Ewa Stodolak¹

AGH University Science and Technology, Department od Biomaterials, Faculty of Material Science and Ceramics, Mickiewicza 30, 30-059 Krakow e-mail: stodolak@agh.edu.pl

Ewa Zaczynska²

Polish Academy of Sciences, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Weigla 12, 53-114 Wroclaw, e-mail: ezacz@iitd.pan.wroc.pl

Marta Błażewicz³

AGH University Science and Technology, Department od Biomaterials, Faculty of Material Science and Ceramics, Mickiewicza 30, 30-059 Krakow

Dorota Wołowska-Czapnik⁴

Technical University of Lodz, Institute of Man - Made Fibers, Faculty of Textile Engineering and Marketing, Żeromskiego 16, 90-534 Lodz e-mail: czapnikwd@poczta.onet.pl

Rafał Leszczyński⁵

Medical University of Silesia, Department Ophthalamology, Ceglana 35, 40-952 Katowice, e-mail: leszczyn@pronetix.com.pl

MEMBRANOWE MATERIAŁY KOMPOZYTOWE NA POTRZEBY MEDYCZNE - PODSTAWOWE BADANIA MATERIAŁOWE I BIOLOGICZNE

Badaniu poddano serie próbek kompozytowych: włókno z alginianu sodu w osnowie polimeru syntetycznego, różniących się udziałem procentowym włókien (1, 1,5, 2; 2,5 i 3% włókien). Za osnowę kompozytów posłużył terpolimer PTFE-PVDF-PP o zawartości procentowej poszczególnych merów: 56% PTFE, 27% PVDF i 17% PP. Czysta folia polimerowa niezawierająca włókien stanowiła odniesienie w stosunku do próbek kompozytowych. Wprowadzenie włókien z biopolimeru do hydrofobowego materiału polimerowego miało na celu poprawę biozgodności kompozytu. Dodatkowo spodziewano się, że włókna z alginianu sodu, rozpuszczalne w wodzie, ulegną w trakcie inkubacji rozpuszczeniu i wymyciu z osnowy polimerowej, a tym samym utworzą nowy rodzaj materiału: membranę, której średnica porów równa będzie przekrojowi pojedynczego włókna. Badaniu poddano zestaw kompozytów, dla których określono: wielkość kąta zwilżania przed i po wyplukiwaniu włókien, wyznaczono procentowy ubytek masy, a także zmianę grubości kompozytu przed i po inkubacji. Wykonano również test przepuszczalności otrzymanych membran kompozytowych, określając zmianę stężenia soli NaCI po przejściu przez membranę. Test prowadzono przez 14 dni w temperaturze 37°C. Teksturę powierzchni i wzrost udziału porów obserwowano w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM). Membrany kompozytowe do zastosowań medycznych poddano ocenie cytotoksyczności. Próbki kontaktowano z ludzką linią komórek nablonkopodobnych raka pluc po 24 i 72 godz. kontakcie komórka--materiał (ATCC CCL 185 - A549) określano zmiany ilościowe i morfologiczne komórek (odwrócony mikroskop kontrastowofazowy). W celu określenia przeżywalności komórek zastosowano metodę kolorymetryczną - barwienie blękitem trypanu.

Słowa kluczowe: membrany kompozytowe, membrany biomedyczne, materiały polimerowe

MEMBRANE COMPOSITE MATERIALS FOR MEDICAL APPLICATION - PRIMARY MATERIAL AND BIOLOGICAL STUDY

Polymer implant materials have been widely applied in medicine within the past several years. Polymers defined as biostable find use as vascular implants, surgical threads and elements of various types of endoprostheses. They are also useful as laryngological, dental, cardiosurgical and neurological implants. Recently, composites made of polymers combined with such materials as bioactive ceramics, ceramic or carbon fibres, are being increasingly used in clinical practises. Fibrous polymer implants become an alternative to pure ceramic or metal implants in biomaterials engineering. The distribution of fibers in polymer matrix affects not only its mechanical parameters, but also the surface properties, such as wettability, roughness, etc. It seems necessary to examine the effects of fibers on polymer matrix before commencing works on design of composite materials for medical applications. It is also important to define whether composites based on polymer matrix would not be toxic for living cells. The experiments were carried out on polymer membranes made of polymer and soluble alginate fibres. The aim of the work was the analysis of cellular response to polimer matrix, functionalized with use of resorbable (soluble) fibres. Materials in form of membranes and fibre/polymer composites of different microstructures were put in contact with one type of cell under in vitro conditions (viability of cells presented in Tables 2-3). The surface morphology of composite materials was observed using scaning electron microscope Jeol, JSM-5400. Figure 2 AI-EI shows surface images of polymer sample (foil), and surface of composite materials before dissolved the alginate fibres. Figure 2 AII-EII presents the photomicrographs of membrane surfaces. Changes material of masses and thickness of composites during dissolved biopolimer fibres (32 h/80°C) are shown in Table 1. Polymer membranes produced by washing out of alginate fibres have surfaces showing pores of irregular as well as spheroidal shape. This study suggests, that the composite materials which is compounds with biostable matrix and alginate fibres (biopolymer) may be used like membrane in ophthalmology (cornea implants).

Keywords: composiete membrane, biomedical membrane, polimer materials

^{1, 3, 4} phd-student, ² dr, ⁵ dr med.

WSTĘP

Badania nad kompozytowymi membranami biomedycznymi koncentrują się wokół rozwoju technologii wytwarzania materiałów membranowych poprzez taki dobór materiałów, które po pierwsze uwzględniać będą ich parametry materiałowe i fizykochemiczne, a po drugie zapewnią odpowiedni mechanizm separacji związków. Najpopularniejszymi materiałami membranowymi stosowanymi medycynie w są membrany służące do dializy otrzewnowej, hemiperfuzji i perfuzji [1, 2]. Prowadzone są badania nad modyfikacją membran polisulfonowych komórkami śródbłonka, które mają doprowadzić do skonstruowania sztucznego naczynia krwionośnego [2, 3]. Membrany wykorzystuje się również w sterowanej regeneracji kości (GBR) [4-7] jako systemy wspierające (tzw. podporowe) w hybrydowej watrobie (BLSS) [3, 8] czy jako implanty keratocytowe [9]. Obecne badania nad membranami biomedycznymi skupiają się nad skonstruowaniem membran kompozytowych o zdefiniowanej topografii powierzchni i określonym stanie chemicznym powierzchni. Materiały takie mają z jednej strony zapewnić selektywna adsorpcję (a nie tylko separacje związków), a z drugiej powinny być zdolne do wyłapywania konkretnych substancji chemicznych (np. proteiny), które zapewnią np. adhezję i osiadanie komórek na powierzchni membrany [8]. Według Curtisa i wsp. [11], nawet niewielka zmiana mikrotekstury materiału membranowego (rzędu 100 nm) indukuje odpowiedź komórkową. Niezwykle istotną rolę w strukturze membrany pełni rozmiar porów. Membrany o średnicy porów 0,1÷0,8 µm wspomagają regenerację komórek epitelium rogówki, ale już pory, których średnica wynosi 0,9 µm lub więcej, zachowują się względem tych samych komórek jak inhibitory, hamując wzrost i proliferację komórek [8]. Efekt namnażania się lub hamowania wzrostu komórek uzależniony jest nie tylko od wielkości porów membrany, ale także od rodzaju zastosowanych komórek. I tak komórki tkanek skóry dobrze namnażają się na membranie, której średni rozmiar porów to 0,025÷1,2 um, jednak po pewnym czasie te same komórki lepiej proliferują na powierzchni membrany, której rozmiar porów mieści się w przedziale 3÷8 µm [11]. Nadal istotny wydaje się zatem temat odpowiedniego doboru materiałowego z uwzględnieniem docelowego miejsca zastosowania membrany. W niniejszej pracy podjęto próbę wytworzenia kompozytowej membrany polimerowej, otrzymanej z dwóch komponentów: PTFE-PVDF-PP oraz biopolimeru pochodzenia naturalnego: alginianu sodu. Zastosowanie włóknistego biopolimeru pozwoliło na otrzymanie membrany o zmodyfikowanej topografii powierzchni, a jednocześnie charakter chemiczny alginianu (rozpuszczalność w środowisku wodnym) zapewnił litemu dotad kompozytowi polimerowo-włóknistemu porowatość w zakresie do 25%.

MATERIAŁY I METODY

Materiały

Próbki do badań przygotowano, stosując terpolimer PP-PVDF-PTFE (Aldrich Chemical Co., USA, cat. no. 45 458-3) o gęstości d = 1600 g/cm³, który rozpuszczono w acetonie (POCh SA. Gliwice, Polska, cat. no. 102480111). Włókna alginianowe wytworzono w Katedrze Włókien Sztucznych Wydziału Inżynierii i Marketingu Tekstyliów na Politechnice Łódzkiej. Zawartość reszt kwasu guluronowego w tworzywie wynosiła 65÷75%, a zawartość reszt kwasu mannuronowego 25÷35%. Włókna alginianowe rozdrobniono, uzyskując włókna krótkie o średnicy 0,17±0,05 µm i długości 1,5±0,28 mm. W celu otrzymania kompozytowych próbek polimerowych sporządzono roztwór terpolimeru, stosując 5 g PTFE/PVDF/PP na 50 ml acetonu. Przygotowano zestaw naważek włókien alginianowych i rozprowadzono je kolejno w odpowiedniej ilości terpolimeru za pomocą płuczki ultradźwiękowej. Mieszaninę włókien i polimeru pozostawiono do odparowania rozpuszczalnika na 24 h. Otrzymano serie polimerowo--włóknistych kompozytów o następującej zawartości włókien:

- 1% próbka A;
- 1,5% próbka B;
- 2 % próbka C;
- 2,5% próbka D;
- 3% próbka E;
- czysta folia polimerowa R.

Proces rozpuszczania włókien prowadzono jednakowo dla wszystkich rodzajów kompozytów. Kompozyty inkubowano w wodzie w temperaturze 80°C przez 32 h, następnie suszono tak otrzymane membrany do stałej masy w celu stwierdzenia ubytku masy po procesie rozpuszczania biopolimeru. Aby sprawdzić przepuszczalność otrzymanych membran kompozytowych, przeprowadzono test membranowy: przygotowano 0,1M NaCl, który umieszczono w pojemniku, zamykając go membraną, pojemnik z solą umieszczono w wodzie. Efektywność działania membrany (migracja jonów Na⁺ i Cl z roztworu soli do wody przedstawiona jako zmiana stężenia) sprawdzano, mierząc przewodnictwo jonowe wody.

Metody

Charakterystyka materiałów membranowych

Materiały membranowe otrzymano przez wymycie rozpuszczalnych w wodzie włókien z alginianu sodu

(NaAlg). Wszystkie próbki kompozytowe (A-E) poddano inkubacji w wodzie (32 h/80°C). Zmianę kąta zwilżania próbek przed i po czasie wypłukiwania włókien alginianowych zbadano, używając w tym celu aparatu DSA 10 Kruss (Germany). Cieczą pomiarową była woda podwójnie destylowana UHQ o objętości kropli 2,5÷2,8 ml, badanie wykonano w temperaturze pokojowej. Stopień wymycia włókien z kompozytów (A-E) określono, wykonując pomiary zmiany grubości próbki i ubytku masy próbki przed i po czasie inkubacji. Analizę tekstury powierzchni materiałów polimerowych, przed i po 32 h inkubacji w wodzie, w temperaturze 80°C, przeprowadzono, wykonując zdjęcia w elektronowym mikroskopie skaningowym SEM (Jeol JSM - 5400).

Badania cytotokstyczności

Badania cytotoksyczności przeprowadzono na próbce o 2% zawartości włókien alginianowych (C). Badanie wykonano w Laboratorium Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu zgodnie z PN-EN ISO 10993-5 "Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Część 5: "Badania cytotoksyczności: metody in vitro". W tym celu wykorzystano linię komórkową A549 - linia komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc (ATCC CCL 185). Hodowlę komórek A549 prowadzono w płynie hodowlanym Dulbecco z dodatkiem 10% inaktywowanej (30 min, 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny,100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Badania przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek A549 przez 24 oraz 72 godziny. Na płytce 24-dołkowej firmy Costar zakładano hodowlę komórek A549 o gęstości 1x10⁶ ml i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, w atmo- sferze 5% CO₂. Po tym czasie zdejmowano supernantant, a jednowarstwową hodowlę komórek zalewano 1 ml płynem hodowlanym z dodatkiem 2% surowicy cielęcej. Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów (w kształcie krążków o średnicy 96 mm) i inkubowano 24 oraz 72 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Każdy materiał oceniano w 3 powtórzeniach (po 3 na każdy czas).

WYNIKI

Obecność biopolimerowego włókna (NaAlg) wpływa na mikrostrukturę powierzchni i na kąt zwilżania zarówno kompozytów, jak i membran. Średnie wartości kąta zwilżania dla folii z terpolimeru (\mathbf{R}) oraz dla pozostałych próbek kompozytowych (\mathbf{A} - \mathbf{E}) przed poddaniem ich procesowi rozpuszczania i wypłukiwania biopolimeru są wyższe niż po inkubacji próbek w wodzie 32 h/80°C (rys. 1). Efekt ten jest tym silniejszy, im większy jest udział procentowy włókien alginianowych zawartych w objętości polimeru (dla kompozytu o 3% udziale włókien NaAlg, próbka E, obniżenie wartości θ o 7°). Zwilżalność powierzchni próbki z 1% zawartością włókien NaAlg (próbka A) jest bliska zwilżalności folii polimerowej (R). Wnioskować można zatem, że obecne w wyjściowym materiale włókna z biopolimeru zostały zupełnie usunięte w trakcie inkubacji. Wniosek potwierdza zarówno ubytek ten masy, jak i zmiana grubości kompozytów (tab. 1). Dla wykonanych materiałów membranowych przeprowadzono test przepuszczalności, który wykazał, że najbardziej efektywnym materiałem membranowym jest kompozyt z 2% zawartością (próbka C) alginianu sodu (największy wzrost stężenia soli NaCl w wodzie).



- Rys. 1. Wykres zmian kąta zwilżania dla powierzchni próbek kompozytowych, różnych udziałach procentowych włókien z alginianu sodu, przed i po inkubacji w warunkach 32 h/ 80°C H₂O
- Fig. 1. Wettability surface of composites materiales before/after dissolved alginate fibres (32 h/ $80^{\circ}C$ H₂O)
- TABELA 1. Zmiany masy i grubości próbek kompozytowych o różnych udziałach procentowych włókien z alginianu sodu przed wypłukiwaniem i po inkubacji w wodzie 32 h/80°C H₂O
- TABLE 1. Differences in thickness and mass result from dissolving sodium alginate fibres due to incubation in water (32 h/80°C)

Nazwa próbki	Zawartość NaAlg	Ubytek masy włókien %	Zmiana grubości μm
Е	3%	93,96 ±0,01	89 ±1
D	2,5%	95,88 ±0,01	79 ±1
С	2%	$95,95 \pm 0,01$	97 ±1
В	1,5%	97,35 ±0,01	74 ±1
Α	1%	96,14 ±0,01	81 ±1
R	terpolimer	00,00*	0,0*

* masa i grubość foli z polimeru nie uległy zmianie w czasie inkubacji

Teksturę powierzchni obserwowano w skaningowym mikroskopie elektronowym. Wykonano zdjęcia próbek przed i po inkubacji, zmiany topografii powierzchni zamieszczono kolejno na rysunku 2. Próbki przed inkubacją charakteryzują się praktycznie gładką powierzchnią, podobną do powierzchni czystej folii polimerowej. Wyraźnie różnice w mikrostrukturze analizowanych powierzchni obserwuje się pomiędzy materiałami o zmiennej zawartości włókien alginianowych. Im większa ich zawartość, tym materiał staje się bardziej porowaty, z porami o nieregularnym kształcie i rozmieszczeniu.



Rys. 1. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego SEM próbek przed (I) i po (II) procesie inkubacji

Fig. 2. Microstructure of samples from the composite material before (I) and

after dissolved alginate fibres (II)

Najbardziej regularne rozmieszczenie porów powierzchniowych po procesie wypłukiwania włókien z biopolimeru zaobserwowano w próbce C (2% włókien NaAlg). Materiał ten poddano testowi na przepuszczalność membran. Stopień przepuszczalności mierzono poprzez zmianę przewodnictwa jonowego. Wyniki eksperymentu poświadczyły o użyteczności tego materiału jako membrany.

Badania cytotoksyczności przeprowadzono na jednej z wybranych próbek kompozytowych z 2% zawartością NaAlg (C). Wyniki zmian morfologii komórek po kontakcie z badanymi materiałami (folia polimerowa R i próbka z 2% zawartością NaAlg - C), a także wyniki zmian ilości komórek zebrano w tabelach 2 i 3. W tabeli 2 znajduje się zestawienie wyników po 24-godzinnej inkubacji komórek na materiale, a w tabeli 3 zestawienie po 72 godzinach inkubacji komórek nabłonkopodobnych A549 na powierzchni materiału. Żaden z badanych materiałów (R i C) nie wykazuje działania cytotoksycznego, ilość martwych komórek na powierzchni jest tak niska (max 1% komórek martwych po 24 h hodowli i max 3% martwych komórek po 72 h hodowli), że zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5 materiały te nadają się do kontaktu z żywym organizmem. Morfologie komórek na powierzchni materiałów, w odniesieniu do kontrolnej próbki hodowli nabłonkopodobnych komórek A549, obserwowano w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. Serię zdjęć dokumentujących brak zmian morfologicznych komórek pokazano na rysunku 3.

- TABELA 2. Ocena cytotoksyczności komórek nabłonkopodobnych po 24-godzinnym kontakcie z powierzchnią materiału
- TABLE 2. Cytotoxicity estimation of adenocarcinoma lung cells A579 after 24h stay in contact with surface of composite materials

Nazwa próbki	Zmiany morfolo- giczne	Ilość komórek martwych %	Ilość komórek żywych %	Całkowita liczba k-k	Stopień toksycz- ności
R	brak	1	99	5,1x10 ⁶	brak
С	brak	0	100	6,6 x10 ⁶	brak
Kontrola		0	100	7,2 x10 ⁶	brak



Rys. 3. Zmiany morfologii nabłonkopodobnych komórek A549 po 72-godzinnym kontakcie z powierzchnią materiału

Fig. 3. Morphology of cells A549 after 72 h contact with surface materials

- TABELA 3. Ocena cytotoksyczności komórek nabłonkopodobnych po 72-godzinnym kontakcie z powierzchnią materiału
- TABLE 3. Cytotoxicity estimation of adenocarcinoma lung cells A579 after 72 h stay in contact with surface of composite materials

Nazwa próbki	Zmiany morfolo- giczne	Ilość komórek martwych %	Ilość komórek żywych %	Całkowita liczba k-k	Stopień toksycz- ności
R	brak	3	97	5,4x10 ⁶	brak
С	brak	1	99	5,6 x10 ⁶	brak
Kontrola		0	100	7,5 x10 ⁶	brak

WNIOSKI

Włókna alginianowe ulegają rozpuszczeniu i wypłukaniu podczas inkubacji w temperaturze 80°C, proces ten potwierdzony jest spadkiem masy kompozytu i spadkiem grubości kompozytu. Efekt wypłukiwania jest tym silniejszy, im mniejszy jest udział objętościowy włókien w kompozycie. Materiał kompozytowy przeznaczony na membranę nie wykazuje cytotoksyczności, co oznacza, że może być stosowany do kontaktu z żywym organizmem.

Praca finansowana ze środków na badania statutowe 11.11.160.116.

LITERATURA

- Bączyk K., Draber W., Ocena epidemiologiczna przewlekłej niewydolności nerek, Nefrologia i Dializoterapia Polska 1999, 4.
- [2] Ye Sang Ho, Watanabe Junji, Takai Madoka, Iwasaki Yasuhiko, Ishihara Kazuhiko, Design of functional hollow fiber membranes modified with phospholipid polymers for

application in total hemopurification system, Biomaterials 2005, 26, 24, August, 5032-5041.

- [3] Krasteva N., Seifert B., Albrecht W., Weigel T., Schossig M., et. al., Influence of polymer membrane porosity on C3A hepatoblastoma cell adhesive interaction and function, Biomaterials 2004, 25, 13, June, 2467-2476.
- [4] Kikuchi Masanori, Koyama Yoshihisa, Yamada Takeki, Imamura Yukari, Okada Takao, Shiahama Noriaki, et. al., Development of guided bone regeneration membrane composed of b-tricalcium phosphate and poly (l-lactide-co-glycolide-co-?-caprolactone) composites, Biomaterials 2004, 25, 28, December, 5979-5986.
- [5] Fujihara K., Kotaki M., Ramakrishna S., Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers, Biomaterials 2005, 26, 19, July, 4139-4147.
- [6] Gogolewski S., Pineda L., Michael Büsing Carl, Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? Biomaterials 2000, 21, 24, December, 2513-2520.
- [7] Dai N.-T., Williamson M.R., Khammo N., Adams E.F., Coombes A.G.A., Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin, Biomaterials 2004, 25, 18, August, 4263-4271.
- [8] Zhang Kai, Wu Xiao Yu, Temperature and pH-responsive polymeric composite membranes for controlled delivery of proteins and peptides, Biomaterials 2004, 25, 22, October, 5281-5291.
- [9] Gerkowicz M., Pożarowska D., Wybrane techniki chirurgiczne stosowane w leczeniu jaskry, Magazyn Okulistyczny 2004, 2.
- [10] Mikołajczyk T., Domagała J., Water-solube alginate fibers for medical applications, Fibers and textils in ekstern Europe, June-September, 2001, 20-23.
- [11] Berry C.C., Campbell G., Spadiccino A., Robertson M., Curtis A.S.G., The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility, Biomaterials 2004, 25, 5781-5788.

Recenzent Janusz Braszczyński