodowane. (RYS.6)

Biorąc pod uwagę że żywotność osteoblastów na PSU wynosi 76% a na PSUN 42%, uzyskane wyniki wskazują na wzmoczoną syntezę osteokalcyny pod wpływem folii PSU a szczególnie folii PSUN. Wynik ten jest trudny do zinterpretowania, ponieważ w prowadzonych badaniach brak jest naturalnego odbiorcy osteokalcyny jakim jest w warunkach in vivo, hydroksyapatyt, wskazuje jednak że osteoblasty odmiennie reagują na naświetloną i nie naświetloną powierzchnię polisulfonu.

Przeprowadzone badania wykazały, że komórki linii makrofagowej, fibroblastycznej i osteoblastycznej rozróżniają hydrofobową i hydrofilową powierzchnię polisulfonu.

Na powierzchni hydrofobowej żywotność komórek jest wyższa, powierzchnia ta również indukuje wzmoczoną produkcję kolagenu. Naświetlana, hydrofilowa powierzchnia obniża żywotność komórek, nie wpływa na syntezę kolagenu i indukuje wzmoczoną syntezę osteokalcyny. Fotochemiczna modyfikacja powierzchni polisulfonu zmienia charakter powierzchni z hydrofobowej na hydrofilową i powoduje istotne zmiany w zachowaniu komórek, co można wykorzystać przy projektowaniu materiałów do różnych zastosowań.

Material	Żywotność Vitality I [%]	IL-6 P[%]
PSU	78	84
PSUN	54	55

TABELA 3. Zależność między żywotnością fibroblastów a produkcją IL-6.

TABLE 3. Dependence between fibroblast vitality and IL-6 production.

pate in bone resorption by chemotactic effect on osteoklast precursors. The osteoblasts used in our tests (hFOB1, 19) produce different quantities of osteocalcine depending on the culture material (FIG.6).

Considering the fact that the osteoblast viability on PSU is 76% and on PSUN 42%, the obtained results point to the intensified synthesis of osteocalcine due to PSU foil effect, and PSUN foil in particular. The result is difficult to interpret because in the presented research there is no natural receiver of osteocalcine, which in vivo is hydroxyapatite. However, it shows that osteoblasts react differently to the exposed and non-exposed surface of polysulfone.

The tests have proved that the cells of macrophagous, fibroblastic and osteoblastic lines differentiate the hydrophobic and hydrophilic surfaces of polysulfone. Cell viability is higher on the hydrophobic surface, which also induces intensified production of collagen. An exposed hydrophilic surface decreases cell viability, does not affect collagen synthesis and induces intensified synthesis of osteocalcine. Photochemical modification of polysulfone surface changes the surface from hydrophobic into hydrophilic and causes significant changes in cell behaviour, which can be used in material design for a wide range of applications.