

# BADANIA IN VITRO, TERPOLIMERU PVDF- PTFE-PP, MODYFIKOWA- NEGO WŁÓKNAMI ALGINIANOWYMI

E. STODOLAK\*, B. CZAJKOWSKA \*\*, M. BŁA EWICZ\*,  
T. MIKOŁAJCZYK\*\*\*, D. WOŁOWSKA-CZAPNIK\*\*\*

\*AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, KRAKÓW

\*\*UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM,  
KATEDRA IMMUNOLOGII, KRAKÓW

\*\*\*POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII I MARKETINGU  
TEKSTYLIÓW, KATEDRA WŁÓKNIEN SZTUCZNYCH, ŁÓDŹ

**Słowa kluczowe:** polimery w inżynierii biomateriałów, biopolimery, alginiany, właściwości powierzchni, modyfikacja powierzchni.

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 208-211]

## Wprowadzenie

Znaczną część polimerów, stosowanych w dziedzinie inżynierii biomateriałów (np.: PP, PTFE, PS, PU, PVDF) charakteryzuje silna hydrofobowość powierzchni. Ta cecha materiału uniemożliwia osiadanie komórek na powierzchni polimeru a tym samym sprawia, że niemożliwe jest wytworzenie tkanki na granicy komórka-biomateriał. Właściwościami takimi jak topografia i chemia powierzchni są czynnikami determinującymi odpowiedź komórek (proliferyację, różnicowanie).

W pracy podjęto próby określenia wpływu modyfikacji powierzchni terpolimeru PP-PVDF-PTFE na odpowiedź komórek. Próbkę polimerową, zmodyfikowano przy użyciu włókien alginianowych. Alginiany są biopolimerami o hydrofilowej powierzchni. W pracy wykorzystano je do obniżenia energii powierzchniowej polimeru oraz do modyfikacji topografii powierzchni. Każde z badanych materiałów kontaktowano z dwoma rodzajami komórek ludzkich: osteoblastami i fibroblastami. Aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej komórek, po 7 dniach hodowli (przeżywalność komórek) określono wykorzystując metodę MTT. Poziomą zawartość kolagenu typu I, badano przy użyciu testu ELISA.

## Materiały i metody

Próbki do badań przygotowano stosując terpolimer PVDF-PTFE-PP (Aldrich Chemical Co., USA, cat. no. 45 458-3), który rozpuszczono w acetonie (POCH SA, Gliwice, Polska, cat. no 102480111). Włókna alginianowe przygotowano w Katedrze Włókien Sztucznych, Wydziału Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej. W celu otrzymania próbek, sporządzono roztwór terpolimeru (5 g PVDF-PTFE-PP w 50 ml acetonu). Otrzymano roztwór pośtuży do wytworzenia trzech rodzajów próbek:

### 1. Próbkę z czystego terpolimeru.

Na szalkę Petriego wylano roztwór terpolimeru i podano swobodnemu odparowaniu rozpuszczalnika.

### 2. Próbkę zawierającą 5% dodatek włókien z alginianu wapnia.

Krótkie włókna alginianu wapnia  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  rozprowadzono

# IN VITRO BEHAVIOR OF PP-PVDF-PTFE TERPOLYMER MODIFIED WITH ALGINATE FIBRES

E. STODOLAK\*, B. CZAJKOWSKA \*\*, M. BŁA EWICZ\*,  
T. MIKOŁAJCZYK\*\*\*, D. WOŁOWSKA-CZAPNIK\*\*\*

\*AGH-UTS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, CRACOW

\*\*JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, DEPARTMENT  
OF IMMUNOLOGY, CRACOW

\*\*\*DEPARTMENT OF MAN MADE FIBERS,  
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, ŁÓDŹ

**Key words:** polymers in biomaterials engineering, biopolymers, alginate, surface properties  
[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 208-211]

## Introduction

Many polymers have been investigated widely and used in biomaterials engineering (e.g.; PP, PTFE, PS, PU, PVDF). Generally, most of polymers used in biomaterials engineering reveal a hydrophobic surface characteristics, which make them unuseful in cell culture. Because of hydrophobic surface state it is not possible to obtain a proper attachment of the cell on biomaterial surface. The cell response is mainly determined by the surface topography and its chemistry (proliferation, differentiating followed by multiplications of cells). In this work an attempt has been taken to determine the influence of surface topography of PP-PVDF-PTFE terpolymer on cellular response. Terpolymer samples were modified with short alginate fibres. Alginate biopolymers are known to have hydrophobic surface properties. The short alginate fibres were used in order to decrease surface energy of the composite samples. Each of the materials studied was contacted with two kinds of human cells: osteoblasts and fibroblasts. Activity of mitochondrial dehydrogenases of cells after 7 day culture (cell viability) was measured by using MTT method, and the level of collagen of type I was studied by using ELISA test.

## Materials and methods

PTFE/PVDF/PP polymer (Aldrich Chemical Co., USA, cat. no. 45 458-3) has been used in the experiments. The solution was prepared by dissolving the polymer in a calculated amount of acetone (POCH SA, Gliwice, Poland, cat. no 102480111).  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  alginate fibres were fabricated at the Department of Man-Made Fibres, Faculty of Textile Engineering and Marketing, Technical University of Lodz, Poland.

Polymer samples have been obtained from polymer solution (5 g of PTFE/PVDF/PP polymer resin per 50 ml of acetone). The following kinds of samples have been obtained: solution.

### 1. Pure PTFE/PVDF/PP polymer sample

Polymer solution has been poured on to a Petri's dishes and left to freely evaporation (24 h).

### 2. Sample having a alginate fibre content of 5 weight percent $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ .

Short fibres of calcium alginate with terpolymer were mixed.

w roztworze terpolimeru i wylano na szalkę Petriego. Podano swobodnemu odparowaniu w powietrzu przez 24 godziny.

### 3. Próbką pokryta włóknami z alginianu wapnia.

Do szalki Petriego wylano roztwór terpolimeru i poddano swobodnemu odparowaniu rozpuszczalnika w powietrzu, przez 24 godziny. Otrzymano folię z PP-PVDF-PTFE nawiętlano przez 12 godzin promieniowaniem UV a następnie pokryto ją warstwą włókien krótkich z alginianu wapnia  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ .

Analizę tekstury powierzchni materiałów polimerowych przeprowadzono wykonując zdjęcia w elektronowym mikroskopie skaningowym SEM (Jeol JSM - 5400). Pomiar kąta zwilżenia materiału wykonano, w temperaturze pokojowej, na aparacie DSA 10 Kruss. Ciecz pomiarowa była wodą podwójnie destylowaną o objętości kropli 2,5-2,8 ml. W badaniach biologicznych materiałów, zastosowano linie fibroblastów ludzkich HS-5 i linie osteoblastów ludzkich hFOB 1.19. Oceniono żywotność komórek kontaktowanych z wszystkimi rodzajami próbek (metoda MTT) oraz określono poziom kolagenu typu I, po 7 dniach hodowli, w oparciu o test ELISA.

## Wyniki badań

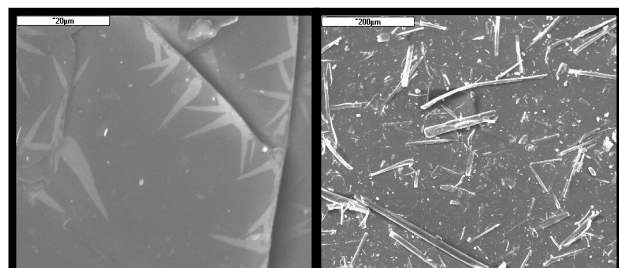
średnie wartości kąta zwilżenia dla wszystkich badanych próbek, podano w TABELI 1.

Jak widać z wyników zamieszczonych w TABELI 1, wprowadzenie włókien alginianowych do polimeru wpłynęło na wielkość kąta zwilżenia, mierzonego na powierzchniach badanych materiałów. Efekt ten jest silniejszy, w przypadku próbki z włóknami wyeksponowanymi na powierzchni, w porównaniu z próbką, w której włókna rozprowadzono w całej objętości.

Teksturę powierzchni obserwowano w skaningowym mikroskopie elektronowym (RYS. 1A, B). Próbką, do której wprowadzono włókna w całej objętości ma powierzchnię gładką, nieznacznie zmienioną przez włókna znajdujące się na jej powierzchni, natomiast druga z próbek posiada powierzchnię o wysokim stopniu chropowatości, na której widoczne są włókna lub ich fragmenty o różnej długości.

Wyniki badań komórkowych (metoda MTT), dotyczące aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej komórek kontaktowanych z powierzchnią polimeru, przedstawia RYS. 2. (W obliczeniach przyjęto, że przeżywalność i poziom kolagenu dla próbki czystego polimeru wynosi 100%.)

Przeżywalność fibroblastów, po 7 dniach hodowli, jest zdecydowanie niższa w kontakcie z próbkami, których powierzchnie modyfikowano włóknami alginianowymi w porównaniu z komórkami kontaktowanymi z czystym polime-



RYS. 1. Zdjęcia tekstury powierzchni terpolimeru z włóknami z alginianu wprowadzonymi do wnętrza (A) i na powierzchnię (B).

FIG. 1. Surface microphotographs of terpolymer-based samples: mixed with alginate fibres (A) and covered with the fibres (B).

Composites solution has been poured onto a Petri's dishes and air-dried to remove the solvent for 24h.

### 3. Sample covered with short alginate fibres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ .

On to Petri's dishes terpolymer solution was poured out and left in air at room temp to remove the solvent, for 24 hours. The foil made of PP-PVDF-PTFE terpolymer was UV irradiated for 12 hours and then the surface sample was covered with a layer of short alginate fibres  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ .

To analyze the texture of terpolymer - based surface materials SEM (Jeol JSM - 5400) microphotographs have been made. Contact angle was measured by Kruss 10 DSA system at room temperature. Doubly distilled water was used in this measurement with the drop volumes of 2,5-2,8 ml. Viability of the cells contacted with the materials was studied by MTT method. Viability of the cells originating from fibroblasts HS-5 and hFOB 1.19 osteoblasts lines was determined after 7 days. Level of collagen of type I produced by the cells was analyzed using the ELISA test.

## Results

Results of the contact angle measurements for the samples before and after modification with alginate fibres phase are gathered in TABLE 1.

	Kąt zwilżenia Contact angle
Terpolimer Terpolymer	101,8±2,5
Terpolimer z dodatkiem 5% włókien $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ Terpolymer with 5% fibres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$	93,8±4,43
Terpolimer po 12h UV z naniesionymi włóknami $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ UV irradiated terpolymer covered with fibres $\text{Ca}(\text{Alg})_2$	85,0±3,24

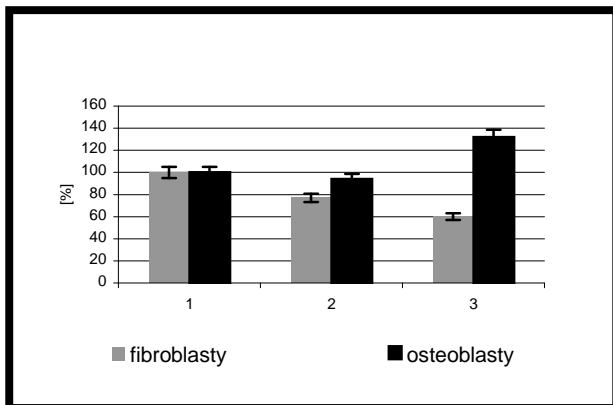
TABELA 1. Wartości kąta zwilżenia dla terpolimeru wyciowego i dla terpolimeru z włóknami z alginianu wapnia  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ .

TABLE 1. Average values of contact angles for terpolymer foil (reference samples), terpolymer mixed with alginate fibres, and the terpolymer covered with short alginate fibres.

As it is shown in TABLE 1, an additive of alginate fibres to the terpolymer changes wettability of the sample surface determined by the values of contact angle. This effect was more significant for the sample having the fibres exposed on surface terpolymer in comparison to the sample in which alginate fibres were distributed in whole volume. Surface texture of the samples was observed in scanning electron microscope (FIG. 1A, B). The composite sample with the fibres introduced into the whole volume is characterized by the smooth surface (A) whereas the sample covered with the short fibres has high roughness and reveals short fragments of alginate fibres on its surface.

Results of activity of mitochondrial dehydrogenase (MTT test) of the cells contacted with the surface of polymer are shown in FIG. 2. The graph illustrates viability of two cellular lines; fibroblasts and osteoblasts. Viability of fibroblasts, after 7 days of the culture are distinctly lower for the surface samples having modified the surface topography, as compared to the samples made of pure terpolymer (reference). Calculation was made assuming that for pure polymer the level of viability and level of collagen were 100%.

Similarly, fibroblasts viability, determined after 7 days, is significantly lower on the surface samples with modified topography comparing to the sample prepared from pure terpolymer (reference sample). The highest viability was observed in the case of osteoblasts for the surface modified with the use of alginate fibres in comparison to both



**RYS. 2.** Prze ywalno komórek na powierzchni terpolimeru: wyj ciowy [1] z dodatkiem 5%  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  [2], pokrytego włóknami  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  [3].  
**FIG. 2.** Cells viability on the surface of materials: reference samples [1] with alginates fibres 5%  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  inside the sample [2], covered by alginates fibres  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  [3].

rem. Natomiast prze ywalno komórek kostnych (osteoblastów) kontaktowanych z modyfikowanymi próbkami jest taka sama jak polimeru (próbka 2) lub znacz co wy sza (próbka z włóknami alginianowymi na powierzchni - 3). Ilo kolagenu typu I, produkowanego przez fibroblasty jak i osteoblasty przedstawia RYS.3. Wzmo on produkcje kolagenu (wy sz ni dla czystego polimeru) stwierdzono u osteoblastów kontaktowanych z próbk zawieraj c włókna w całej obj to ci. Praktycznie nie odnotowano kolagenu na próbkach o zmodyfikowanej powierzchni, wytworzonego przez fibroblasty.

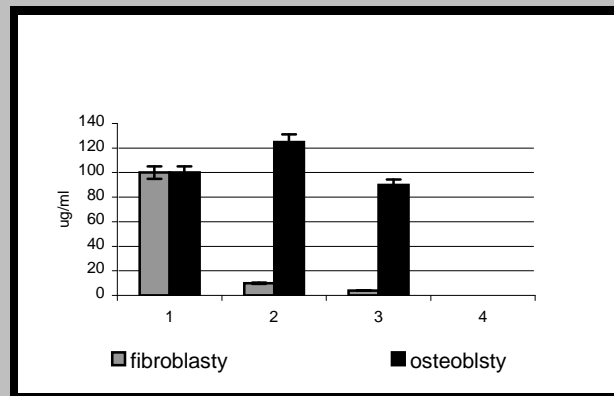
## Wnioski

Wyniki uzyskane w badaniach wskazuj , e modyfikacja terpolimeru przy wykorzystaniu włókien alginianowych wpływa na odpowied komórek w warunkach in vitro. Wprowadzenie włókien alginianowych pod powierzchnie polimeru jak i pokrycie jej włóknem powoduje obni enie warto ci k ta zwil enia (a zatem równie energii powierzchniowej) oraz zmian topografii powierzchni. Modyfikacja powierzchni w odmienny sposób wpływa na komórki linii fibroblastycznej i linii osteoblastycznej. Lepsz prze ywalno na powierzchni modyfikowanego terpolimeru, po 7 dniach hodowli, wykazuj osteoblasty. Ten sam rodzaj komórek jest odpowiedzialny za produkcje znacznej ilo ci kolagenu typu I.

W podsumowaniu mo na stwierdzi , e zmodyfikowanie powierzchni polimeru przy u yciu włókien alginianowych prowadzi do uzyskania materiału stymuluj cego komórki kostne do produkcji kolagenu oraz działaj cego w odmiennym kierunku na komórki linii fibroblastycznej. Wydaje si zatem uprawnione stwierdzenie, e obrana przez nas droga modyfikacji polimeru prowadzi mo e do uzyskiwania implantów, które w warunkach in vivo, zastosowane do leczenia tkanki kostnej nie b d otacza si torebką ł cznotkankow natomiast przyspiesza b d odbudowe ko ci.

## Podzi kowania

Praca ta została wykonana w ramach grantu PZB - KBN-082 - T08/2002, finansowanego przez Komitet Bada Naukowych.



**RYS. 3.** Ilo kolagenu typu I produkowanego przez osteoblasty i fibroblasty na powierzchniach terpolimeru: niemodyfikowanego [1], z 5% dodatkiem  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  [2], pokrytego włóknami  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  [3].  
**FIG. 3.** Level of collagen type I produced by osteoblasts and fibroblasts cells on the surface of materials: reference samples [1] with alginates fibres 5%  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  inside [2], cover by alginates fibres  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  [3].

types of the samples, namely pure polymer, volume-modified polymer containing the fibres in whole volume. Level of type I collagen produced by fibroblasts and osteoblasts is shown in FIG. 3. Higher productions of collagen was observed on the surface of sample 2, contacted with osteoblasts. The collagen produced by fibroblasts was not noted on samples having modified topography of the surface.

## Conclusions

This study describes the effect of surface topography changes of terpolymer on cellular response. An introduction of alginate fibres near the surface region of the polymer as well as covering the surface of polymer with these fibres results in reduction of contact angle (and therefore also surface energy). Moreover, such a procedure allows for modification of surface topography. Modification of the surface topography influences the cellular response in different way. After 7 days' cultures better viability of the cells was obtained on the surface of terpolymer for osteoblasts. The same kind of cells is responsible for productions of considerable higher level of collagen of type I.

Our results demonstrate that the surface of alginate fibres modified- terpolymer leads to improve the selective properties of biomaterial, which can better stimulate the osseous cells for production of collagen. Such a material functions in the opposite way with respect to the fibroblasts. It seems that the proposed procedure of modification of polymer is a promising way to obtain a biomaterial which can be used in the treatment of the diseased bone tissues in controlled manner without encapsulation effect.

## Acknowledgements

This work was supported by the State Committee for Scientific Research (grant PBZ - KBN-082- T08/2002).

[1] Morra M., Della Volpe C. Correlation between substratum roughness and wettability cell adhesion and cell migration J. Biomed. Mater. Res. 42 (1998) 473-474.  
[2] Matsuzaka K., Walboomers X., Yoshinari M., Inoue T., Jansen J., The attachment and growth behavior of osteoblasts - link cells on microtextured surface Biomaterials 24 (2003) 2711-2719.

[3] Klee D., Ademovic Z., Bosserhoff A., Hoecker H., Maziolis G., Surface modification of poly(vinilidene fluoride) to improve the osteoblasts adhesion Biomaterials 24 (2003) 3663-3670.  
[4] Buddy D. Ratner, Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges, Biosensors and Bioelectronics 10,1995, 797-804.