

ADHESION OCH AKTIVERING AV EN MAKROFAG CELLINJE I KONTAKT MED OLIKA YTBELÄGGNINGAR

ABDELRAOUF KACI

ADHESION OCH AKTIVERING AV EN MAKROFAG CELLINJE I KONTAKT MED OLIKA YTBELÄGGNINGAR

ABDELRAOUF KACI

Kaci, A. Adhesion och aktivering av en makrofag cellinje i kontakt med olika ytbeläggningar. Examensarbete i biomedicinsk laborietvetenskap 15 högskolepoäng. Malmö universitet: Fakulteten för hälsa och samhälle, Institutionen för biomedicinsk vetenskap, 2018.

Utveckling av biokompatibla ytor anses vara en stor utmaning inom medicinsk forskning. I allmänhet kommer medicinska implantat att beläggas av ett lager av icke-specifika proteiner några sekunder efter implantation. Detta sker oavsett implantatets konstruktionsmaterial. Det adsorberade skikt av proteiner aktiverar en värdförsvarmekanism, känd som den främmande kroppsreaktionen, vilket slutligen resulterar i en fibrös icke vaskulär kapsel som isolerar implantatet från dess målvävnader. Utveckling av biokompatibla ytor är ett intressant forskningsområde och framförallt inom medicinsk forskning. Det är viktigt att använda en beläggning som inte leder till någon inflammatorisk respons eller vidhäftning av oönskade celler. Makrofager är en cellinje som är involverade i kroppens immunsystem vilket gör den intressanta i dylika studier. Syftet med studien var att undersöka celladhesion och inflammatorisk respons hos en makrofag cellinje *in vitro*. Undersökningen utfördes med polydopamine (PDA), polyetylenglykol (PEG) och proteas beklädda ytor. RAW 264.7-celler är en mus makrofag cellinje. Undersökningen av celladhesion utförs genom att odla celler i kontakt med olika ytbeläggningar och utvärderades genom att fotografera ytorna vid olika tider. Cytokinuttrycket avseende TNF- α analyseras med ELISA. Cellernas adhesionsförmåga och inflammatorisk respons studeras i olika fetals serumkoncentrationer. Resultatet visade ingen skillnad i celladhesion vid odling med olika fetals serumkoncentrationer. RAW 264.7-cellernas adhesionsförmåga varierade mellan olika ytbeläggningarna. RAW 264.7-cellerna visade även en starkare bindningsförmåga i de om ytbeläggningen gjorts under statistiska förhållanden. RAW 264.7-cellerna visade preliminärt ingen skillnad i inflammatorisk respons mellan de olika ytorna som undersökts

Nyckelord: biokompatibla ytor, celladhesion, inflammatorisk respons, polydopamin, polyetylenglykol, proteaser, RAW 264.7-celler.

ADHESION AND ACTIVATION OF A MACROPHAGE CELL LINE IN CONTACT WITH DIFFERENT SURFACE COATINGS

ABDELRAOUF KACI

Kaci, A. Adhesion and activation of a macrophage cell line in contact with different surface coatings. Degree project in biomedical science 15 credit points. Malmö University: Faculty of health and society. Department of biomedical science, 2018.

Development of biocompatible surfaces are considered a great challenge within the medical research. In general a medical implant will be coated of a layer of non-specific proteins a few seconds after implantation. This happens regardless of the construction material of the implant. The adsorbed protein layer will activate a host-defense mechanism, known as the foreign body reaction, which evidently will result in a fibrous non-vesicular capsule that isolates the implant from its goal tissues. The development of biocompatible surface is an interesting research field. It is important to use a surface coating that does not contribute to an inflammatory response or adhesion of unwanted cells. Macrophages is a cell line that is naturally involved in the immune system in the body, which is interesting for such studies. The aim of this study is to examine cell adhesion and inflammatory response of a macrophage cell line *in vitro*. The investigation was performed using surfaces modified by polydopamine (PDA), polyethyleneglycol (PEG) and protease and combination thereof. RAW 264.7- cells is a mouse macrophage cell-line. The investigation of cell adhesion was performed using cells in contact with different surface coatings and evaluated by photographing the surfaces at various occasions. The cells ability to adhesion and the inflammatory response was studied in different fetal sera concentrations. The result show no difference in cell adhesion at different fetal sera concentrations. The RAW 264.7-cells adhesion varied for the different surface coatings. The RAW 264.7 cells showed a stronger adherence when the surface coating was done purely by diffusion. The RAW 264.7 cells preliminary showed no inflammatory response related to the tested surface coatings.

Keywords: Biocompatible surfaces, cell adhesion, inflammatory response, polydopamine, polyethyleneglycol, Proteases, RAW 264.7

FÖRORD

Jag vill tacka mina handledare Maria Stollenwerk och Roberto Ortiz för all hjälp under projektets gång. Jag vill även tacka Anette Gjörloff Wingren som erbjöd mig detta projekt samt för alla värdefulla råd.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

BAKGRUND	6
Syfte	8
MATERIAL OCH METOD	8
Ytmodifiering	8
Cellodling	8
Inflammatorisk respons	9
Etisk bedömning	10
RESULTAT	10
Celladhesion	10
DISKUSSION	13
KONKLUSION	16
REFERENSER	17

BAKGRUND

Utveckling av biokompatibla ytor anses vara en stor utmaning inom medicinsk forskning. Det är känt att proteiner bildar ett adsorberat proteinskikt på implantatytor inom några sekunder efter exponering för kroppsvätskor. Dessa proteiner följs snabbt av celler i immunsystemet där makrofager känner igen det adsorberade proteinskiktet och försöker att försvaga vad som antas vara kroppsfrämmande. Denna process aktiverar immunsystemet, detta sker via signalsubstanser som utsöndras av makrofagerna och därigenom dras fler immunceller till implantatet. Eftersom storleken på de flesta implantat är större än cellen själva, kan cellerna inte fagocytera implantatet, istället smälter de samman för att bilda främmande kroppsgigantceller (FBGC). FBGC släpper ut kemiska signaler som rekryterar fibroblaster till regionen, i slutänden sekvestrerar implantatet i ett tunt vasculärt skikt av kollagen för att förhindra dess effekter från resten av kroppen. Många implantat misslyckas så småningom på grund av deras oförmåga att effektivt kommunicera med omgivande vävnader. För att i framtiden kunna övervinna begränsningar i biologisk kommunikation genom selektiv modifiering av implantatets ytor [1]. RAW 264.7-celler är en makrofagcellinje från mus som ger möjligheten för att undersöka celladhesion samt inflammatorisk respons i kontakt med olika ytor.

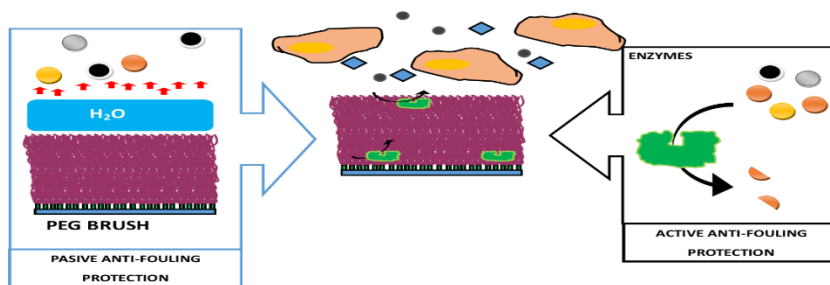
I en översiktsartikel av Liu L *et al* diskuterades appliceringen av antifouling polymerer i nanopartiklar och tunna beläggningar för exempelvis artificiella leder, katetrar och sårförband [1]. Banerjee I *et al* diskuterade hur designen av ytbeläggningar kan förhindra kontamination av implantat. Genom att förhindra mikroorganismer att fästa till ytor eller försämra deras adhesionsförmåga minskar ytkontaminationen [2]. Det intressanta inom detta område är att kunna utveckla ytor som förhindrar adsorption av ospecifika proteiner som i sin tur innebär förhindrar vidhäftning av celler. Vid implantat av olika artificiella kroppsdelar aktiveras immunsystemet som då aktiverar en "foreign body" reaktion. Aktivering av makrofager leder även till utsöndring av olika cytokiner och framförallt tumörnekrosfaktor (TNF- α) och interleukin 6 (IL-6) [3, 4].

TNF- α är ett viktigt cytokin som har olika funktioner vid en inflammatorisk respons. Utsöndringen av TNF- α leder till ökad antal monocyter och neutrofiler i cirkulationen. TNF- α stimulerar även utsöndringen av olika adhesionsproteiner som makrofager använder sig av för celladhesion. TNF- α stimulerar utsöndringen av olika plasmaproteiner via levern bland annat C-reaktivt protein (CRP) som är en infektionsmarkör.

Ytor kan modifieras för att introducera antifouling med ämnen som anses fungera som via mekanismer som relateras till passiva, aktiva eller en kombination vilket illustreras i figur 1. Polyetylen glykol (PEG) utgör en passiv mekanism som förhindrar vidhäftning av celler och proteiner på olika biomaterial [5,6]. Ki D P *et al* undersökte *Staphylococcus epidermidis* och *Escherichia coli* förmåga att adherera till ytor beklädda med PEG. Resultatet visade att denna ytmodifiering effektivt förhindrade bakteriell vidhäftning och efterföljande infektion [7]. I tidigare studier har modifiering med PEG (pegulering) studerats på olika material genom att utnyttja närvaro av olika funktionella grupper hos olika material för att kovalent kunna binda PEG. Kang och Lee undersökte PEG's inbindning till rostfritt stål efter elektropolering och sedan behandling av ytan med persvavelsyra. Bildade hydroxylgrupper på rostfritt stål epoxy-funktionaliseras och sedan immobiliseras aminerad PEG. Resultatet visade

att beläggningsen förhindrade vidhäftning av proteiner till ytan. Fan *et al.* använde Ti-substrat med PEG oligomerer för att beklä ytor. Efter en kemisk reaktion mellan Ti och PEG över natten, tillsattes fibroblaster två gånger per vecka till dessa ytor. Resultatet visade att ingen vidhäftning av fibroblaster registrerades fram till 11:e veckan medan på de obehandlade ytor fäste cellerna omedelbart. Vidare har Chen *et al.* testat proteinvidhäftning till ytor genom att tillsätta SiH grupper på ytan av Siloxan som sedan reagerade med bisallyl-PEG. Beläggningsen visade en reduktion av protein adhesion [8]. Eftersom PEG har förmåga att binda till sig vatten, utgör vattnet en barriär som förhindrar vidhäftning av celler. Studierna har visat att PEG är en instabil molekyl som inte adhererar till ytor under längre perioder. Däremot kan PEG användas för ytmodifiering av implantat under kortare perioder [8].

Proteaser är enzymer som utgör den aktiva mekanismen vid beläggningsen av ytor. Olika celler använder sig av olika adhesionsproteiner för att binda till en yta. Det finns tight junctions, adherens junctions och gap junctions proteiner som cellerna använder sig av för att binda till ytor [2,3]. Subtilisin är ett känt enzym genom sin förmåga att bryta ner adhesionsbindningarna. Enzymet används vid ytbeläggningsen eftersom det är stabilt och fungerar bra vid pH 7-10 och 25°C [9,10]. Ett annat enzym är trypsin som normalt förekommer i tarmen. Trypsin används framförallt inom cellodling i kombination med EDTA för att lossa adherenta celler från ytan [11,12].



Figur 1. Förhindrad celladhesion vid beläggningsen med passiv och aktiv mekanism. PEG utgör en barriär mellan cellerna och ytan medan enzymerna bryter ner adhesionsbindningarna och därmed hindras cellernas bindning till ytan.

Dopamin (DA) är ett ämne som har förmåga att bilda polymerabeläggningsen [13]. I en studie av Dalsin J L *et al* på musslor upptäcktes höga halter av ämnet 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) där musslorna använde DOPA som ett lim för att fästa till olika ytor exempelvis stenar och därmed inte påverkas eller spolats bort på grund av kraftiga vattenströmmar. Senare visade en studie att DA och DOPA hade liknande adherenta egenskaper. DA har förmåga att bilda polymerer som kallas för Polydopamin (PDA) med samma adherenta egenskaper på olika biomaterial [5]. Studier har även visat att PDA är stabil och celladhesionsförmågan är densamma oberoende av vilken celltyp som studeras [5,14]. Lee *et al.* undersökte fibroblasters och megakaryocyters vidhäftning till PDA modifierade ytor. Fibroblasterna visade samma vidhäftningsförmåga och proliferation på både PDA modifierad och icke-modifierade glasytor. Däremot visade megakaryocyter en mindre vidhäftning till PDA-beläggningsen. När ytor modifierades med både PDA och hyaluronsyra (HA) ledde detta till större vidhäftning av megakaryocyter jämfört med tidigare beläggningsen. Den ökade vidhäftningsen berodde på att det finns en HA-receptor hos megakaryocyter [15].

Det är av intresse att modifiera plastytor med PEG, PDA och proteaser (subtilisin och trypsin). På så sätt kan man utnyttja PEGs förmåga att motverka cellvidhäftning, PDAs förmåga att binda till olika sorters celler samt proteasers förmåga att klippa sönder vidhäftningsproteiner för att undersöka celladhesion för RAW 264.7. Användning av dessa substanser innebär att cellerna utsätts för en yttre påverka och därmed är det intressant att undersöka inflammatoriska responsen.

Syfte

Syftet med studien är att undersöka celladhesion och inflammatoriska responsen hos RAW 264.7-celler in vitro in kontakt med modifierade ytor av PDA, PEG, proteaser och kombinationer av dessa.

MATERIAL OCH METOD

Material som användes under försöken var Trypanblått (Sigma, USA). RPMI 1640 och Lipopolysackarider (LPS) (Sigma-Aldrich, Sverige). Fosfatbuffrad saltlösning (PBS) utan Ca och Mg och PenicilinStreptavidin (Gibco, USA). ELISA kit för mus TNF- α var från R&D Systems (USA). ELISA läsare (Bio-Tek PowerWave XS, USA), cellodlingsplattor (VWR Tissue Culture, Kina), Centrifug (Heraeus Biofuge Pico, Tyskland), Mus Makrofag cellinje (RAW 264.7, ATCC), Trypsin/EDTA och Fetaltkalvserum (Thermo Fisher, USA), cellodlingsflaskor T-75 (Sarstedt, Tyskland).

För ytbeläggningen gäller följande material: trypsin från svinpankrea (10 000 Na-bensoyl-L-argininetyl ester BAEE U/mg) och Subtilisin A från *Bacillus licheniformis* (15 U/mg) från Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Na₂SO₄, Dopamine hydrochloride och salter till de olika buffertlösningarna kommer från Sigma-Aldrich (USA). Polyetylen glycol är monodispers, som slutar med amin m-PEG av Mn = 10 000 g/mol (Mw/Mn \leq 1.08; N \approx 113) med en renhet på >95% och en densitet av 1400 Kg/L från Rapp Polymers (Tübingen, Tyskland). Mikrotiterålattor med 24 brunnar från VWR (Radnor, USA).

Ytmodifiering

Brunnarna fylldes först med antingen TRIS pH 8,5 (för blanken, DA och DA+PEG behandlade brunnar) eller färsk preparerad 1mg/ml enzymlösning i 25 mM TRIS pH 8,5 (för brunnarna DA+enzym och DA+enzym+PEG). Sedan tillsattes en liten mängd koncentrerad lösning DA i 0,1 M HCl för att uppnå en koncentration på 1mg/ml i dem märka brunnarna DA, DA+PEG, DA+enzym, DA+enzym+PEG. Efter tillsats i mikrotiterplattor behandlades dessa i 1 minut i en plattskakare (VWR, Danmark) och förvarades därefter i 22 timmar mörkt och rumstemperatur. Försök där mikrotiterplattorna efter tillsats behandlades under konstant omrörning i 22 timmar med hjälp av en plattskakare vid 600 rpm i mörker. Sedan tvättades brunnarna 2 gånger med 25 mM TRIS pH 8,5 buffert och en 1 mg/mL PEG 10 kDa löst i 0,9 M Na₂SO₄ lösning som tillsattes till brunnarna märkta som DA+PEG och DA+enzym+PEG. De resterande brunnarna fylldes med TRIS buffert. Plattorna skakades i 16 timmar med hjälp av en plattskakare i rumstemperatur och slutligen tvättades brunnarna två gånger med 25 mM TRIS pH 8,5 buffert och användes direkt till celladhesion och inflammationsstudier.

Cellodling

RAW 264.7-cellerna är adherenta celler som kommer från en mus makrofag cellinje som odlas i T-75 flaskor. När cellerna uppnår ca 80-90% konfluens subkultiveras de. Cellernas odlingsmedium avlägsnas och cellerna tvättas 2 gånger med 3 mL PBS utan Ca²⁺/Mg²⁺.

Sedan tillsätts 500 μL Trypsin/EDTA och fördelas jämt över hela flaskans botten, inkuberades 5 min i 37°C därefter kontrollerades att cellerna lossnat och RPMI medium (4,5 mL) tillsätts omedelbart och cellsuspensionen aspireras ett par gånger med pipetten för att fördela cellerna jämt i mediet. Cellsuspension (500 μL) förs över till en ny T-75 flaska som sedan späds med 10 mL RPMI-medium innehållande 9 % FCS och PEST [3].

För koncentrations bestämning av cellerna används Bürkers kammare där 50 μL cellsuspension blandas med 50 μL trypan blått i ett eppendorfrör och sedan förs 10 μL av blandningen till Bürkers kammare. Vid mikroskopering urskiljs levande och döda celler, döda celler färgas blått. Endast viabla celler räknades samtidigt som man kontrollerar förekomst av döda celler.

För att komma fram till en optimal cellkoncentration för både celladhesion och inflammatorisk respons testades ett antal olika cell koncentrationer nämligen 10^5 , $5 \cdot 10^4$, 10^4 och $2 \cdot 10^3$ celler/mL samt även olika koncentrationen av FCS 1, 4,5 och 9% FCS. En mL cellsuspension/brunn av respektive koncentration tillsattes till plattan och inkuberades i 37°C .

För att optimera försöksbetingelser undersöktes hur olika serumkoncentrationer (1%, 4,5% och 1% FCS) påverkar både adhesion och induktion av cytokinuttryck. Fyra oberoende försök utfördes med en cellkoncentration på 10^4 celler/mL. Ytmodifieringen kompletterades med ytterligare ett enzym nämligen trypsin. Fortsatta försök utfördes sedan med $4 \cdot 10^4$ celler/mL i 1 % FCS. Dessutom skillnader i adhesion baserat på om ytmodifieringen gjordes med eller utan mekanisk påverkan. Detta undersöktes 2h, 24h och 48h efter tillsättning av cellerna till plattorna.

Celladhesion bedömdes med hjälp av ett ljusmikroskop med inbyggd kamera. Två timmar efter tillsatts av celler till brunnarna togs första bilden, därefter togs bilder med olika tidsintervall. Adhesionen värderades gradvis, där ”-” innebar ingen bindning alls, ”+” motsvarade ca 25 % konfluens, ”++” motsvarade ca 50 % konfluens, ”+++” motsvarade ca 75 % konfluens och ”++++” motsvarade ca 100 % konfluens. Modifieringar som ej testades markeras med ”ET”.

Inflammatorisk respons

Olika cellkoncentrationer av RAW 264.7-celler testades med tillsats av 9 %, 4,5% och 1 % FCS i obehandlad platta. Efter 24 h i 37°C stimulerades cellerna med $1\mu\text{g/mL}$ LPS i 3h i 37°C innan prover för analys av TNF- α togs. Trehundra μL medium från varje brunn centrifugeras i 600g i 5 min och supernatanterna frystes ner i -80°C inför analys av TNF- α med ELISA.

Fortsatta försök utfördes med 1 % FCS till cellmedium och en cellkoncentration på $4 \cdot 10^4$ celler/mL för analys av inflammatorisk respons i ytmodifierade plattor på samma sätt som ovan beskrivits. Cellerna inkuberades 24 h i 37°C och därefter stimulerades med LPS för att sedan ta prover efter 3 h och 24 h från både stimulerade och ostimulerade celler.

RAW 264.7-cellerna är från mus och därför måste antikropparna vara specifika för mus TNF- α . Sandwich ELISA är en effektiv metod för detektion av cytokiner. 100 μL /brunn Capture Antibody tillsätts till en 96-hållsplatta, förseglades och sedan inkuberades vid rumstemperatur över natten. Plattan tvättades 4 gånger med 300 μL /brunn PBS+ 0,05% BSA och blockerades därefter genom tillsatts av 300 μL /brunn Reagent Diluent (1 % BSA in PBS) i minst 1h i rumstemperatur. Därefter tvättas plattan som tidigare innan tillsatts av 100 μL standard, blank

och prover till respektive brunnar som inkuberas 2 h vid rumstemperatur. Plattan tvättas 4 gånger med PBS+ 0,05% BSA efter inkubationen innan tillsatts av 100 µL Detection Antibody till alla brunnar följd av ytterligare 2 h inkubation vid rumstemperatur. Plattan tvättas ännu en gång till och 100 µL Streptavidin-HRP tillsätts. Efter 20 min inkubation i mörker i rumstemperatur följer ett sista tvättsteg för att sedan tillsätta 100 µL substrat lösning som i sin tur inkuberas mörkt i rumstemperatur. Substrat lösningen består av en 1:1 blandning av Color Reagent A (H₂O₂) och Color Reagent B (Tetrametylbensidin). Reaktionen stoppas efter 20 min genom tillsatt av 50 µL stopp lösning. Varje prov analyserades som dubbelprov. Plattan avlästes vid 450 nm och resultaten bearbetades med hjälp av programmet Excel 2016. Utifrån en standardkurva räknades koncentrationen av TNF- α som utsöndrades från varje prov.

Etisk bedömning

Studien utförs på en kommersiell cellinje och därför krävs det ingen etikprövning

RESULTAT

Celladhesion

RAW 264.7 cellers adhesionsförmåga och dess inflammatoriska respons undersöktes. I tabell 1 redovisas en sammanställning från fyra olika försök för celladhesion till olika modifierade ytor. RAW 264.7-cellernas adhesionsförmåga varierade beroende på gjord ytmodifiering. RAW 264.7-cellerna visade enbart en liten skillnad i adhesionsförmåga mellan 9 % och 1 % FCS där adhesionen generellt är något bättre vid högre FCS koncentration. Däremot visar kontrollerna ingen skillnad i celladhesion kopplat till halten FCS. Undersökningen av celladhesionen utfördes vid olika tidpunkter där antalet celler ökar med ökad tid och därmed större möjlighet till att adherera till underlaget.

Tabell 1. Bedömning av celladhesion för RAW 264.7-cellerna i 9 % och 1 % FCS i kontakt med olika ytor. Modifieringar som ej testades markeras med "ET".

	2h	24h	48h	72h	120h
Kontroll 1%	++	++++	++++	++++	++++
Kontroll 9%	++	+++	++++	++++	++++
PDA 1 %	+	++	++	++	+++
PDA 9%	+	++	+++	+++	++++
PDA+Sub 1%	++	++	++	+++	++++
PDA+Sub 9%	+	++	+++	++++	++++
PDA+Tryp 1%	++	ET	ET	+++	++++
PDA+Tryp 9%	++	ET	ET	++++	++++
PDA+PEG+Sub 1%	-	+	+++	ET	++
PDA+PEG+Sub 9%	-	++	+++	ET	+++
PDA+PEG 1%	-	+	ET	ET	ET
PDA+PEG 9%	+	+	ET	ET	ET
PEG 1%	+	++	ET	ET	ET
PEG 9%	+	+++	ET	+++	++++

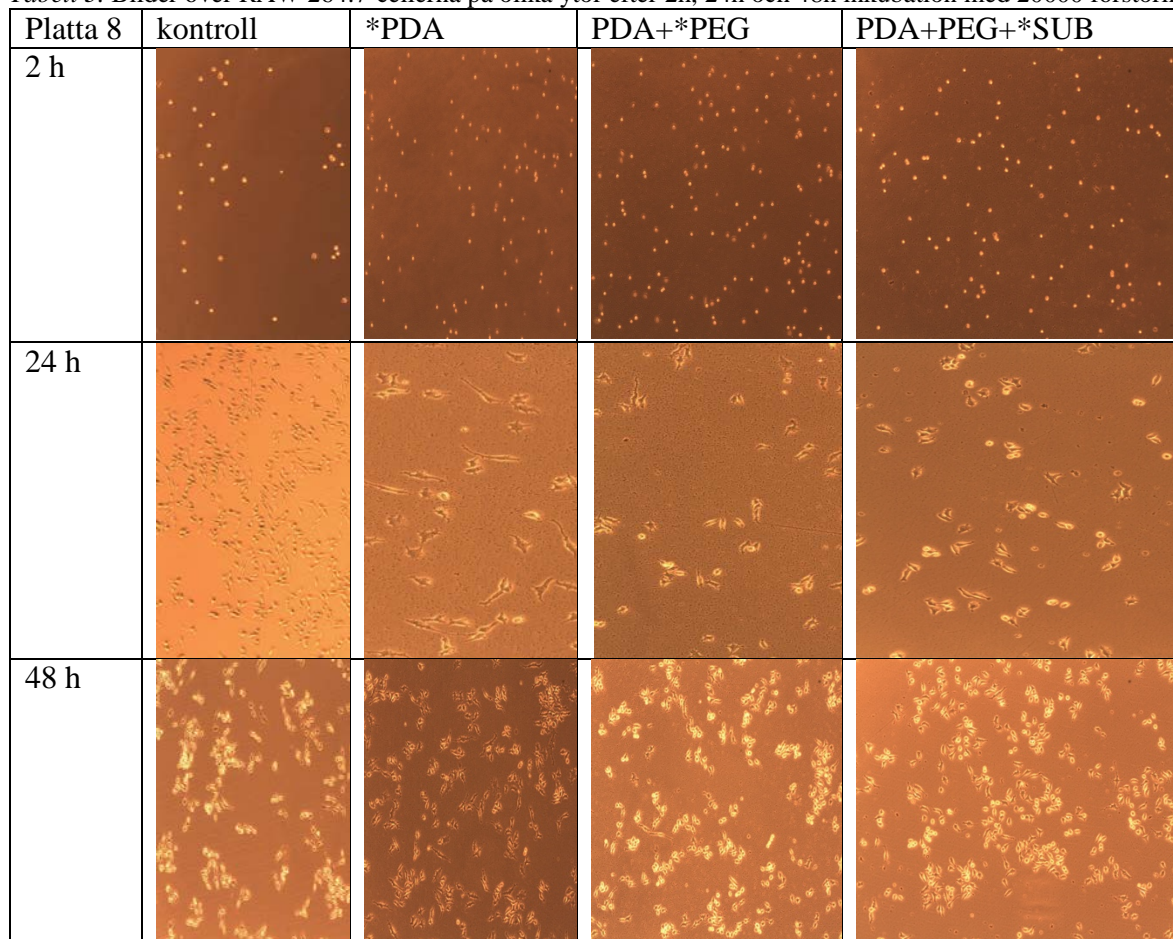
Celladhesion jämförelse mellan skakad och oskakade plattor redovisas i tabell 2. Ett medelvärde från två försök av RAW 264.7-cellerna i 1 % FCS-medium. Resultatet visar starkare adhesionsförmåga i oskakade plattor för alla ytmodifieringarna efter 24h och 48h. Däremot observeras nästan ingen bindning till de olika ytmodifieringarna efter 2h.

Tabell 2. Bedömning av RAW 264.7-cellernas adhesionsförmåga för olika tidpunkter i skakad och oskakade plattor. Skakningen av plattorna skedde vid coatingen med de olika substanserna.

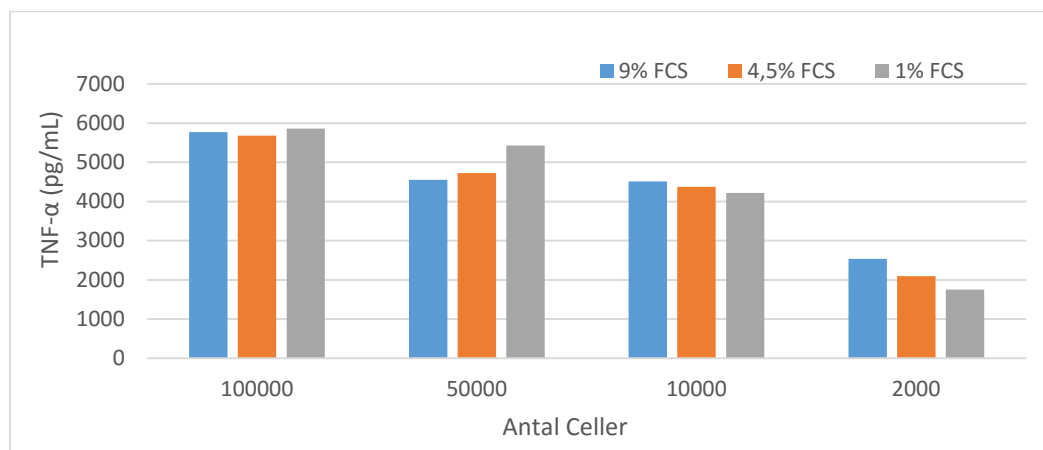
1% FCS	Kontroll	PDA	PDA+PEG +Subtilisin	PDA+ PEG	PEG
Skakad					
2 h	++	-	-	-	+
24 h	++++	+	++	++	+++
48 h	++++	++	+++	+++	++++
Ej skakad					
2 h	-	-	-	+	-
24 h	+++	+++	+++	+++	+++
48 h	++++	++++	++++	++++	++++

Jämförelsen av cellernas adhesionsförmåga i relaterat till ytmodifieringsprocessen gjordes genom att fotografera cellerna efter 2 h, 24 h och 48 h inkubation. Bilderna är tagna från ett representativt område medan bedömningen av adhesionsförmågan utförs över hela brunnen. Obundna celler antar en rund liten form (fria celler) medan bundna celler blir avlånga och kopplas samman med varandra så småningom vilket visas i tabell 3.

Tabell 3. Bilder över RAW 264.7-cellerna på olika ytor efter 2h, 24h och 48h inkubation med 20000 förstoring.

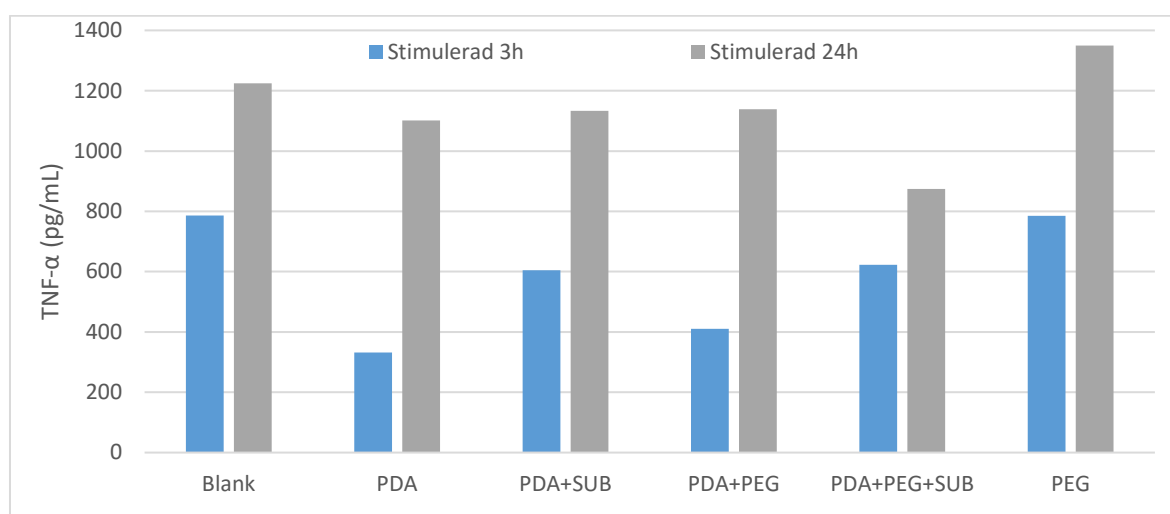


Koncentrationen TNF- α som utsöndras efter LPS-stimulering av RAW 264.7-celler vid olika FCS-koncentrationer och med olika antal celler redovisas i figur 2. Resultatet visar ingen skillnad mellan olika FCS-koncentrationer där utsöndringen av TNF- α är densamma. Resultatet visar även att TNF- α koncentrationen ökar i supernatanen med ökat antal celler. TNF- α utsöndringen per cell minskar med ökad antal celler där vid 2000 celler utsöndrades 1pg/cell, vid 10000 celler utsöndrades 0,4 pg/cell, vid 50000 celler utsöndrades 0,1 pg/cell och vid 100000 celler utsöndrades 0,06 pg/cell.



Figur 2. TNF- α koncentration som utsöndras av RAW 264.7-cellerna efter LPS-stimulering vid olika koncentrationer av FCS i obehandlade plattor.

RAW 264.7 cellernas TNF- α utsöndringen med och utan LPS stimulering redovias i figur 3. Undersökningen gjordes på $4 \cdot 10^4$ celler/mL i 1 % FCS. Resultatet visade att LPS stimulering av RAW 264.7 celler genererar utsöndring av TNF- α oberoende av ytmodifiering. Resultatet visade även att ingen inflammatorisk respons kunde detekteras från ostimulerade brunnar relaterat till låga TNF- α nivåer. Det förekommer ingen relation mellan adhererade celler och TNF- α frisättning.



Figur 3. Utsöndringen av TNF- α efter 3 h och 24 h stimulering med LPS av celler i kontakt med olika ytbeläggningar.

DISKUSSION

Syftet med studien var att undersöka celladhesion och inflammatorisk respons hos en makrofag cellinje in vitro efter kontakt med olika ytor.

Studier om hur celler binder till olika ytor är viktigt eftersom att användning av implantat blir allt mer vanligare. I detta arbete användes en kombination av PDA, proteaser och PEG för att studera RAW 264.7-cellernas adhesionsförmåga samt om deras inflammatoriska respons påverkas av gjorda ytmodifieringar. Nackdelen med att odla celler i mikrotiterplattor är att celler endast klara sig så länge näringen i medium räcker till. Vid näringsbrist eller pH-förändring påverkas cellerna vilket leder till celdöd. Detta undviks genom att byta cellodlingsmedium med jämna mellanrum för att förse cellerna med näring och tillväxtfaktorer [6]. Ett annat problem är den subjektiva bedömningen av cellernas adhesionsförmåga som i denna studie utfördes med ett ljusmikroskop. Bedömningen utfördes subjektivt med ett ”+/-” system vilket inte ger en rättvis eller noggrann bedömning av celladhesion. Ett alternativ som använts i tidigare studier var att infärga cellerna efter en viss period vilket ger bättre bild av celladhesionen [6,16].

I studien testades olika cellkoncentrationer av RAW 264.7 för att kunna bestämma en lämplig koncentration för både inflammatorisk respons och celladhesion. Eftersom att en splittring av cellerna under ett pågående försök är omöjlig, kan inte en hög cellkoncentration användas då cellerna inte trivs binda tätt intill varandra. Efter fotografering av cellerna under odling under 3 dagar och sedan en granskning av bilderna, bestämdes att $4 \cdot 10^4$ celler/mL skulle användas för vidare försök. En cellkoncentration på 10^5 celler/ml visade det sig vara en alldeles för hög för adhesion försöket, då cellerna växer fort och redan efter 24h täcker de hela brunnarna. En cellkoncentration av $5 \cdot 10^4$ celler/ml var mer optimal då det ger möjlighet att studera adhesionen under längre period än bara 24h. Koncentrationerna 10^4 celler/mL och $2 \cdot 10^3$ celler/mL visade sig vara låga för undersökning av celladhesion då ingen bedömning kunde utföras vid mikroskopering. Utifrån det bestämdes en cellkoncentration av $4 \cdot 10^4$ celler/mL för de vidareförsöken.

Adherent celler använder sig av proteiner för bindning till ytor. Vanligtvis odlas RAW 264.7 celler i RPMI medium med 9 % FCS. För att undersöka om en lägre FCS koncentration kunde användas utfördes försök med både 9 % FCS och 1 % FCS. Cellerna visade ingen betydande skillnad i adhesionsförmåga relaterat till de undersökta FCS koncentrationerna. I kontrollerna utfördes ingen ytmodifiering av brunnarna i mikrotiterplattan, utan endast celler i medium fanns i brunnarna. Resultaten som observerades var att cellerna binder i princip lika mycket till ytan oberoende av FCS koncentration. I de resterande brunnarna med de olika coatingssubstanser, observerades enbart en liten skillnad i adhesionsförmåga mellan 9 % och 1 % FCS där adhesionen generellt är något bättre vid högre FCS koncentration.

Utöver cellernas adhesionsförmåga i olika FCS-koncentrationer, undersöktes cellernas adhesion till ytor belagda med olika ämnen enskilt och i kombination. Cellerna adhererar mest i brunnar med PDA+enzym där det observerades en stark adhesionsförmåga redan efter 24 h. Eftersom att enzymet bryter adhesionsproteinerna förväntades mindre celladhesion vid närvaron av ett enzym. Resultatet kan bero på att enzymaktiviteten inhiberades och därmed

kunde cellerna binda till ytan. Vid ett separat försök togs det prover från plattorna för att undersöka enzymaktivitetet. Resultatet visade att enzymerna var fortfarande aktiva. Vid ett försök testades två olika enzymer nämligen subtilisin och trypsin för att undersöka hur cellernas adhesionsförmåga påverkas i närvaro av dessa. Resultaten visade ingen skillnad i celladhesion mellan vare sig trypsin eller subtilisin. Enzymerna (subtilisin och trypsin) förhindrar celladhesion genom att klippa peptidbindningarna i proteinerna som cellerna använder sig av för bindning till ytan [9,10]. Vid ytmodifiering med endast PDA ökar cellernas adhesionsförmåga med tiden. Detta eftersom att PDA har en aminogrupp som cellerna binder till. Eftersom att PEG har förmågan att binda till vatten, utgör vattnet en barriär som hindrar celladhesionen. Dessutom är den använda PEG aminerad vilket gör att den binder till negativa plastytan. Därmed förväntas en svag eller ingen adhesion av celler då PEG utgör en barriär mellan cellerna och ytan. RAW 264.7-cellerna visade en bra celladhesion även vid närvaro av PEG. Detta kan bero på att cellerna lyckades hitta bindningsyta där coatingen med PEG inte täckte hela ytan. Det kan också bero att cellerna har en förmåga att ta sig genom barriären för att sedan binda till ytan eller att PEG släpper efter en kort period vilket leder till att cellerna binder till ytan [8].

Försök med samma ytbeläggningar med celler i 1 % FCS gjordes för att undersöka om ytmodifieringsprocessen som gjordes dels genom att skaka dels via diffusion påverkade celladhesionen. Skakning av plattorna utfördes för att fler enzymer ska binda till ytan. Skakning av plattorna innebär även en ojämn yta till skillnad från oskakade plattor. Det förväntade resultatet var en mer celladhesion i oskakade plattor eftersom att plattorna har en jämn ytmodifiering. Även närvaron av fler enzymer efter skakningen leder till förhindrad celladhesion, eftersom att enzymerna klipper av peptidbindningar hos proteiner som cellerna använder sig av för adhesion till ytan. Efter 2h visade cellerna en sämre adhesion till de modifierade ytorna oberoende av hur ytmodifieringen utfördes. Utifrån det anses 2h en kort tid för bedömning av celladhesion eftersom att cellerna behövde längre tid för att adherera till ytan. Däremot observeras enbart en liten skillnad i adhesion efter 24 h och 48 h. För vidarestudier kan RAW 264.7-cellernas adhesionsförmåga i behandlade ytor undersökas under längre period med jämnare tidsintervall för fotografering.

Undersökningen av inflammatoriska responsen gjordes först genom LPS stimulering med olika cellkoncentrationer samt olika serumkoncentrationer. Analysen av relevant serumkoncentration visade att olika koncentrationer inte hade någon påverkan på cytokinuttryck (figur 2). Utsöndringen av TNF- α var detsamma i 9 %, 4,5 % och 1 % fetaltkalvserum. Analysen visade även en lyckad LPS stimulering av cellerna oberoende av cellkoncentrationen. Däremot minskades TNF- α utsöndringen med ökat antal celler per prov vilket indikerar på att cellerna mår sämre vid höga cellkoncentrationer och därmed försvagad TNF- α utsöndring. För att celler som hade odlats upp till försöken skulle räcka till för alla ytbeläggningarna, bestämdes att resterande försöken utförs med $4 \cdot 10^4$ celler/mL.

Studier av den inflammatoriska responsen utfördes då cellerna stimulerades efter 24 h med LPS. TNF- α utsöndringen studerades med både LPS stimulerad (positiv kontroll) celler och ostimulerade celler efter 3 h och 24 h stimulering. LPS stimulerade celler visade på en utsöndring av TNF- α i varierande koncentrationer för de olika ytbeläggningarna efter 3 h som sedan jämnade ut sig vid en högre nivå efter 24 h. Ostimulerade celler visade ingen utsöndring av TNF- α oberoende av ytbeläggning. Resultatet visade en väldigt liten koncentration TNF- α eller ingen alls i ostimulerade celler jämfört med stimulerade celler där höga koncentrationer TNF- α detekterades. Detta kan indikera på två saker, dels att cellerna inte mår bra och därmed en försvagad produktion av TNF- α och dels att eventuellt bildad

TNF- α absorberar i varierande grad i de olika ytorna. Självklart är det nödvändigt med fler försök för att fastställa att gjorda ytbeläggningar inte påverkar cellernas immunrespons.

Den preliminära slutsatsen från cytokinundersökningen av RAW 264.7-cellerna visar ingen inflammatorisk respons relaterat till de olika ytbeläggningarna *in vitro*. Det är nödvändigt med vidareförsök med mer noggrannhet både vid ytbeläggning samt stimulering av cellerna för att dra en slutlig slutsats.

KONKLUSION

Syftet med studien var att undersöka celladhesion och inflammatorisk respons av en makrofag cellinje *in vitro*. Undersökningen utfördes med PDA, PEG och proteas beklädda ytor. RAW 264.7-cellernas adhesions förmåga påverkades inte av FCS koncentrationen. Cellernas adhesionsförmåga undersöktes även för två olika ytmodifieringsprocesser (skakad och oskakad) som visade att celladhesionen var starkare när modifieringen gjorts utan mekanisk påverkan. RAW 264.7-cellerna visade ingen förändring i inflammatorisk respons relaterat till de olika ytbeläggningarna som undersökts.

REFERENSER

1. Liu L, Li W, Liu Q, (2014) Recent development of antifouling polymers: structure, evaluation, and biomedical applications in nano/micro-structures. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 6, 599-614.
2. Banerjee I, Ravindra C, Pangule R C (2011) Kane R S, Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms. *Advanced materials*. 23, 690–718
3. Hambleton J, Weinstein S L, Lem L, DeFranco A L (1996) Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2774-2778, 1996
4. Zhao Q, Topham N, Anderson JM, Hiltner A, Lodoen G, Payet CR. Foreign-body giant cells and polyurethane biostability: in vivo correlation of cell adhesion and surface cracking. *J Biomed Mater Res* 1991;25:177–183.
5. Dalsin J L, Hu B-H, Lee B P, Messersmith P B, (2003) Mussel Adhesive Protein Mimetic Polymers for the Preparation of Nonfouling surfaces. *American Chemical Society*, 125, 133-165.
6. Ogaki R, Andersen O Z, Jensen G V, Kolind K, Kraft D C E, Pedersen J S, Foss M. (2012) Temperature-Induced Ultradense PEG Polyelectrolyte Surface Grafting Provides Effective Long-Term Bioresistance against Mammalian Cells, Serum, and Whole Blood. *American Chemical Society*, 13, 3668-3677.
7. Ki D P, Young S K, Dong K H, Young H K, Eun H, Bae L, Hwal S, Kyu S C. (1998) Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *ScienceDirect*.
8. Meyers S R, Grinstaff M W, (2011) Biocompatible and bioactive surface modifications for prolonged in vivo efficacy. *ACS Publications*, 112, 1615-1632.
9. Kamal M, Höög J-O, Kaiser R, Shafiqat J, Razzaki T, Zaidi Z H, Jörnvall H, (1995) Isolation, characterization and structure of subtilisin from a thermostable *Bacillus subtilis* isolate. *FEBS Letters* 374, 363-366.
10. Merck KGaA (2018) *Protease from Bacillus licheniformis*. >[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com/html)<html (2018-03-04)
11. Niazi S A, Al-Ali W M, Patel S, Foschi F, Mannocci F. (2015) Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *International Endodontic Journal*, 48, 1157-1167.
12. Gilan I, Sivan A. (2013) Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* C208. *FEMS microbiology letter*. 342, 18-23.

13. Liebscher J, Mrówczyński R, Scheidt H A, Filip C, Hădăd N D, Turcu R, Bende A, Beck S, (2013) Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story? *Langmuir*, 29, 10539–10548
14. Ding Y H, Floren M, Tan W, (2016) Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurface and Biotribology*, 2, 121-136.
15. Lynge M E, Van Der Westen R, Postma A och Städler B (2011) Polydopamine-a nature-inspired polymer coating for biomedical science. *Nanoscale* 3, 4916.
16. Ahmed A-A, Pingle H, Reynolds N P, Wang P-Y, Kingshott P. Tuning the Density of Poly(ethylene glycol) Chains to Control Mammalian Cell and Bacterial Attachment. *Polymers* ,9, 343.
17. Wisniewski, N; Reichert, M.; (2000) Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces* 18 (3-4): 197-219