

ZASTOSOWANIE METODY FT-IRM W BADANIACH ADSORPCJI MUCYNY NA POWIERZCHNI WYBRANYCH BIOMATERIAŁÓW

JOANNA MYSTKOWSKA^{1*}, JOANNA KOLMAS², JAN R. DĄBROWSKI¹

¹ POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA,
ZAKŁAD INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I BIOMEDYCZNEJ,
UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK

² WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

* E-MAIL: J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań adsorpcji mucyny zwierzęcej na powierzchni wybranych biomateriałów. Przebadano po dwie próbki każdego z materiałów, których powierzchnie różniły się chropowatością. Badania przeprowadzono za pomocą mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IRM). Wyniki badań wskazują na adsorpcję mucyny do wszystkich testowanych materiałów. Zaobserwowano wpływ rodzaju biomateriału na intensywność adsorpcji testowanej proteiny do jego powierzchni.

Słowa kluczowe: mucyna, mikrospektroskopia w podczerwieni FT-IRM, adsorpcja, ślina, biomateriały

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 85-88]

Wprowadzenie

Na powierzchni biomateriałów kontaktujących się ze środowiskiem płynów ustrojowych człowieka tworzy się cienka warstewka, zwana biofilmem [1]. Składa się ona ze związków organicznych, nieorganicznych i całego szeregu szczepów bakteryjnych zasiedlających warstewki proteinowe [2]. W zależności od typu płynu, mamy do czynienia z różnymi proteinami. W skład śliny ludzkiej wchodzi glikoproteiny (mucyny MG1 i MG2), odpowiedzialne głównie za jej właściwości lepkościowe [3].

Dostępne na rynku preparaty sztucznej śliny [4] również zawierają mucyny (roślinne i zwierzęce). Brakuje jednak doniesień literaturowych ma temat intensywności adsorpcji mucyn do powierzchni różnego rodzaju biomateriałów. Stąd w niniejszej pracy podjęto się tego zagadnienia. Do badań zastosowano metodę spektroskopii oscylacyjnej [5]. Mikrospektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IRM) pozwala na badanie bardzo małych, często niejednorodnych obiektów (tkanek biologicznych, komórek, a także chemicznych i mikrobiologicznych powłok biomateriałów) dostarczając informacji na temat ich składu chemicznego [6,7]. Technika FT-IRM może być użyta w trybie transmisyjnym lub odbiciowym (tryb odbiciowy to najczęściej odbicie zwierciadlane lub technika osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni ATR) [6]. Technika ATR okazała się bardzo skuteczna w analizie składu i struktury chemicznej różnego rodzaju cienkich warstw, w szczególności biofilmów. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć prace dotyczące wykorzystania ATR do monitorowania tworzenia się biofilmu oraz śledzenia chemicznych zmian w nim zachodzących [8]. Technika odbicia zwierciadlanego jest także odpowiednia do badania cienkich warstw i filmów, szczególnie tworzących się na powierzchniach nieprzezroczystych dla promieniowania podczerwonego.

THE APPLICATION OF FT-IRM TECHNIQUE IN RESEARCH OF MUCIN ADSORPTION ON SELECTED BIOMATERIALS SURFACE

JOANNA MYSTKOWSKA^{1*}, JOANNA KOLMAS², JAN R. DĄBROWSKI¹

¹ BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY,
DIVISION OF MATERIAL AND BIOMEDICAL ENGINEERING,
WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK, POLAND

² MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,
BANACHA 1, 02-097 WARSAW, POLAND

* E-MAIL: J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

Abstract

This work presents results of research of animal mucin adsorption on the surface of selected biomaterials. Two samples of each material with different surface roughness were investigated. The tests were performed using Fourier-transform infrared microspectroscopy (FT-IRM). The results indicate that mucin adsorb to all tested materials surface. The influence of biomaterial type on protein adsorption intensity to material surface was observed.

Keywords: mucin, infrared microspectroscopy FT-IRM, adsorption, saliva, biomaterials

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 85-88]

Introduction

At biomaterial's surface that directly contact with human body fluid, the thin layer – called biofilm is formed [1]. This layer is composed of organic and inorganic compounds and bacterial strains, which incorporate in protein layers [2]. In relation to fluid type, there occur different proteins. In human saliva there are present glycoproteins (mucins: MG1 and MG2), which are responsible for its viscosity properties [3].

Commercial synthetic saliva substitutes [4] also contain mucins (plant and animal). There is a deficiency of literature data concerned with intensity of mucin adsorption to different biomaterials surfaces. Thus, in this work the problem is considered. The vibrational spectroscopy has been used [5]. Fourier-transform infrared microspectroscopy (FT-IRM) allows to examine very small compartments and provides information on the molecular components in discrete, heterogeneous regions of analysed materials (i.e. biological tissues, cells, chemical and microbiological coatings of biomaterials) [6,7]. The FT-IRM technique can be used in transmission and reflection mode (i.e. specular reflectance or attenuated total reflection ATR) [6]. ATR/FT-IR microspectroscopy has demonstrated efficacy in chemical structure and composition analysis of thin layers, especially of biofilms. This technique can be used to monitor biofilm formation and to evaluate changes during biofilm development [8]. FT-IRM technique in specular reflection mode is also suited to study thin layers and films on IR non-transparent surfaces.

Dzięki sprzężeniu mikroskopu IR z mikroskopem na światło widzialne jest możliwy wybór konkretnego miejsca, a także wielkości obszaru, z którego zbiera się widmo IR. Pomiar techniką zwierciadlanego odbicia są ograniczone tylko do mało chropowatych materiałów [7].

W pracy wykorzystano metodę zwierciadlanego odbicia promieniowania IR w badaniu adsorpcji mucyn i tworzenia cienkiego filmu na powierzchni różnego typu materiałów.

Materiały i metody

Do badań wykorzystano handlową sproszkowaną mucynę, wyselekcjonowaną ze zwierzęcego żołądka (mucin, M1778, Sigma-Aldrich). Zastosowana mucyna wchodzi w skład kilku preparatów sztucznej śliny dostępnych na rynku. Przygotowano roztwór mucyny o stężeniu 0,5% wag. w redestylowanej wodzie. W roztworze zanurzone handlowe próbki materiałów o różnym: składzie chemicznym i chropowatości Ra. Do badań zastosowano: stal ferrytyczno - perlityczną 45 (stal I) - chropowatość: 4,2 μm i 2 μm , stal implantacyjną 316L (stal II) – 2 μm i 1 μm , komercyjny kompozyt stomatologiczny - 2 μm i 1 μm i fosforanowo-cynkowy cement kostny - 2 μm i 1 μm . Testowane powierzchnie zanurzone w roztworze mucyny na różne okresy czasu (5 min., 15 min., 30 min.; 1 h, 2 h, 4 h, 6 h; 1 dzień, 4 dni i 7 dni). Próbki przetrzymywano w temperaturze 37°C. Po upływie zadanego czasu kontaktu, próbki wyjęto z roztworu, oplukano wodą redestylowaną, osuszono suchym powietrzem i oceniano adsorpcję proteiny do materiału.

Intensywność adhezji mucyny do testowanych powierzchni badano przy zastosowaniu metody spektroskopii w średniej podczerwieni. W tym celu zastosowano mikroskop IR (Autolmage IR, Perkin Elmer) sprzężony ze spektrometrem IR (Spectrum 1000, Perkin Elmer). Mikroskop był wyposażony w konwencjonalny detektor MCT, chłodzony ciekłym azotem, pracujący w dolnym zakresie częstotliwości do 700 cm^{-1} . Widma IR powierzchni zostały wykonane w trybie odbiciowym (technika odbicia zwierciadlanego) z kwadratowych pikseli 50 x 50 μm^2 . Rozdzielczość spektralna wynosiła 1 cm^{-1} , liczba skanów: 500. Jako wzorca do zebrania widma tła wykorzystano czyste powierzchnie materiałów. Wykonano po 6 widm z różnych miejsc dla każdej próbki i następnie otrzymane wyniki poddano obróbce w programie GRAMS/AI 8.0 (Thermo Scientific).

Wyniki i dyskusja

Jednym z założeń tej pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania mikrospektroskopii w średniej podczerwieni do detekcji mucyny w formie cienkiego filmu. W tym celu zebrano widma FTIR z powierzchni różnych materiałów zanurzanych w roztworze mucyny (o stężeniu 0,5% wag). Przykładowe widmo filmu wykonane techniką odbicia zwierciadlanego pokazuje RYS. 1. Szerokie pasmo 3700-2400 cm^{-1} jest złożone. Pochodzi zarówno od grup N-H białek (amid A oraz amid B) jak i od drgań wody. Pasma przy ok. 2955 cm^{-1} oraz 2917 cm^{-1} odpowiadają drganiom asymetrycznym i symetrycznym odpowiednio grup $-\text{CH}_3$ oraz $>\text{CH}_2$ (TABELA 1). W obszarze 1800-800 cm^{-1} dominują pasma amidowe I oraz II (1637 cm^{-1} oraz 1547 cm^{-1}). W zakresie 1800-800 cm^{-1} obecne są pasma świadczące zarówno o obecności białka, jak i węglowodanów.

Wszystkie otrzymane widma dla testowanej mucyny odpowiadają danym literaturowym [9, 10] i zgodne są z widmem sproszkowanej mucyny wykonanym techniką transmisyjną (dane nie przedstawione w pracy). Dlatego też można stwierdzić, że na każdej badanej powierzchni obecna jest mucyna z roztworu w postaci cienkiego filmu wykrywalnego techniką mikrospektroskopii IR.

Thanks to an advantageous IR and light microscopy coupling, the selection of discrete area or larger fragment of studied surface is always possible. However, the measurements are limited by roughness of analysed surface [7].

In this work, we used infrared microspectroscopy in the specular reflection mode to analyse mucin adsorption and film's formation on different types of surface.

Materials and Methods

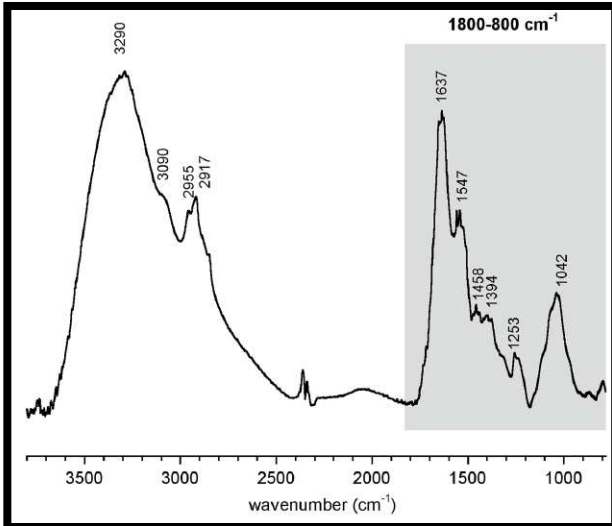
In this work, the commercial powder mucin from porcine stomach (M1778, Sigma-Aldrich) was used. This mucin is a component of some synthetic saliva preparations available on the market. Mucin's solution with concentration of 0.5 wt% in double distilled water was prepared. The samples of commercial materials with different chemical composition and surface roughness Ra were examined. Tested materials were: ferrite-pearlite steel 45 (steel I) - roughness: 4.2 μm and 2 μm , implantation steel 316L (steel II) – 2 μm and 1 μm , commercial dental composite - 2 μm and 1 μm and phosphate-zinc bone cement - 2 μm and 1 μm . All samples were placed into solution of mucin for different time periods (5 min., 15 min., 30 min.; 1 h, 2 h, 4 h, 6 h; 1 day, 4 days and 7 days) and stored at temperature 37°C. After the immersion time the samples were taken out from solution, then rinsed in double distilled water, dried in air and the mucin adsorption to material was tested.

The studied samples were examined by Fourier transform mid-infrared spectroscopy using a Autolmage IR microscope (Perkin Elmer) coupled to a Spectrum 1000 spectrometer (Perkin Elmer). The microscope was equipped with a conventional MCT detector with the low frequency cut-off at 700 cm^{-1} . The mid-IR surface spectra were recorded in the reflection mode (specular reflectance) from square pixels 50 x 50 μm^2 , with 1 cm^{-1} spectral resolution, using 500 scans. The untreated materials, before immersing in the mucin's solution, were used for recording background spectra. All spectra were collected from 6 different sites and then processed with the GRAMS/AI 8.0 software (Thermo Scientific).

Results

The first aim of our work was to evaluate the potential using of the mid-infrared microspectroscopy in mucin film detection. In order to achieve that goal, the spectra were recorded from the different surfaces soaked in the mucin's solution. An average spectrum of the analyzed films, recorded in the specular reflection mode, is presented in FIG. 1. The broad 3700-2400 cm^{-1} band is complex. It originates from proteins (amide A and B) and from water. The bands at ca. 2955 cm^{-1} and 2917 cm^{-1} are from $-\text{CH}_3$ and $>\text{CH}_2$ asymmetric stretch, respectively. In the 1800-800 cm^{-1} region, the amide I and amide II bands at ca. 1637 and 1547 cm^{-1} are prominent. Spectral region 1800-800 cm^{-1} contains the bands originating both from proteins and carbohydrates (TABLE 1).

All collected spectra (from all the surfaces studied in this work) are in accordance with literature data [9, 10] as well as with the transmission spectrum obtained from powdered mucin (data not shown). Therefore, the conclusion could be made that the residues of mucin solution are present at all the surfaces and form thin films detectable by FTIR.

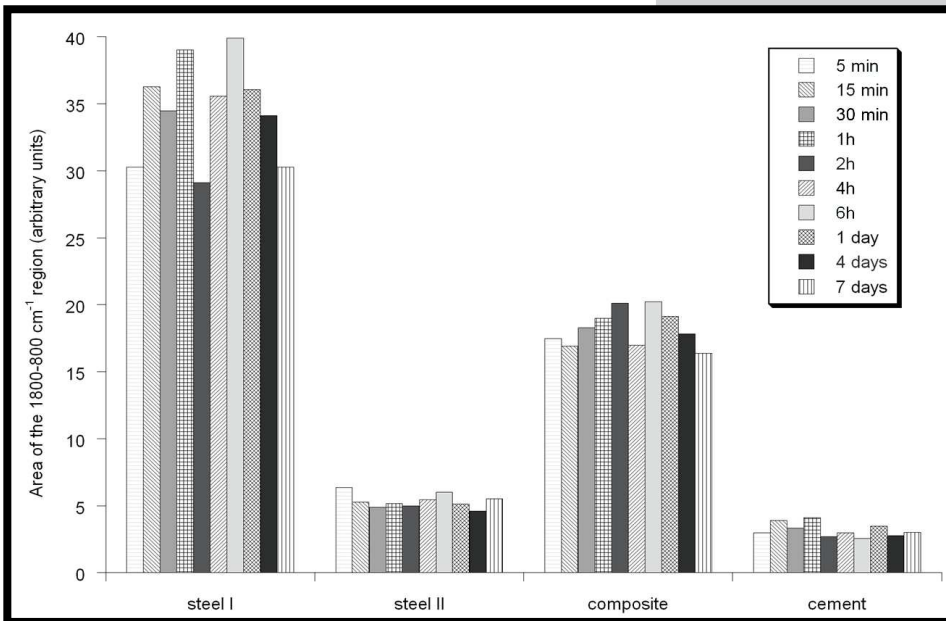


RYS. 1. Widmo mucyny na przykładowej powierzchni biomateriału.
FIG. 1. Spectra of mucin at example biomaterial's surface.

TABELA 1. Położenie i interpretacja pasm w widmie mucyny.

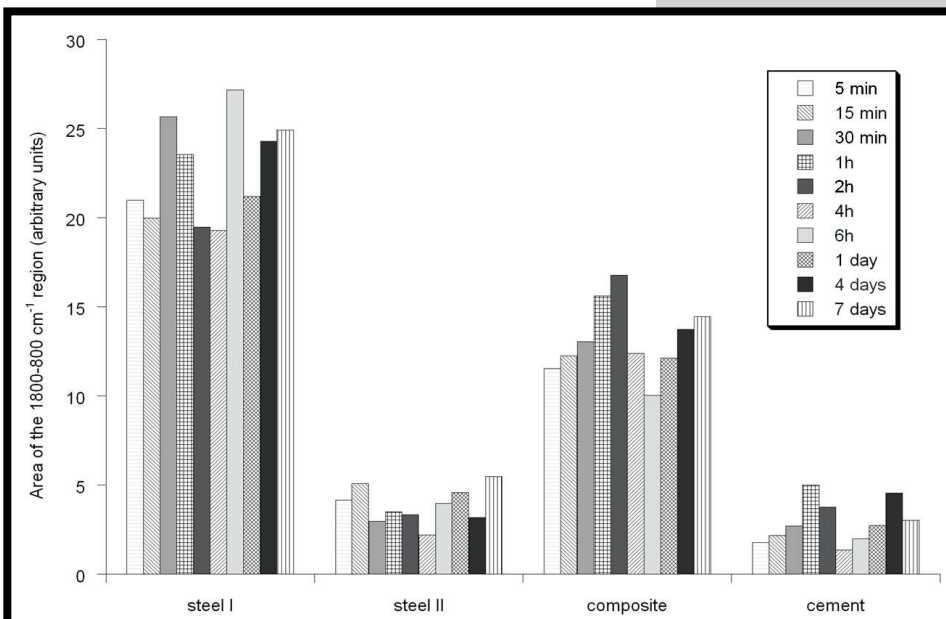
TABLE 1. Band positions and assignments for mucin film.

Pasmo / Band (cm ⁻¹)	Przypisanie / Assignment	Komentarz / Comments
3290	N-H	amid A, woda / amide A and water
3090	N-H	amid B / amide B
2955	C-H	-CH ₃ , asymetryczne rozciągające / -CH ₃ , asymmetric stretch
2917	C-H	>CH ₂ , symetryczne rozciągające / >CH ₂ , symmetric stretch
1637	C=O	amidowe I / carbonyl, stretch, amide I
1547	N-H	amidowe II / amide II, N-H deformation
1458	C-H	>CH ₂ , deformacyjne / >CH ₂ , deformation
1394	C-O	-COO- symetryczne rozciągające / -COO- symmetric stretch
1253	N-H	amidowe III / amide III
1042	C-C-O	pierścień piranozowy, węglowodany / pyranose ring, carbohydrate



RYS. 2. Pola powierzchni - adsorpcja mucyny na powierzchni materiałów o chropowatościach: stal I – 2 μm, stal II – 1 μm, kompozyt – 1 μm, cement – 1 μm.

FIG. 2. Area regions – adsorption of the mucin at material's surface with roughness: steel I – 2 μm, steel II – 1 μm, composite – 1 μm, cement – 1 μm.



RYS. 3. Pola powierzchni - adsorpcja mucyny na powierzchni materiałów o chropowatościach: stal I – 4,2 μm, stal II – 2 μm, kompozyt – 2 μm, cement – 2 μm.

FIG. 3. Area regions – adsorption of the mucin at material's surface with roughness: steel I – 4.2 μm, steel II – 2 μm, composite – 2 μm, cement – 2 μm.

Kolejnym etapem pracy było zbadanie intensywności adsorpcji mucyny w różnym czasie jej kontaktu z powierzchnią badanych materiałów, dodatkowo różniących się chropowatością. Wykonano widma FTIR, a następnie zmierzono pola powierzchni pasm w zakresie $1800-800\text{ cm}^{-1}$. Wyniki pola powierzchni dla materiałów mniej chropowatych przedstawiono na RYS. 2, a dla bardziej chropowatych na RYS. 3.

Z uzyskanych wyników badań widać, że czas kontaktu roztworu mucyny z biomateriałami nie miał większego wpływu na intensywność jej adsorpcji do ich powierzchni. Zaobserwowano jednakże, że intensywność adsorpcji mucyny zależała od rodzaju materiału. Najwyższą intensywność adsorpcji zanotowano w przypadku stali ferrytyczno-perlitycznej. Wartość analizowanego parametru malała w kolejności: stal ferrytyczno-perlityczna 45 (stal I) > kompozyt stomatologiczny > stal implantacyjna 316L (stal II) > fosforanowo-cynkowy cement kostny. Stąd wniosek, że w przypadku stali intensywność adsorpcji zależy od jej składu fazowego. Stwierdzono również pewne zróżnicowanie w adsorpcji mucyn na powierzchniach o różnych chropowatościach. Zaobserwowano większą intensywność adsorpcji na powierzchni mniej chropowatej w porównaniu do powierzchni bardziej chropowatej. Zjawiska te wydają się być interesujące, jednak ich analiza wykracza poza zakres tego artykułu. Temat będzie rozwijany w przyszłych badaniach naukowych.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Badania przy wykorzystaniu metody mikrospektroskopii w średniej podczerwieni pozwoliły na zidentyfikowanie obecności warstewki mucyny na powierzchniach wszystkich testowanych biomateriałów.

2. Intensywność adsorpcji mucyny na powierzchni zależała od rodzaju biomateriału i była najwyższa dla stali ferrytyczno-perlitycznej.

3. Nie zaobserwowano wpływu czasu kontaktu biomateriałów z roztworem mucyny na intensywność adsorpcji mucyny do ich powierzchni.

Podziękowania

Praca naukowa sfinansowana ze środków na naukę w latach 2010-2013 jako projekt badawczy numer N N507 592938.

Piśmiennictwo

- [1] Bryers J.D.: Medical Biofilms, Biotechn and Bioeng, 2008, Vol. 100, No.1, May 1, 1-18.
- [2] Blankenship J.R., Mitchell A.P.: How to build a biofilm: a fungal perspective, Current Opinion in Microbiol, 2006, 9:588-594.
- [3] Pol J., Buczkowska-Radlińska J., Bończak-Kuleta A., Trusewicz M.: Mucyny śliny ludzkiej- ich rola i znaczenie, Annales Acad Med Stetinensis, Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, 2007, 53, 2, 87-91.
- [4] Park M.S., Chung J.W., Kim Y.K., Chung S.C., Kho H.S.: Viscosity and wettability of animal mucin solutions and human saliva, Oral Diseases, 2007, 13, 181-186.
- [5] Olsztyńska-Janus S., Szymborska K., Komorowska M., Lipiński J., Usefulness of spectroscopy for biomedical engineering, Acta Bioeng Biomech, 10, 2008, 45-49.
- [6] Humecki H.J.(ed.), Practical Guide to infrared microspectroscopy, Marcel Dekker, New York, 1995.

The next step of work was the analyzing of mucin adsorption intensity during various immersion times at tested biomaterials with different surface roughness. In this study we collected the FTIR spectra and then, the area of the $1800-800\text{ cm}^{-1}$ region was measured. The results of area regions for lower surface roughness are presented in FIG. 2 and for more rough are presented in FIG. 3.

Obtained results show that there is no correlation between immersion time of biomaterials in mucin's solution and mucin adsorption intensity to the tested material's surface. Thus, the mucin adsorption intensity was depended of material's type. The highest adsorption was noticed in case of ferrite-pearlite steel 45. The value of analyzed parameter decreases in order: ferrite-pearlite steel 45 (steel I) > dental composite > implantation steel 316L (steel II) > phosphate-zinc bone cement. Thus, it could be concluded that the mucin adsorption intensity in case of steel depends of phase composition of steel. Also, some difference in adsorption was observed in case of materials with different surface roughness. The higher animal mucin adsorption was noticed in case of surface with lower roughness comparing to surface with higher roughness. These phenomena seem to be interesting, although their analysis goes beyond the scope of this article. Problem will be elaborated in future investigations.

Summary

On the basis of the performed examinations, the following conclusions have been formed:

1. The Fourier-transform infrared microspectroscopy (FT-IRM) technique allows analysing mucin thin film at all tested biomaterials surfaces.

2. The intensity of mucin adsorption at surface depends of biomaterial's type and was the highest for ferrite-pearlite steel 45.

3. The correlation between biomaterial's immersion time in mucin's solution and mucin adsorption intensity to the material's surface was not observed.

Acknowledgements

This work was financed by Polish Ministry of Science and Higher Education as a research project in 2010-2013 years (Grant No N N507 592938).

References

- [7] Bhargava R., Levin J.W., Recent development in Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopic methods for biomedical analysis. In: Vo-Dinh T. (ed), Biomedical Photonics Handbook, CRC Press, Boca Raton, 2003.
- [8] Wolf G., Crespo J.G., Reis M.A.M., Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring, Rev Env Sci Biotech, 1, 2002, 227-251 and references therein.
- [9] Patel M.M., Smart J.D., Nevell T.G., Ewen R.J., Eaton P.J., Tsibouklis J., Mucin/Poly(acrylic acid) interactions: a spectroscopic investigation of mucoadhesion, Biomacromol, 4, 2003, 1184-1190.
- [10] Liu F., Wu J.-G., Soloway R.D., Guo H., Martini D.K., Xu N., Xu G.-X., Influence of water of the infrared spectra of mucin, Microchim Acta 1, 1988, 357-359.