

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST  
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

**Number 141**  
Numer 141  
**Volume XX**  
Rok XX

**JULY 2017**  
LIPIEC 2017

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**  
WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Krakow**  
Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

**EDITORIAL  
COMMITTEE:**  
KOMITET  
REDAKCYJNY:

**Editor-in-Chief**  
Redaktor naczelny  
**Jan Chłopek**

**Editor**  
Redaktor  
**Elżbieta Pamuła**

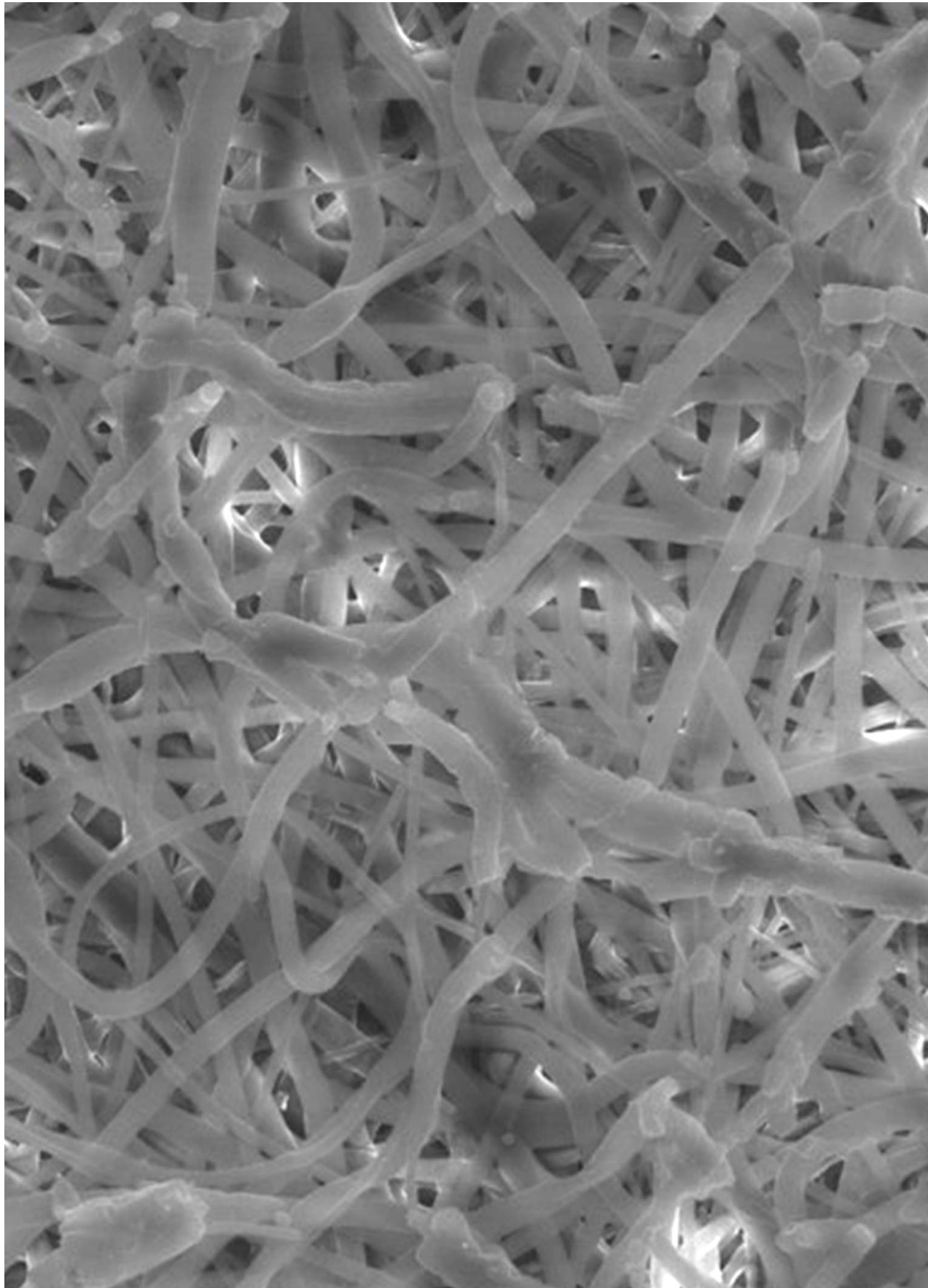
**Secretary of editorial**  
Sekretarz redakcji  
**Design**  
Projekt  
**Katarzyna Trała**  
**Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF  
EDITORIAL OFFICE:**  
ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST**  
**30/A3, Mickiewicz Av.**  
**30-059 Krakow, Poland**  
Akademia  
Górniczno-Hutnicza  
al. Mickiewicza 30/A-3  
30-059 Kraków

**Issue: 250 copies**  
Nakład: 250 egz.

**Scientific Publishing  
House AKAPIT**  
Wydawnictwo Naukowe  
AKAPIT  
e-mail: [wn@akapit.krakow.pl](mailto:wn@akapit.krakow.pl)



**EDITORIAL BOARD  
KOMITET REDAKCYJNY**

**EDITOR-IN-CHIEF**

Jan Chłopek - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

**EDITOR**

Elżbieta Pamuła - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD  
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

Lucie Bacakova - ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Romuald Będziński - UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA, POLAND

Marta Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Stanisław Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Maria Borczuch-Łączka - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski - BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM

Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM

Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Ireneusz Kotela - CENTRAL CLINICAL HOSPITAL OF THE MINISTRY OF THE INTERIOR AND ADMINISTR. IN WARSAW, POLAND

Małgorzata Lewandowska-Szumieł - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Jan Marciniak - SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Ion N. Mihailescu - NATIONAL INSTITUTE FOR LASER, PLASMA AND RADIATION PHYSICS, BUCHAREST, ROMANIA

Sergey Mikhailovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - KOSZALIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

Piotr Niedzielski - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Abhay Pandit - NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY, IRELAND

Stanisław Pielka - WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

Vehid Salih - UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, LONDON, UNITED KINGDOM

Jacek Składzień - JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW, POLAND

Andrei V. Stanishevsky - UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

Anna Ślósarczyk - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Tadeusz Trzaska - UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ, POLAND

Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: [kabe@agh.edu.pl](mailto:kabe@agh.edu.pl).
4. Struktura artykułu:
  - TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe (4-6) • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Autorzy przesyłają pełną wersję artykułu, łącznie z ilustracjami, tabelami, podpisami i literaturą w jednym pliku. Ilustracje, tabele, podpisy i literatura powinny być umieszczone również w wersji angielskiej. Artykuł w tej formie przesyłany jest do recenzentów. Dodatkowo autorzy proszeni są o przesłanie materiałów ilustracyjnych (rysunki, schematy, fotografie, wykresy) w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie.
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzentów będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:
  - Czasopismo
  - „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
  - Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
  - Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
  - al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków
  - tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61
  - tel./fax: (48) 12 617 45 41
  - e-mail: [chlopek@agh.edu.pl](mailto:chlopek@agh.edu.pl), [kabe@agh.edu.pl](mailto:kabe@agh.edu.pl)

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma:  
[www.biomat.krakow.pl](http://www.biomat.krakow.pl)

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres: [apowroz@agh.edu.pl](mailto:apowroz@agh.edu.pl), tel/fax: (48) 12 617 45 41  
Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN  
Konto:  
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów  
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3  
ING Bank Śląski S.A. O/Kraków  
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Prenumerata obejmuje 4 numery regularne i nie obejmuje numeru specjalnego (materiały konferencyjne).

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to [kabe@agh.edu.pl](mailto:kabe@agh.edu.pl).
4. A manuscript should be organized in the following order:
  - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (200-250 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:
  - Journal
  - „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
  - AGH University of Science and Technology
  - Faculty of Materials Science and Ceramics
  - 30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland
  - tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61
  - tel./fax: (48) 12 617 45 41
  - e-mail: [chlopek@agh.edu.pl](mailto:chlopek@agh.edu.pl), [kabe@agh.edu.pl](mailto:kabe@agh.edu.pl)

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website:  
[www.biomat.krakow.pl](http://www.biomat.krakow.pl)

## Subscription terms

Subscription rates:  
Cost of one number: 20 PLN  
Payment should be made to:  
Polish Society for Biomaterials  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland  
ING Bank Śląski S.A.  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Subscription includes 4 issues and does not include special issue (conference materials).



Join the ISBPPB 2018 Conference to hear the latest research findings on polymers in medicine and enjoy many opportunities to network with colleagues and new friends from all over the world

# 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials

15–18 July 2018, Kraków, POLAND



### ISBPPB 2018 topics:

biodegradable polymers, hydrogels, polysilanes, polysaccharides, polyurethanes, polymer foams, smart polymers, shape memory polymers, polymers for dental and orthopedic applications, blood-contacting polymers, polymers for skin grafting, polymers for targeted drug delivery, polymers for tissue engineering, **and many more**

### ISBPPB 2018 program:

- Plenary/Invited Lectures
- Oral Presentations
- Young Researcher Presentations
- Poster Session
- Exhibitions

[www.isbppb2018.org](http://www.isbppb2018.org)



## SPIS TREŚCI

EVALUATION OF <i>CANDIDA ALBICANS</i> ADHESION ON AISI-316L AND Ti6Al4V IN CHANGING ENVIRONMENTAL CONDITIONS ALEKSANDRA JASTRZĘBSKA, WITOLD JAKUBOWSKI, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, BOGDAN WALKOWIAK	<b>2</b>
A TUBULAR POLYCAPROLACTONE/HYALURONIC ACID SCAFFOLDS FOR NASAL CARTILAGE TISSUE ENGINEERING SAMUEL JATTEAU, ANNA KUROWSKA, MAGDALENA ZIĄBKA, IZABELLA RAJZER	<b>8</b>
ADHEZJA WARSTW SiO <sub>2</sub> NANIESIONYCH METODĄ ALD I ZOL-ŻEL NA STAL 316LVM MARCIN BASIAGA, WITOLD WALKE, ANITA KAJZER, WOJCIECH KAJZER, MARCIN STASZUK, PRZEMYSŁAW KURTYKA	<b>13</b>
OPERACYJNE LECZENIE ZŁAMANIA KOŚCI ZA POMOCĄ DRUTÓW KIRSCHNERA U MŁODEGO KOTA MAGDALENA ZIĄBKA, PIOTR DERKOWSKI	<b>20</b>

## CONTENTS

EVALUATION OF <i>CANDIDA ALBICANS</i> ADHESION ON AISI-316L AND Ti6Al4V IN CHANGING ENVIRONMENTAL CONDITIONS ALEKSANDRA JASTRZĘBSKA, WITOLD JAKUBOWSKI, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, BOGDAN WALKOWIAK	<b>2</b>
A TUBULAR POLYCAPROLACTONE/HYALURONIC ACID SCAFFOLDS FOR NASAL CARTILAGE TISSUE ENGINEERING SAMUEL JATTEAU, ANNA KUROWSKA, MAGDALENA ZIĄBKA, IZABELLA RAJZER	<b>8</b>
ADHESION OF SiO <sub>2</sub> LAYERS DEPOSITED BY MEANS OF SOL-GEL AND ALD METHODS ON 316LVM STEEL MARCIN BASIAGA, WITOLD WALKE, ANITA KAJZER, WOJCIECH KAJZER, MARCIN STASZUK, PRZEMYSŁAW KURTYKA	<b>13</b>
OPERATIVE TREATMENT OF BONE FRACTURE WITH KIRSCHNER WIRES - YOUNG CAT CASE MAGDALENA ZIĄBKA, PIOTR DERKOWSKI	<b>20</b>

# EVALUATION OF *CANDIDA ALBICANS* ADHESION ON AISI-316L AND Ti6Al4V IN CHANGING ENVIRONMENTAL CONDITIONS

ALEKSANDRA JASTRZEBSKA<sup>1\*</sup>, WITOLD JAKUBOWSKI<sup>1</sup>, KRZYSZTOF JASTRZEBSKI<sup>2</sup>, BOGDAN WALKOWIAK<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, MECHANICAL FACULTY, LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, STEFANOWSKIEGO 1/15 ST., 90-924 LODZ, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND FUNCTIONAL MATERIALS, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, MECHANICAL FACULTY, LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, STEFANOWSKIEGO 1/15 ST., 90-924 LODZ, POLAND

<sup>3</sup> BIO-NANO-PARK LABORATORIES OF LODZ REGIONAL PARK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 114/116 DUBOIS ST., 93-465 LODZ, POLAND

\* E-MAIL: ALEKSANDRA.JASTRZEBSKA@DOKT.P.LODZ.PL

## Abstract

Currently, studies on the formation of microbiological biofilm on biomaterial surfaces and medical devices have become an important aspect in medicine. *In vivo* studies of the biofilm development show a high correlation between the environmental factors and attachment of microorganisms to artificial surfaces. This paper is devoted to determining the impact of specific environmental stimuli and parameters of cultivation of *Candida albicans* yeasts on their adhesion to AISI-316L and Ti6Al4V substrates.

Environmental parameters include variable glucose concentrations in YPG growth medium (0, 2, 4 and 10% wt.). Development of yeasts was also analyzed in terms of variable nutrients level i.e. transferring samples from medium with low nutrients level to other with higher glucose content. Another studied parameter was incubation time and how much fungal colonization varies during 24 and 48 h of incubation. For all samples, the number of both live and dead cells was taken into account.

The results showed that with the increase in sugar content in culture media, biofilm development was observed, especially on AISI 316L surface. Also, significant changes in the number of adhered cells were observed with higher glucose concentration in medium after 24 h of incubation. Almost similar number of attached cells was observed for low glucose concentrations on both studied materials.

**Keywords:** biofilm, *Candida albicans*, glucose level, culture conditions, biomaterials

[*Engineering of Biomaterials* 141 (2017) 2-7]

## Introduction

Human body is a host environment for a great number of bacteria and fungi, many of which play an important role in an appropriate functioning of the human organism. However, there are plenty of pathogenic microorganisms that instead of helping can be very infectious and cause many severe diseases. Mostly vulnerable to these types of infections are patients with immunodeficiency, after hospitalization, long medical treatment, operation or implantation. Many of diseases caused by microorganisms take place not only by actions of bacteria or fungi themselves, but according to World Health Organisation (WHO), the most serious are those caused by bacterial or fungal biofilms. Approximately 65-80% of all bacterial and fungal infections are accused of being caused by biofilm on implants and medical devices.

Biofilm formation is a process involving creation of a heterogeneous structure composed of extracellular matrix surrounding bacterial or fungal cells [1]. After initial attachment to material's surface, microorganisms attach to each other and aggregate by means of self-created matrix (EPS) composed of polysaccharides and peptides. In final stages of biofilm formation, detachment of cells from biofilm takes place as they come back to planktonic forms in order to spread through the surrounding environment [2].

There can be many factors contributing to the adhesion of microorganisms to different surfaces. Among them, there are not only parameters concerning surface characteristics like its topology [3] or chemical composition [4,5], but also those related to environment in which biofilm is formed. Environmental conditions due to which biofilm formation is regulated can be: temperature, pH [6], flow in medium, presence of nutrients (carbohydrates, mineral salts, water, amino acids, fats), gases (oxygen, carbon dioxide) and pressure [7,8].

Biofilm-related infections are a very serious problem concerning medical implants. Microbial colonization can affect any kind of surface, no matter if it is artificial (metal, polymer) or biological (host tissues). One of the most dangerous fungi that causes many severe diseases are *Candida* spp. One of them, *Candida albicans* is pathogenic yeast accused of contributing to plenty of opportunistic mycoses. They cause a lot of circulatory system infections and are one of the reasons of oral cavity inflammations [9].

Studies of surface colonization are often performed in normalized conditions. However, in everyday life it is very difficult to control biofilm formation in a dynamically changing environment similar to human organism. This work concerns thus on evaluation of changes of fungal biofilm formation with different environmental conditions present like variable nutrient level, time of incubation and surface chemical composition.

## Materials and Methods

### Substrate preparation and surface characterisation

In the study two different types of materials were investigated. These were circular disks ( $\varphi = 16$  mm,  $h = 8$  mm) of AISI-316L stainless steel (made of iron with admixtures of: 17-19% Cr, 12-14% Ni, 2-3% Mo, max 2% Mn, max 0.75% Si, max 0.5 Cu, max 0.1% N, max. 0.03% C, 0.025% P, 0.01% S) and titanium alloy Ti6Al4V. Before microbiological tests, all disks were ground at different grades – 120, 320, 600, 800, 1200 and 2400, and then polished mechanically to obtain a mirror-like surfaces. Then, surfaces were washed in distilled water and in acetone in order to degrease. In macroscopic evaluation, they did not have and visible scratches or any other surface defects.

In order to evaluate if the substrates topography would have not affected colonization of microorganisms, mechanical profilometer was used. Investigated roughness parameters were Ra (roughness average), Rz (average distance between highest peak and lowest valley in each sampling length), Rp (maximum peak height) and Rmax (maximum roughness). 5 substrates were evaluated, 3 times each. Measurement length was 4.8 mm.

### Culture media preparation

In order to study the microbial colonisation of metal disk surfaces, *Candida albicans* yeasts were chosen. Those microorganisms were incubated in YPG liquid culture medium, composed of glucose, yeast extract and gelatine pepton G. All media before inoculation were autoclaved for 21 min at 126°C.

### Biofilm formation study due to the environmental changes

The influence of environmental factors like time of incubation and also increasing amount of glucose in culture media were evaluated. The amount of the glucose content was determined on the basis of literature findings in this content [10-12].

Increasing amount of glucose in YPG culture medium was investigated for 0, 2, 4 and 10% solutions of that sugar. Following the 24 and 48 h incubation time, all measurements of the samples were performed.

Moreover, variable amount of glucose in media during incubation was investigated. This experiment was conducted to evaluate, how the amount of attached cells changes during 24 h incubation performed in lower concentration of glucose, and then – during the next 24 h incubation in higher glucose concentration solution. That rearrangement was performed for samples transferred from:

- 0% glucose culture medium to 2% one,
- 2% glucose culture medium to 4% one, and
- 4% glucose culture medium to 10% one.

All samples were incubated in glass flasks in temperature 37°C.

### Evaluation of number of attached cell

For the measurement of the number of *Candida albicans* cells attached to titanium and steel surfaces, fluorescence optical microscopy technique and LIVE/DEAD test were used. Before microscopic evaluation samples were put out of the flasks with growth media and rinsed gently in distilled water in order to get rid of remains of suspension and unattached cells. *C. albicans* cells were observed using fluorescence microscope Olympus GX 71 equipped with a digital camera (DP70) - fluorescent dyes used in this procedure involved bis-benzamidine and propidium iodide (Molecular Probes).

### Calculations and statistical analysis

Next step was calculation of the number of cells attached to metallic surfaces, classified as dead and alive ones. Counting was performed with ImageJ software with the help of Cell counter analyser in-built in that programme. At last, for all calculations of the number of live and dead cells attached to samples, for both substrates and for different incubation time, statistical analysis including two-way analysis of variance (ANOVA) test was performed. It was assumed, that if p value was less than 0.1, the mean values of cells attached to metal surfaces were considered significantly different.

## Results and Discussion

### Surface topography characterisation

Investigation of surface topography has proved that the samples with studied roughness level do not influence the fungal colonisation of those samples. Results of roughness parameters for investigated samples are presented in TABLE 1.

As results in TABLE 1 indicate, the mean values of the Ra parameter for both AISI-316L and Ti6Al4V do not exceed 0.2 µm. Single *Candida albicans* cell has a diameter in range of 3 to 5 µm. Thus, roughness level of metal disks is about one order of magnitude lower than size of fungal cell.

**TABLE 1. Roughness of metal disks used in the experiment.**

	Ra [µm]	Rmax [µm]	Rz [µm]	Rp [µm]	Rpk [µm]
<b>AISI-316L</b>	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00
<b>Ti6Al4V</b>	0.01 ± 0.00	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01

### Effect of sugar concentration and incubation time on biofilm formation

For different glucose concentrations in the culture medium – 0, 2, 4 and 10%, after 24 h of incubation, it is easy to notice significant statistical differences in the number of cells attached to the surfaces of metal disks. Only for 48 h of incubation on titanium samples, there were observed no statistically significant differences between the results. With an increase in glucose concentration in the culture medium there was observed an increase in the number of attached cells on the surface of stainless steel. Qualitatively different result was obtained for titanium alloy, where the highest number of cells was observed at 4% glucose concentration. The lowest number of cells adhered to the surface immersed in 2% glucose solution was observed. Also, for 10% glucose solution there were fewer cells attached to the titanium disks than in the case of colonisation in 4% glucose solution, but these differences were not statistically significant.

Moreover, when there was no glucose in culture medium, for both surfaces, the conversion of yeasts from spherical blastospores to filamentous hyphae takes place. Hyphae formation happened due to the unfavourable environmental conditions in media. Those structures are presented in the images from fluorescent microscope in FIG. 1.

In medium containing no glucose, on titanium surfaces were found mycelium forms of *Candida albicans* cells which contributed to 13% of all live, and 18% of dead cells in comparison to blastospores. Similar results were observed for AISI-316L substrates.

Exemplary biofilm structure created by *Candida albicans* cells that are attached to metal disks' surfaces are presented in FIG. 2.

The same experiment, repeated for glucose concentrations 0, 2, 4 and 10% after 48 h of incubation showed, that in this situation also the number of cells adhered to the metal surface increase when glucose level is elevated from 2 to 10%.

For AISI-316L, in medium with 0 and with 10% glucose, the number of living cells adhering to the metal disks increased significantly, comparing to measurements after 24 h. However, for the experiment in culture media with 2 and 4% of glucose, the number of both live and dead cells decreased.



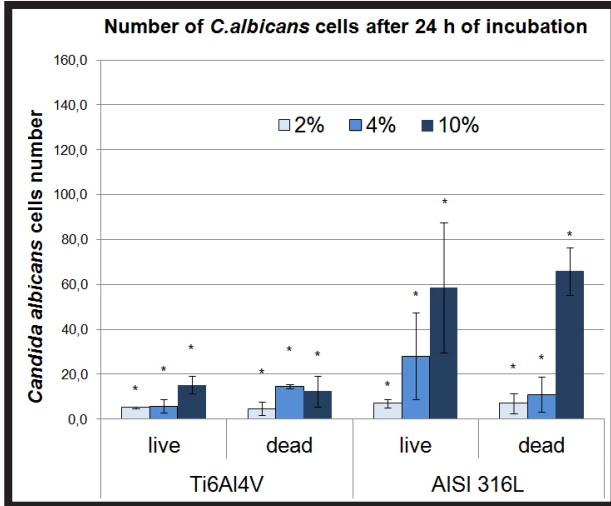


FIG. 1. Number of live and dead *Candida albicans* cells attached to titanium alloy and stainless steel substrates after 24 h of incubation.

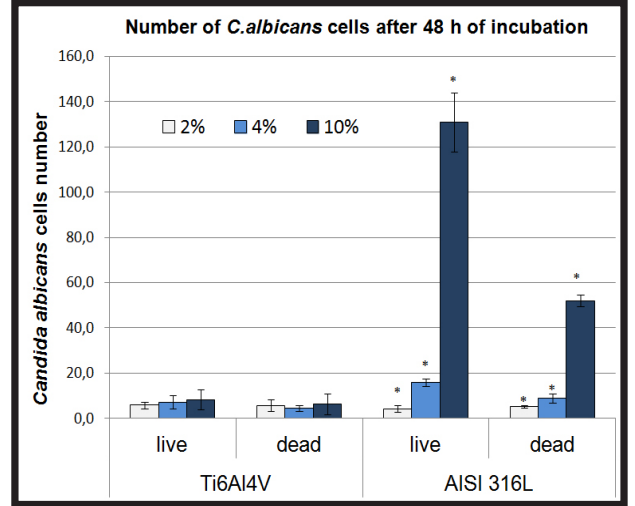


FIG. 3. Number of live and dead *Candida albicans* cells attached to titanium alloy and stainless steel substrates after 48 h of incubation.

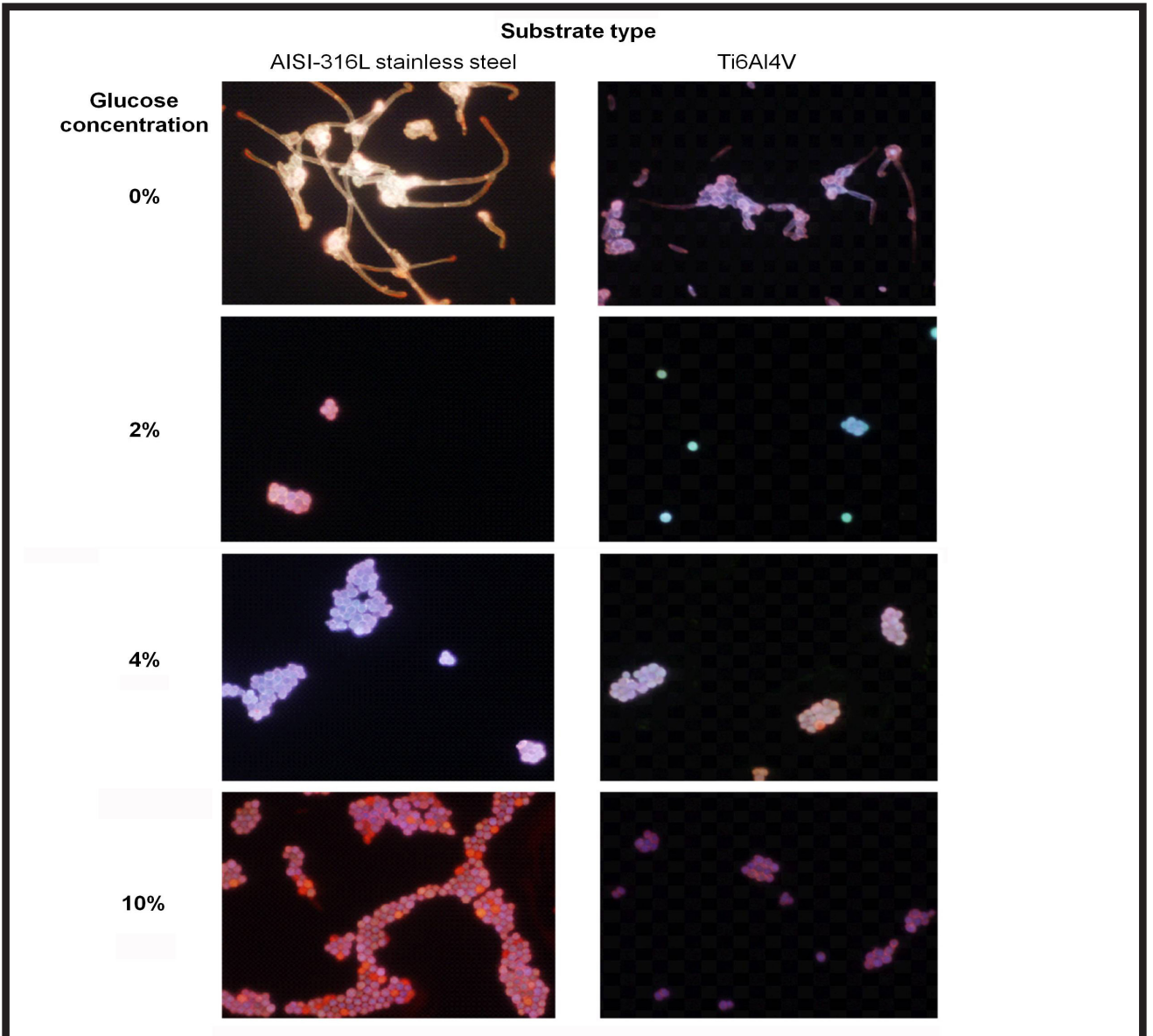


FIG. 2. Formed biofilm structures after 24 h of incubation. Images taken by means of fluorescence microscopy (magnification 500x).

Slightly different situation was observed for titanium disks. After 48 hours of incubation, using glucose-free medium, there was observed a significant decrease in number of live cells attached to the surface in comparison to other media. There were many more dead cells on the substrate than alive ones. In any other media, a decrease in number of both live and dead cells attached to titanium surface was visible. That could be an effect of reduction of nutrient source near the metal surface.

What is interesting, only on samples incubated for 48 h in the culture medium containing 4% glucose, similarly on AISI-316L and titanium alloy, there were observed residues of the formerly attached biofilm structures on the metal disks' surfaces (FIG. 3). The most interesting is the fact, that this effect has not been observed for any other glucose concentrations. Further analysis of that phenomenon could lead to better understanding of mechanisms leading to detachment of cells only in predetermined environmental conditions.

#### Effect of changing sugar concentration in medium on biofilm formation

Another examined dependence of sugar concentration in growth medium on cells adhesion to the substrate was the number of both live and dead cells attached to the surface after incubation for 24 h in medium containing lower amount of glucose, and then transferring samples for another 24 h to medium with higher sugar concentration.

The results of the number of cells attached to AISI 316L and Ti6Al4V after increasing the glucose concentration in culture media after 24 h of samples incubation are presented in TABLE 2.

As a result of transferring samples from medium with lower glucose concentration to medium with higher one, several results were observed:

- for both substrates, the number of both live and dead cells when samples were taken from medium with 0% sugar and were passed to 2% glucose solution was higher than for 2% medium itself,
- on AISI-316L, when samples were passed from 2 to 4% glucose solution and from 4% to 10% glucose solution, the number of live cells colonizing surface grew significantly,
- on titanium alloy, when samples were passed from 2% to 4% solution and from 4% to 10% there were observed no significant differences in number of adhered cells, both live and dead.

*C. albicans* are pathogenic yeasts responsible for many severe bloodstream infections and candidiasis. It is also a microorganism present frequently in diabetic patients' oral cavities – generally diabetic patients are predisposed to fungal infections due to elevated glucose levels. What is more, when glucose level is elevated in the oral cavity and in saliva, the growth of yeasts and their adherence to epithelial cell and dental materials in oral cavity can be increased [13]. In the study of Tapper-Jones *et al.* (1981), the oral candidal population was present in 60% of examined diabetic patients in comparison to 42% of healthy controls [14]. For diabetic patients, the candidal density was also much higher. Similar results were presented by Zomorodian *et al.* (2016), in which they showed the *Candida* carriage rate and density were much higher for patients with diabetes compared to healthy ones (almost 68% of diabetics compared to about 50% of healthy individuals with *Candida* carriage) [15]. However, no study has focused directly on the level of glucose concentration in media onto *C. albicans* colonization of abiotic surfaces.

In this study, the aim was to investigate the impact of the variable glucose level in growth medium and incubation time on *C. albicans* colonisation of stainless steel AISI-316L and titanium alloy Ti6Al4V.

One of the important parameters influencing microbiological biofilm formation is substrate roughness. In this study, mean value of Ra parameter did not exceed 0.1  $\mu\text{m}$ , which is more than one order of magnitude lower value than diameter of a single *C. albicans* cell. According to Flint *et al.* (2000), dependence of that type indicates, that the roughness of substrates can significantly affect the microbiological biofilm formation onto that surface [16]. The results found in literature demonstrated that the higher is roughness of the substrate, the highest number of cells would adhere to its surface [17,18].

To normally function, each living organism needs almost an uninterrupted access to water and nutrients as mineral salts, amino acids and carbohydrates, being the main source of energy for bacterial and fungal cells. Presence of carbohydrates in medium is especially significant in fungal biofilm development. Already in the 80s, the study performed by Samaranayake *et al.* (1980) and McCourtie *et al.* (1984) revealed that *Candida albicans* adhesion is favoured by high monosaccharides content like glucose, fructose or mannose [19,20].

TABLE 2. Mean number of live and dead cells when changing the sugar concentration in medium.

Substrate	2% after 0%		2%	
	Live	Dead	Live	Dead
AISI 316L	7.3 $\pm$ 1.4	4.3 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 1.6	1.5 $\pm$ 0.6
Ti6Al4V	12.8 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.7
	4% after 2%		4%	
	Live	Dead	Live	Dead
AISI 316L	39.2 $\pm$ 11.7	6.5 $\pm$ 5.3	17.5 $\pm$ 3.5	14.6 $\pm$ 0.7
Ti6Al4V	8.2 $\pm$ 3.7	5 $\pm$ 1.1	5.8 $\pm$ 2.4	14.7 $\pm$ 0.8
	10% after 4%		10%	
	Live	Dead	Live	Dead
AISI 316L	29.2 $\pm$ 9.7	13.4 $\pm$ 1.7	58.7 $\pm$ 28.9	66 $\pm$ 10.6
Ti6Al4V	4.9 $\pm$ 1.3	2.4 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 1.5	2.3 $\pm$ 0.6

That effect was connected with the changes that take place in fungal cellular membrane in presence of high sugar concentrations. Newest studies confirm these results, also stating that the highest influence on fungal and bacterial adherence takes place when monosaccharide dissolved in growth medium is glucose [21]. Moreover, research conducted by Abu-Elteen (2005) proves that the growing amount of any carbohydrate in the culture media has the positive effect on the *Candida albicans* colonisation of the materials surfaces [22]. In our study, a non-linear dependence of glucose level on amount of *C. albicans* cells attached to both titanium and stainless steel surfaces was observed (see FIG. 1 and 3).

Not only high level of carbohydrates in growth medium can positively affect the microbiological biofilm formation, but also when medium is deprived of any source of glucose, some positive changes take place. In growth media with very low nutrients level, biofilm is also formed on material surface, but with its extracellular matrix getting more dense [23,24].

In this study, when no glucose was present in growth medium, the conversion of spherical blastospores to filamentous hyphae took place. Similar results were previously stated by Si *et al.* (2013) [25]. The formation of hyphae forms happened due to unfavourable environmental conditions present in culture media.

For AISI-316L, in medium with 10% of glucose, the number of living cells adhering to the metal disks after 48 h increased significantly in comparison to measurements after 24 h. However, for the experiment in culture media with 2 and 4% of glucose, the number of both live and dead cells was lower. Slightly different situation was observed for titanium samples. After 48 h of cultivation, in medium with no glucose, in comparison to other media, there was observed a significant decrease in number of live cells attached to the surface. There were much more dead cells on the substrate than alive ones. In any other media a lower number of both live and dead cells attached to titanium surface was observed. That could be an effect of the reduction of nutrients source near the metal surface.

The statistical considerations by ANOVA showed, that for colonisation of AISI 316L in all conditions, differences were statistically significant. However, for titanium alloy Ti6Al4V, statistical significance of the obtained results was reached only for 24 h cultivation, while the results for 48 h were insignificant.

In clinical investigations of candidiasis, mycelium form of *C. albicans* cells is considered as more infectious and dangerous for human health. Cells in form of hyphae allow to attach their colonies to the substrate surface in unfavourable environmental conditions. It is also worth remembering, that a biofilm formed on abiotic surfaces is much easier to be removed when fungal cells, that are creating this structure, are in form of blastospores rather than hyphae [26].

Comparing the results for *Candida* colonisation in medium with and without glucose could be useful in studies involving creation of pathogenic *Candida* biofilm. Medium deprived of nutrients allows to observe microbiological biofilm composed both with blastospores and hyphae. Also, experiments conducted with this type of growth medium would allow testing different materials' resistance to bacterial or fungal adhesion.

Variable carbohydrates source is also a factor influencing the number of cells adhered to metallic substrates. In this study, when increase of carbohydrates source took place from 0% to 2% in growth medium, a disappearance of hyphae was observed. Less filamentous cells on surface could be connected with enrichment the environment with easily accessible nutrient source and as a result, there was no need for *Candida* cells to transform themselves into more resistant forms.

When glucose level was elevated from 2% to 4%, and from 4% to 10% in growth medium, an increase in live cells number on the biomaterials' surface was well visible. This effect could result from increased lifetime of fungal cells in presence of high sugar content in medium. The increase in the glucose content in the culture media after first 24 h of incubation resulted in almost 2 times increase in the number of adhered cells both to titanium and steel – rising the glucose level was a very strong signal for cells to develop and form biofilm structures. The smallest rise was observed while transferring samples from culture media with 4% of glucose to those with 10%. Perhaps, this was due to the fact that there were too much carbohydrates in the medium and thus, cells were unable to fully use the source of carbon and energy to grow. Another suggestion is that cells got a signal to start the detachment from biofilm structures, which equals stopping of the further biofilm formation. What is more, biofilm formation is continuously influenced by the environmental changes as reported by Nguyen *et al.* (2014) [6]. The number of attached cells significantly changes over time. Ramage *et al.* also described the dependence of microbiological biofilm formation over time [27]. In this study, XTT analysis revealed steps of *C. albicans* biofilm formation as a function of time. First 2 h was characterized by initial adherence of yeast cells, germination and micro-colonies formation, next 2 h for filamentation, another for monolayer development. After 8 h of incubation, proliferation took place and between 24 and 48 h – biofilm maturation. Those results are consistent with the dependence of number of attached cells on incubation time as calculated in this study. After 48 h incubation, in the same environmental conditions, decrease in number of cells both live and dead was obtained. That phenomenon could result from biofilm maturation and cells detachment from the substrate.

## Conclusions

The study revealed that environmental changes like variable nutrients level or incubation time influence biofilm formation on biomaterials surfaces. As presented data reveal, there is a similar number of adhered cells of *C. albicans* in media containing 2 and 4 % of glucose both in the case of AISI-316L and Ti6Al4V surfaces. On the other hand, the highest content of glucose leads to flourishing of biofilm on stainless steel substrates, especially after 48 h of incubation (mean number of living cells reached over 130). It may be connected with worse antimicrobial properties of steel substrate in comparison to Ti6Al4V, especially in the case of prolonging incubation. Nevertheless, in medium without glucose, *C. albicans* cells more willingly inhabit titanium alloy. Moreover, increasing the glucose concentration in the culture media provoked the fungal growth on both substrates.

## Acknowledgments

*This work was financed from the resources assigned to statutory activity of the Institute of Materials Science and Engineering at Lodz University of Technology.*



## References

- [1] Costerton J.W., Donlan R.M., Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2002) 167-193.
- [2] Arciola C.R., Campoccia D., Speziale P., Montanar L., Costerton J.W.: Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33 (2012) 5967-5982.
- [3] Awad A.M., Ghazy E.A., Abo El-Enin S.A., Mahmoud M.G.: Electropolishing of AISI 304 stainless steel for protection against SRB biofilm. *Surface & Coatings Technology* 206 (2012) 3165-3172.
- [4] Hancock V., Witso I.L., Klemm P.: Biofilm formation as a function of adhesion, growth medium, substratum and strain type. *International Journal of Medical Microbiology* 301 (2011) 570-576.
- [5] Li J., Hirota K., Goto T., Yumoto H., Miyake Y., Ichikawa T.: Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *Journal of Dentistry* 40 (2012) 686-692.
- [6] Nguyen H.D.N., Yang Y.S., Yuk H.G.: Biofilm formation of *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT- Food Science and Technology* 55 (2014) 383-388.
- [7] Bazaka K., Jacob M.V., Crawford R.J., Ivanova E.P.: Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (2012) 299-311.
- [8] Liu Y., Wang J.-C., Ren L., Tu Q., Liu W.-M., Wang X.-Q., Liu R., Zhang Y.-R., Wang J.-Y.: Microfluidics-based assay on the effects of microenvironmental geometry and aqueous flow on bacterial adhesion behaviours. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 1 (2011) 175-183.
- [9] Chi H.-W., Yang Y.-S., Shang S.-T., Chen K.-H., Yeh K.-M., Chang F.-Y., Lin J.-C.: *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 44 (2011) 369-375.
- [10] Pan Y., Breidt F. Jr., Gorski L.: Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Applied Environmental Microbiology* 76(5) (2010) 1433-1441.
- [11] Khangholi M., Jamalli A.: The effects of sugar on the biofilm formation of *Escherichia coli* 185p on stainless steel and polyethylene terephthalate surfaces in a laboratory model. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9 (2016) 1-7.
- [12] Seidl K., Goerke C., Wolz C., Mack D., Berger-Bachi B., Bischoff M.: *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infection & Immunity* 76 (2008) 2044-2050.
- [13] Oksala E.: Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontologica Scandinavica* 48 (1990) 71-74.
- [14] Tapper-Jones L.M., Aldred M.J., Walker D.M., Hayes T.M.: Candidal infections and populations of *Candida albicans* in mouths of diabetics. *Journal of Clinical Pathology* 34 (1981) 706-711.
- [15] Zomorodian K., Kavosi F., Pishdad G.R., Mehriar P., Ebrahimi H., Bandegani A., Pakshir K.: Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetes mellitus. *Journal de Mycologie Medicale* 26(2) (2016) 103-110.
- [16] Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J.: Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering* 43 (2000) 235-242.
- [17] Al-Radha A.S.D., Dymock D., Younes C., O'Sullivan D.: Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *Journal of Dentistry* 40 (2012) 146-153.
- [18] Desrousseaux C., Sautou V., Descamps S., Traore O.: Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *Journal of Hospital Infection* 85 (2013) 87-93.
- [19] Samaranyake L.P., McCourtie J., MacFarlane T.W.: Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology* 25 (1980) 611-615.
- [20] McCourtie J., Douglas L.J.: Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. *Infectious Immunology* 45(1) (1984) 6-12.
- [21] Lin Y., Samaranyake L.P., Samaranyake Y., Yip H.K.: Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Archives of Oral Biology* 49 (2004) 789-798.
- [22] Abu-Elteen K.H.: The influence of dietary carbohydrates on in vitro adherence of four *Candida* species to human buccal epithelial cells. *Microbial Ecology in Health and Disease* 17 (2005) 156-162.
- [23] Dewanti R., Wong A.C.L.: Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 26 (1995) 147-164.
- [24] Zhang W., Seminara A., Suaris M., Brenner M.P., Weitz D.A., Angelini T.E.: Nutrient depletion in *Bacillus subtilis* biofilms triggers matrix production. *New Journal of Physics* 16 (2014) 1-13.
- [25] Si H., Hernday A.D., Hirakawa M.P., Johnson A.D., Bennett R.J.: *Candida albicans* White and Opaque Cells Undergo Distinct Programs of Filamentous Growth. *PLOS Pathogens* 9 (2013) 1-19.
- [26] Brand A.: Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and Its Role in Virulence. *International Journal of Microbiology* 2012 (2012) 1-11.
- [27] Ramage G., Vandewalle K., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L.: Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18 (2001) 163-170.

# A TUBULAR POLYCAPROLACTONE/ HYALURONIC ACID SCAFFOLDS FOR NASAL CARTILAGE TISSUE ENGINEERING

SAMUEL JATTEAU<sup>1</sup>, ANNA KUROWSKA<sup>2</sup>, MAGDALENA ZIĄBKA<sup>3</sup>,  
IZABELLA RAJZER<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> UNIVERSITY OF LORRAINE, POLYTECH NANCY, NANCY,  
2 RUE JEAN LAMOUR, 54519 VANDŒUVRE-LÈS-NANCY, FRANCE

<sup>2</sup> ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING AND COMPUTER SCIENCE,  
UL. WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

<sup>3</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,

FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF CERAMICS AND REFRACTORIES,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

## Abstract

*In this preliminary study, 3D nanofibrous porous scaffolds in the form of spiral tubes for future application as nasal cartilages implants were fabricated by combining polycaprolactone electrospun fibers with drug modified hyaluronic acid gel. It is expected that the spiral form of the scaffold with open geometries, large surface area, and distance between the scaffold walls will be helpful for improving future cell penetration into the scaffolds, nutrient transport and metabolic waste removal, which are otherwise limited in conventional electrospun tissue-engineered scaffolds. The tubular scaffolds structure, its porosity and fibers' diameter were assessed via scanning electron microscopy, and biological properties of the scaffolds were evaluated in an in vitro study using Simulated Body Fluid (SBF). SEM results showed that apatite formed within a short period on tubular scaffolds after its immersion in SBF, demonstrating high in vitro bioactivity of the scaffolds.*

**Keywords:** electrospinning, tissue engineering scaffolds, nasal cartilages, hyaluronic acid, PCL

[*Engineering of Biomaterials 141 (2017) 8-12*]

## Introduction

A cartilage tissue is a sort of connective tissues which can be flexible and elastic, but still resistant. It can be found in the surface of articulations between the bones, in rib cage, ear, bronchus, or nose. Cartilage is the support and connection tissue for different organs and it is mostly composed of chondrocyte cells and collagen fibers which are immersed in the extracellular matrix [1]. Cartilage lesions have generally mechanical origins: naturally with aging or by trauma, which is the most frequent lesion origin for nasal cartilage [2]. Thus it is important to be able to fix it using rhinoplasty for correcting and constructing the form of the nose and for restoring the respiratory functions. The main nasal cartilages are: the greater alar cartilage, the lateral nasal cartilage, the lesser alar cartilages, and the cartilage of the septum (FIG. 1).

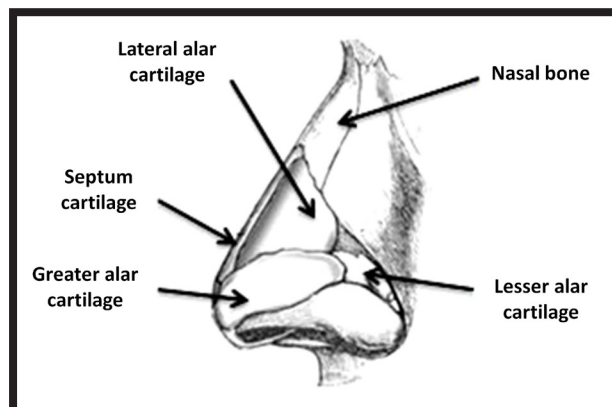


FIG. 1. Nasal cartilages.

Septum is the cartilage which separates the nasal cavities in front of the nose, making it crucial for the respiratory system [3] and exposed to trauma or congenital diseases [4,5]. Even small chondral defects may necessitate surgical intervention. The requirements for scaffolding materials for use in cartilage tissue engineering are well-defined; however the ability to produce such materials has been limited.

Electrospinning is a process that can generate three dimensional nanofibrous or microfibrinous scaffolds with high porosities, large surface-to-volume ratios, and variable fiber diameters [6]. However, it has been reported that electrospun nonwovens have limited cellular penetration depth because of the increased thickness of the nanofiber layers and the reduced pore size [7]. Pore size below cellular diameter cannot allow cell migration within the structure.

Porosity and thereby cell penetration could be enhanced in scaffolds by using the strategy of creating a spiral tubes where additional porosity is created between the walls of the tubes. Therefore the purpose of this preliminary work was to create an easy method to small nasal cartilage implant production. By using post-processes after electrospinning of fibrous nonwovens, such as surface modification and rolling up, we were able to produce three-dimensional fibrous scaffolds of desired morphology for further application. It is expected that the spiral form of the scaffold with open geometries, large surface areas, and distance between the scaffold walls will be helpful for improving cell penetration into the scaffolds, nutrient transport and metabolic waste removal, which are otherwise limited in conventional electrospun tissue-engineered scaffolds [8].

The materials chosen to make spiral scaffolds tubes are poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) and hyaluronic acid modified with Osteogenon. PCL is a synthetic polymer with good mechanical properties and easy to process. Implants produced from PCL are in clinical use for fracture fixation in regions of limited mechanical load and are well suited for the fabrication of scaffold for the regeneration of cartilage and bone tissue. Compared with other polymers such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid)(PGA) or poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), PCL has a much longer degradation time, lasting up to three years. In this aspect, PCL may be a suitable scaffold material for cartilage tissue engineering in facial reconstructive surgery [9,10]. PCL is characterized also by good formability into the fibres. However PCL has also some disadvantages, as limited bioregulatory activity and hydrophobicity [11]. Hyaluronic acid (HA) is a glycosaminoglycan, distributed widely throughout connective, epithelial, and neural tissues. In particular, it is one of the main components of the cartilage's extracellular matrix, providing it with good biocompatibility, biodegradability and non-toxicity [12].

Osteogenon (Osteo) is an ossein-hydroxyapatite complex (OHC) also containing osteocalcin and type I collagen [13]. Osteo was added to the HA solution as a modifier to improve the bioactivity of the final tubes.

We hypothesize that producing tubes by combining PCL nonwoven manufactured by electrospinning with the HA hydrogel layer modified with Osteo, and then rolling up the obtained microfibrinous sheets, we could provide a spiral form of the scaffold with dual and designed porosity that would be impossible to obtain by using only an electrospinning method. Furthermore, the application of Osteo modified HA would improve the bioactive behaviour of the scaffold. The aim of our preliminary research was to determine the parameters of scaffolds production and to assess the bioactivity of the scaffolds produced in the form of spiral tubes.

## Materials and methods

### Materials

Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) was purchased from Sigma Aldrich (average molecular weight: 80 kDa). Sodium hyaluronate (HA) was obtained from Contipro Company (Dolni Dobrouc, Czech Republic) with a molecular weight of approximately 1320 kDa. The properties of HA are presented in TABLE 1. Osteogenon (Osteo) was purchased from PIERRE FABRE. Dimethylformamide (DMF, POCH, Poland) and deionized water were used as solvents for HA solution preparation. The final solution was 0.085 wt% of HA in a 1:1 mixture of DMF:H<sub>2</sub>O. Stable dispersion of Osteo suspension was achieved by sonication of the solution. A similar solution was also made with an addition of 0.500 g of Osteo. A 20 wt% of PCL was dissolved in equal parts of chloroform and methanol (POCH, Poland).

The PCL solutions were electrospun using a TIC 1092012 electrospinning machine (Bielsko-Biala, Poland). There are a variety of parameters that influence the morphology and diameter of the electrospun fibers, including the intrinsic properties of the solution, the operational conditions and ambient parameters. Operational conditions (controlled variables) include the flow rate, electric field strength, distance between tip and collector, needle tip design, and collector composition and geometry. Evaluation of process parameters for drug modified electrospun nonwovens scaffolds before setting the final parameters of the experiments was conducted. The prepared PCL solution was put in a syringe of 10 mL topped with a needle the diameter of which was 0.22 mm. The needle was connected to 25 kV voltage, and the distance between needle and the collector was 200 mm. The rotary collector was wrapped with silica-coated paper. All parameters used during electrospinning are shown in TABLE 2.

### Spiral tubes fabrication

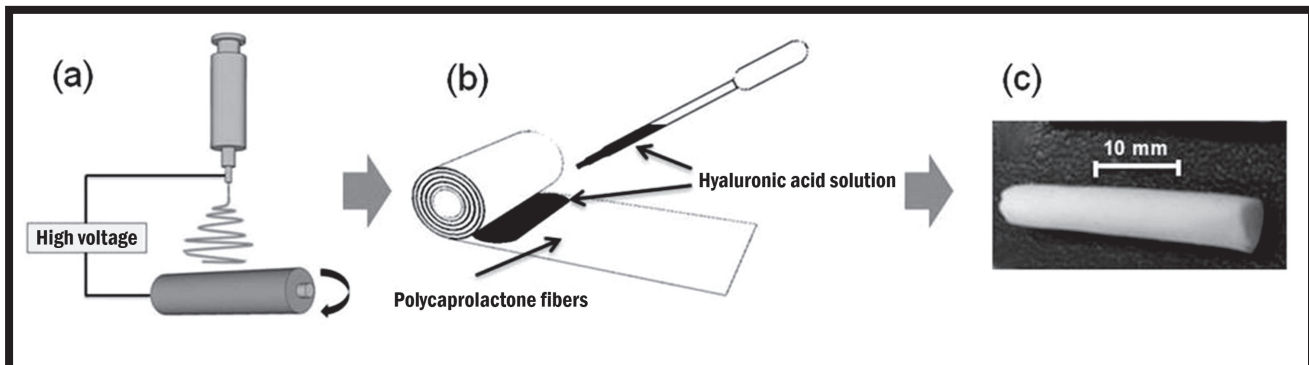
In order to make three-dimensional tubular scaffold, electrospun PCL nonwoven (FIG. 2a) was cut into strips of 3 cm x 15 cm. A 0.1 mL of HA was added on the nonwoven surface. By pressing the metallic shaft into the surface of the PCL nonwoven, a uniform distribution of HA/Osteo was achieved. Then a metal spin was used for rolling up the nonwoven (FIG. 2b), to finally get the spiral tube (FIG. 2c). To investigate the effect of tubular fibrous structure and hyaluronic acid coating on the properties of the scaffolds, three groups of scaffolds have been prepared: pure PCL spiral tubes, PCL spiral tubes coated with HA, and PCL spiral tubes coated with Osteo modified HA.

**TABLE 1. Properties of sodium hyaluronate used in the study.**

Appearance	White or almost white powder, granules or fibrous aggregate
Molecular weight [MDa]	1.32
pH	6.6
Intrinsic viscosity [m <sup>3</sup> /kg]	1.96
Sodium hyaluronate [%]	97.6
Residual isopropanol [%]	<0.5
Loss on drying [%]	3.4
Protein [%]	0.029
Chlorides [%]	<0.05

**TABLE 2. Parameters used during electrospinning process.**

Flow rate [mL/h]	3
Distance [cm]	20
Voltage [kV]	25
Collector speed [rpm]	415
Collector diameter [mm]	20
Temperature [°C]	19.7
Humidity [%]	40



**FIG.2. Scheme of samples preparation.**



### Scaffold Characterization

The thickness of the PCL fibrous samples was measured using a Mitutoyo 7316S Dial Thickness Gage. Each sample was measured five times in order to calculate the average value and the standard deviation. The sample microstructure was investigated with scanning electron microscopy (Nova NanoSEM 200, FEI). Before observation samples were coated with a thin carbon layer. Stereomicroscopy (SN from OPTA-TECH Company, equipped with CMOS 3 camera and OptaViewIS software) was also used to capture images of the scaffolds. Pure PCL fibrous nonwovens (PCL), PCL spiral tubes coated with HA (PCL/HA), and PCL spiral tubes coated with Osteo modified HA (PCL/HA+Osteo) before and after immersion in Simulated Body Fluid (SBF) were observed. The porosity and fiber diameter were evaluated by analysis of the SEM images of the scaffolds using Image-J software version 1.50. Two-dimensional (2D) images were converted into binary images. Surface area of pores in each image was separated from the whole area of the picture and reported as an average value for each scaffold. Average fiber diameter and the standard deviation were calculated from 100 measurements of different fibers.

### *In vitro* tests in Simulated Body Fluid solution (SBF)

The bone-bonding ability of a material is often evaluated by examining the ability of apatite to form on its surface in a simulated body fluid (SBF) with ion concentrations nearly equal to those of human blood plasma. The bioactivity tests in SBF were performed as a first step of biological evaluation of tubes in order to check their osteoinductive behavior. Simulated Body Fluids (SBF) have the ability to form apatite calcium phosphates on immersed osteoinductive materials from a few days to 2 weeks. Therefore it is a good way to check if it is reasonable to perform more expensive biological tests (for instance: cell culture or animal *in vivo* studies). The purpose of the *in vitro* tests is to observe the formation of the apatite deposits in samples immersed in a SBF solution [14,15]. A common feature of bioactive materials is that their surfaces develop a biologically active apatite layer after implantation, which is essential for establishing bonding with natural tissue [16]. It is believed that if material has the ability to induce apatite formation on its surface after immersion in SBF solution, it will be bioactive *in vivo* as well.

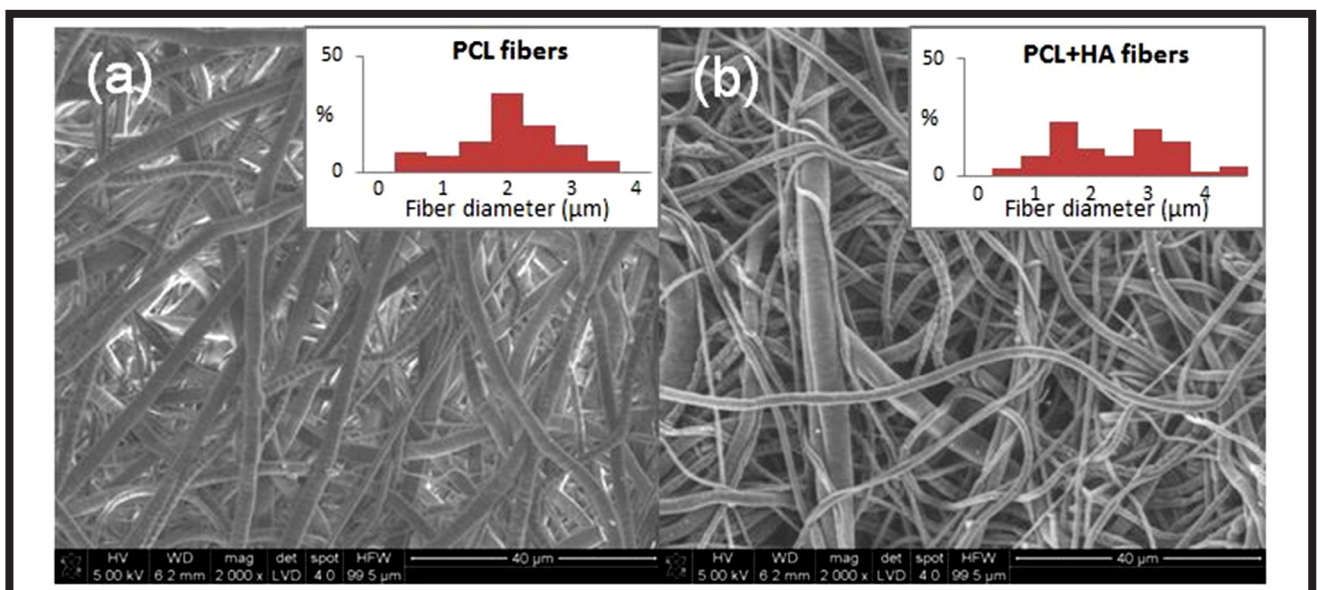
To realize those tests, one litre of 1.5 x SBF was prepared according to the Kokubo's recipe [17]. It had ion concentrations that were nearly 1.5 x as those in human blood plasma. A solution with ion concentrations 1.5 times of SBF (1.5 SBF) was prepared, in order to accelerate the apatite formation. The application of 1.5 x SBF in order to enhance the kinetics of coating deposition is commonly used by other researches. Samples of PCL nonwoven and spiral tubes of PCL/HA and PCL/HA+Osteo were immersed in SBF at 37°C for 1, 3, and 7 days, respectively. In order to optimize the *in vitro* simulation, the SBF solution was changed every 2 or 3 days. Changes of the surface structure of immersed spiral tubes and nonwovens were analyzed after the specimens had been removed from SBF, washed with distilled water and dried.

## Results and Discussion

The aim of this preliminary study was to fabricate three-dimensional composite scaffolds in shape of spiral tubes for cartilage tissue engineering. As a first step of our study electrospinning method was used to fabricate fibrous nonwovens. When considering the maintenance of the geometric structure (which is very important, regarding nasal cartilage replacement application) one obvious benefit of PCL application is its comparatively longer degradation time, which may help maintain the desired shape of the tissue until secreted ECM materials can supplement the scaffold with this function. The electrospinning process was successfully used to fabricate randomly oriented fibrous nonwoven of PCL (FIG. 3a). The thickness of electrospun PCL nonwoven was  $0.44 \pm 0.15$  mm. The obtained nonwoven had open-pore geometry and porosity about 60% according to ImageJ software (TABLE 3).

**TABLE 3. Porosity and average fiber diameter of obtained materials.**

	Average fiber diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Porosity [%]
PCL	$2.28 \pm 0.76$	$59.8 \pm 2.4$
PCL/HA	$2.73 \pm 1.21$	$52.1 \pm 3.7$



**FIG. 3. SEM images of obtained samples together with fibers diameter distribution: (a) pure PCL nonwoven; (b) surface of PCL/HA tube.**

However, the accuracy of this method depends on the contrast and quality of the SEM images and the assumption that the region being imaged is characteristic of the whole material. The disadvantage is that it often underestimates the total porosity. The diameter of obtained PCL fibers was in the range from 400 nm to 3.6  $\mu\text{m}$ , and an average fiber diameter was  $2.28 \pm 0.76 \mu\text{m}$ . Obtained electrospun nonwovens had high surface area and interconnected pore network. Achieved porosity of the scaffold should provide a facile transport of metabolic nutrients and waste through its pores. However the efficient cell implantation and blood vessel invasion would be impossible as the size of pores is too small. The porosity of obtained scaffold was improved by rolling up PCL nonwoven with a small amount of pure or modified HA solutions. Although PCL is not elastomeric, its electrospun nonwoven is fairly flexible and generally it was easy to roll it up. Spiral shape tubes (FIG. 4) were obtained with additional gaps between the spiral layers. Another notable limitation of the PCL nonwoven in cartilage tissue engineering field is its hydrophobic surface properties and lack of bioactive ligands. Therefore PCL has poor cellular adhesion properties on its own, without some form of functionalization [18]. In order to overcome this disadvantages, and to improve bioactivity of PCL scaffolds coating with HA with Osteo modified HA on electrospun PCL nonwovens was applied.

HA is one of the main components of the cartilage's extracellular matrix, providing it with good biocompatibility. The measurements showed that the average diameter of fibers after addition of HA solutions is slightly higher than for pure PCL sample (TABLE 3). This suggests that a thin layer of hydrogel solutions covered the PCL fibers. The average porosity (space between the fibers) slightly decreased (about 13%) when HA solution was added on PCL nonwoven surface (TABLE 3). However novel porosity appeared, which represent space between scaffold walls in spiral tube (FIG. 4). Pores with elongated shapes could be observed on the cross section of obtained spiral tubes. The distance between walls was about 20  $\mu\text{m}$ , however it can be regulated during fabrication process in order to obtain the pore size adequate for implantation side. As a first step of biological evaluation of tubes the bioactivity tests in 1.5 x SBF was performed in order to check their osteoinductive behavior of obtained materials. FIG. 5 shows the surface of the PCL, PCL/HA and PCL/HA+Osteo samples after 7 days of immersion in SBF solution. Apatite crystals were found on PCL/HA+Osteo samples after its immersion in SBF for 7 days, and covered most regions of the surface of the sample, whereas on PCL/HA samples, apatite growth was very slow and gentle apatite formation after 7 days was observed.

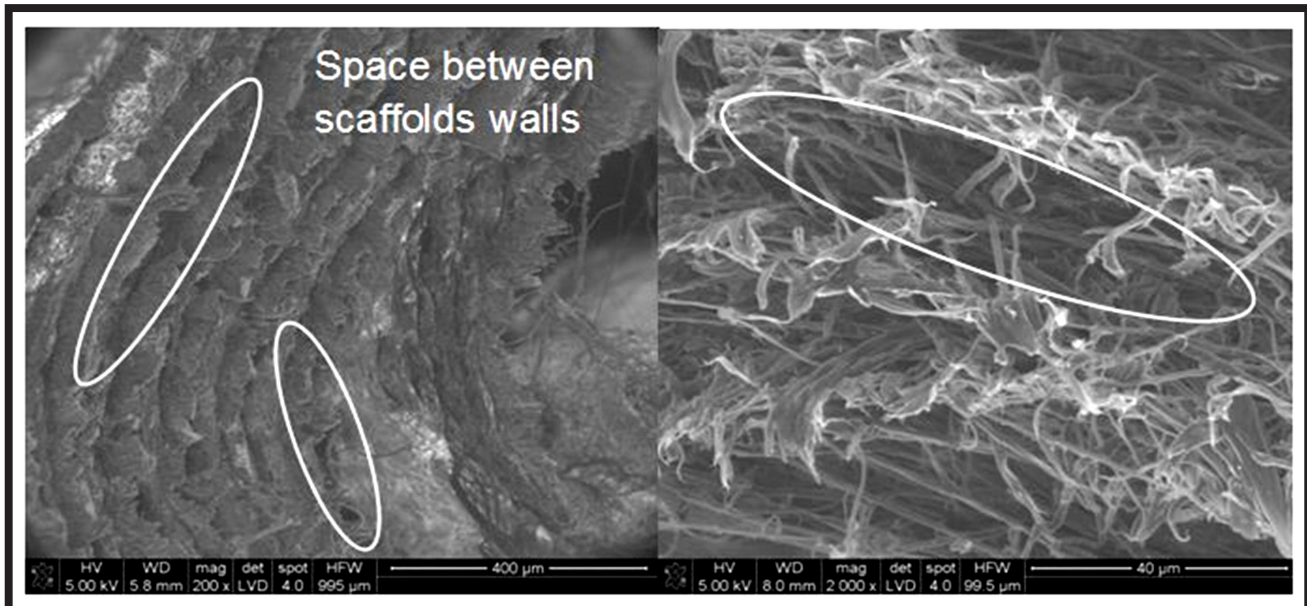


FIG. 4. Cross section of obtained spiral tubes (PCL/HA). Gaps between the walls.

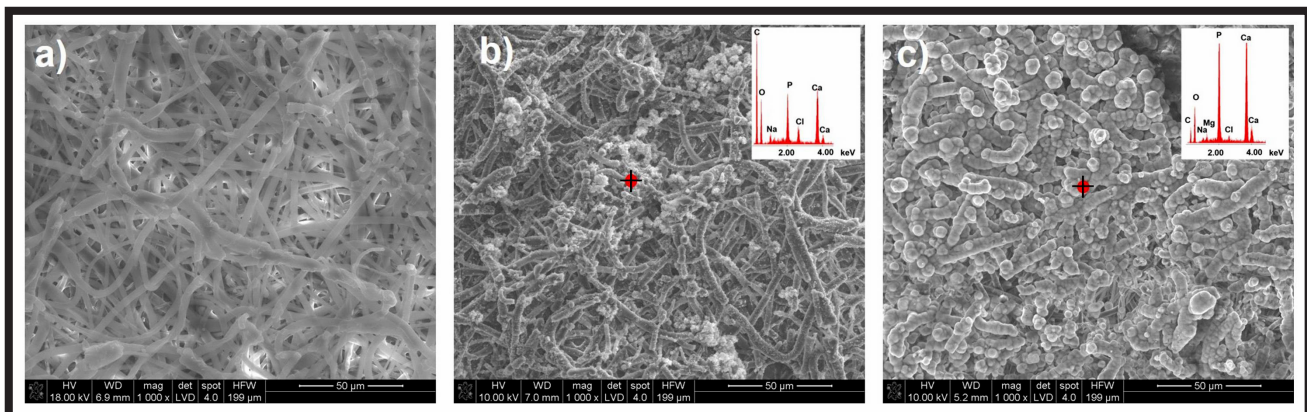


FIG. 5. PCL, PCL/HA and PCL/HA+osteo samples after immersion in SBF solution for 7 days.



Our study indicated that the apatite layer was formed continuously on the surface of Osteo modified PCL/HA samples, which means that such samples had greater ability to induce the formation of minerals *in vitro*. SEM demonstrated the changes in SBF that the scaffolds underwent after surface modification. Coating PCL with Osteo modified HA changes the surface properties of the pure PCL scaffold. It is expected that it would improve cell-scaffold interactions, however further biological study in cell cultures need to be performed.

## Conclusions

Electrospinning has been widely used to produce fibrous scaffolds for tissue engineering applications. Although the method is very simple, easy, and effective for obtaining fibrous materials, the fabrication of three dimensional (3D) shapes has been a major obstacle for use in tissue engineering. In this study, a new fabrication method to produce controllable 3D spiral structures is developed. While there are still a number of challenges, 3D nanofibrous porous scaffolds in the form of spiral tubes hold a promising future for cartilage tissue engineering applications. The cartilage scaffold should require a 3D shape because a 2D structure is unable to replicate the behavior of cells *in vivo*. The structure of the tube proposed in our preliminary work consists of dual porous architecture containing fibrous walls and micro-sized pores formed between the walls of the rolled scaffold.

The microscopic observation indicates that the obtained scaffolds in the form of tubes have an open pore geometry and additional porosity between the spiral walls which will be helpful for improving cell penetration into the scaffolds, nutrient transport and metabolic waste removal. The addition of Osteo into HA solution improves the bioactivity of obtained tubes. Osteo was incorporated into HA hydrogel to form a bioactive layer on fibrous PCL. This layer is essential for establishing bonding with natural tissue after implantation. By controlling appropriate processing conditions, we can successfully fabricate a highly porous 3D structure. Our spatially designed scaffold could provide more biomimetic micro-cellular environmental conditions than 2D electrospun scaffold, however further cellular study will be performed to confirm possible application in cartilage tissue engineering.

## Acknowledgments

*This work was supported by the National Science Centre, Poland in the frame of project: "Layered scaffolds for nasal cartilages reconstruction fabricated by 3D printing and electrospinning" 2015/18/E/ST5/00189 (Sonata Bis 5).*

## References

- [1] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo: The Basic Science of Articular Cartilage. *Sport Health* 1(6) (2009) 461-468.
- [2] K. Ansari, J. Asaria, P. Hilger, P.A. Adamson: Grafts and implants in rhinoplasty - Techniques and long-term results. *Operative Techniques in Otolaryngology* 19 (2008) 42-58.
- [3] A. Shafiee, E. Seyedjafari, E.S. Taherzadeh, P. Dinarvan, M. Soleimani, J. Ai.: Enhanced Chondrogenesis of Human Nasal Septum Derived Progenitors on Nanofibrous Scaffolds. *Materials Science and Engineering C* 40 (2014) 445-454.
- [4] G. Tuncbilek: Congenital isolated absence of the nasal cartilaginous septum. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 86 (2016) 72-76.
- [5] Y. Liu, G. Zhou, Y. Cao: Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering. *Engineering* 3 (2017) 28-35.
- [6] R. Murugan, Z.M. Huang, F. Yang, S. Ramakrishna: Nanofibrous scaffold engineering using electrospinning. *J Nanosci Nanotechnol* 7 (2007) 4595-4603.
- [7] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos: Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 7 (2006) 2796-2805.
- [8] S. Chen, Z. He, G. Xu, X. Xiao: Fabrication of nanofibrous tubular scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Letters* 182 (2016) 289-293.
- [9] S. Yang, K.F. Leong, Z. Du, C.K. Chua: The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors, *Tissue Eng.* 7 (2001) 679-689.
- [10] C.H. Chen, M.Y. Lee, V.B.H. Shyu, Y.C. Chen, C.T. Chen, J.P. Chen: Surface modification of polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 40 (2014) 389-397.
- [11] S. Surucu, H. Turkoglu Sasmazel: Development of core-shell coaxially electrospun composite PCL/chitosan scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules* 92 (2016) 321-328.
- [12] D.S. Young. Hyaluronic Acid-based Nanofibers via Electrospinning. Masters of Science Thesis. North Carolina State University (2006).
- [13] I. Rajzer, O. Castaño, E. Menaszek: Electrospun polymer scaffolds modified with drugs for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 77 (2017) 493-499.
- [14] T. Kokubo, M. Hanakawa, M. Kawashita, M. Minoda, T. Beppu, T. Miyamoto, T. Nakamura: Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF. *Biomaterials* 25 (2004) 4485-4488.
- [15] M. Bohner, J. Lemaire: Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* 30 (2009) 2175-2179.
- [16] L.L. Hench: Bioceramics: from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1487-1510.
- [17] T. Kokubo, H. Takadama: How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* (2006) 2907-2915.
- [18] Z. Cheng, S.-H. Teoh: Surface modification of ultrathin poly( $\epsilon$ -caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials* 25 (2004) 1991- 2001.



## ADHEZJA WARSTW $\text{SiO}_2$ NANIESIONYCH METODĄ ALD I ZOL-ŻEL NA STAL 316LVM

MARCIN BASIAGA<sup>1\*</sup>, WITOLD WALKE<sup>1</sup>, ANITA KAJZER<sup>1</sup>,  
WOJCIECH KAJZER<sup>1</sup>, MARCIN STASZUK<sup>2</sup>, PRZEMYSŁAW KURTYKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
UL. GENERALA CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE

<sup>2</sup> INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH,  
WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY, POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
KONARSKIEGO 18, 44-100 GLIWICE

\* E-MAIL: MARCIN.BASIAGA@POLSL.PL

### Streszczenie

Celem prezentowanej pracy była ocena przydatności stosowania warstw  $\text{SiO}_2$  naniesionych dwiema metodami Atomic Layer Depositon (ALD) i zol-żel na podłoże ze stali 316LVM stosowanej na implanty w układzie sercowo-naczyniowym. Do badań wtypowano stal austenityczną 316LVM i poddano ją następującym modyfikacją powierzchni: polerowanie elektrochemiczne, pasywacja chemiczna, naniesienie warstw  $\text{SiO}_2$  zarówno metodą ALD, jak i zol-żel. Wymienione metody są obecnie najczęściej stosowane w przypadku nanoszenia warstw powierzchniowych na implanty. W ramach oceny przydatności zaproponowanych metod modyfikacji powierzchni analizowanej stali autorzy pracy przeprowadzili badania własności mechanicznych, elektrochemicznych oraz fizycznych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że niezależnie od metody nanoszenia zaobserwowano korzystny wpływ warstwy  $\text{SiO}_2$  na badane własności w porównaniu do stanu wyjściowego. Ponadto stwierdzono, że najkorzystniejszym zespołem własności mechanicznych, elektrochemicznych i fizycznych charakteryzuje się warstwa  $\text{SiO}_2$  naniesioną metodą ALD. Tak naniesiona warstwa charakteryzowała się większą siłą krytyczną powodującą delaminację warstwy, większą odpornością na korozję wżerową oraz większym kątem zwilżania wodą (charakter hydrofobowy), co w przypadku implantów stosowanych w układzie krwionośnym jest zjawiskiem pożądanym, ponieważ wymagana jest mała adsorpcja białek, która ogranicza proces krzepnięcia krwi. Zaproponowanie odpowiednich wariantów obróbki powierzchniowej z wykorzystaniem metody ALD oraz zol-żel ma perspektywiczne znaczenie i przyczyni się do opracowania warunków technologicznych o sprecyzowanych parametrach wytwarzania powłok tlenkowych na implantach stosowanych w układzie sercowo-naczyniowym.

**Słowa kluczowe:**  $\text{SiO}_2$ , ALD, zol-żel, 316LVM, własności mechaniczne i elektrochemiczne

[Inżynieria Biomateriałów 141 (2017) 13-19]

## ADHESION OF $\text{SiO}_2$ LAYERS DEPOSITED BY MEANS OF SOL-GEL AND ALD METHODS ON 316LVM STEEL

MARCIN BASIAGA<sup>1\*</sup>, WITOLD WALKE<sup>1</sup>, ANITA KAJZER<sup>1</sup>,  
WOJCIECH KAJZER<sup>1</sup>, MARCIN STASZUK<sup>2</sup>, PRZEMYSŁAW KURTYKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND MEDICAL DEVICES  
ENGINEERING, FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING,  
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
UL. GENERALA CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
UL. KONARSKIEGO 18, 44-100 GLIWICE, POLAND

\* E-MAIL: MARCIN.BASIAGA@POLSL.PL

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the usefulness of  $\text{SiO}_2$  layers deposited by two methods - atomic layer deposition (ALD) and sol-gel, on the surface of stainless steel 316LVM used in application of cardiovascular implants. In assessing the suitability of the proposed methods to modify surfaces of the analysed steel, authors carried out tests of mechanical, electrochemical and physical properties. The austenitic steel 316LVM was chosen and subjected to the following surface modifications: electrochemical polishing, chemical passivation and application of the  $\text{SiO}_2$  layer using both methods – ALD and sol-gel. These methods were proposed for research, because they are most commonly used in the case of applying surface layers to implants. Based on the obtained results, it was observed that regardless of the method of application, the  $\text{SiO}_2$  layer has beneficial effect on examined properties compared to control. Moreover, it was found that the  $\text{SiO}_2$  layer deposited by ALD is characterized by the most preferred combination of mechanical, physical and electrochemical properties. The layer obtained by this method is characterized by a higher critical force, which causes delamination of the layers, higher resistance to pitting corrosion and higher water contact angle (hydrophobic character), which is a desirable phenomenon in the case of implants used in the circulatory system, resulting in lower adsorption of proteins and blood clotting. Proposing of suitable variants of surface treatment using the ALD and sol-gel methods is of perspective importance. It will contribute to the development of technological conditions with specified parameters for the production of oxide coatings on implants used in the cardiovascular system.

**Keywords:**  $\text{SiO}_2$ , ALD, sol-gel, 316LVM, mechanical and electrochemical properties

[Engineering of Biomaterials 141 (2017) 13-19]

W dzisiejszych czasach, w których świadomość istoty krążenia krwi w organizmie dla utrzymania stanu zdrowia jest ogromna, dąży się do opracowywania nowych oraz rozwijania już istniejących metod profilaktyki zdrowotnej, jak również leczenia patologii w obrębie tego układu. Wieleletnie obserwacje mechanizmów pracy układu krążenia, a także liczne badania prowadzone przez lekarzy przy ścisłej współpracy inżynierów pozwoliły na modelowanie struktur i procesów biologicznych związanych z krążeniem. Dzięki temu uzyskano szerokie możliwości prowadzenia testów pracy całego układu i symulowania sytuacji patologicznych, na podstawie których opracowano szereg implantów oraz metod zabiegowych przywracających stan normalny w organizmie lub maksymalnie do niego zbliżony. Obecnie stosuje się różnorodne metody leczenia dysfunkcji układu sercowo-naczyniowego, m.in. leczenie implantologiczne. Popularną, jeśli chodzi o zastosowanie, grupę wyrobów implantowanych stanowią stenty naczyniowe [1-3]. Ich użycie pociąga jednak za sobą dwa zasadnicze problemy związane z wykrzepianiem i restenozą. W celu ograniczenia tych niekorzystnych procesów wskazuje się kształtowanie własności fizykochemicznych warstwy powierzchniowej implantów. Do tej pory nie osiągnięto jednak w tej dziedzinie w pełni zadowalających efektów [3]. W literaturze niewiele miejsca poświęca się roli procesu obróbki powierzchniowej biomateriału metalowego. W ramach pracy zaproponowano nanoszenie warstw krzemionkowych, ponieważ w zależności od metody nanoszenia, jak również parametrów, cechują się m.in.: dobrą przyczepnością do metalicznego podłoża, bardzo wysoką biotolerancją oraz zwiększoną odpornością korozyjną w porównaniu do materiału niepokrytego [4,5]. Dane literaturowe wskazują na szereg niezdefiniowanych zjawisk towarzyszących wytwarzaniu powłok tlenkowych z udziałem krzemu na powierzchniach biomateriałów metalowych [6]. Wciąż nierozwiązanym problemem pozostaje dobór odpowiednich parametrów wytwarzania powłok, jak i kompleksowych badań pokazujących pełną charakterystykę ich zachowania w warunkach implantacji oraz długotrwałego kontaktu ze środowiskiem tkankowym podczas użytkowania implantu. W ostatnich latach coraz częściej obiektem zainteresowania badaczy zajmujących się modyfikacją biomateriałów metalowych stały się warstwy tlenkowe nanoszone w procesach zol-żel czy Atomic Layer Deposition (ALD) [7-9]. Podstawową zaletą tych metod jest możliwość otrzymania powłok w niskich temperaturach. Dlatego też autorzy pracy zaproponowali porównanie wybranych własności użytkowych zmodyfikowanej powierzchniowo stali 316LVM poprzez naniesienie warstwy SiO<sub>2</sub> dwiema metodami ALD i zol-żel.

## Materiały i metody

Do badań wytypowano stal Cr-Ni-Mo (typu 316LVM) w postaci krążków o średnicy  $d = 14$  mm. Próbkę poddano obróbce powierzchniowej obejmującej następujące procesy: polerowania elektrochemicznego oraz pasywacji chemicznej. Polerowanie elektrochemiczne prowadzono w kąpeli na w mieszaninie kwasu siarkowego i fosforowego aż do momentu uzyskania chropowatości powierzchni  $Ra < 0,16 \mu\text{m}$  zalecanej dla implantów. Następnie próbki poddano procesowi pasywacji chemicznej w 40% kwasie azotowym. Są to podstawowe etapy kształtowania własności użytkowych biomateriałów metalowych stosowanych na implanty o zminiaturyzowanych cechach geometrycznych. Następnie na tak przygotowane próbki nanoszono warstwę SiO<sub>2</sub> dwiema metodami: ALD i zol-żel. Warstwę SiO<sub>2</sub> metodą zol-żel naniesiono przy następujących parametrach procesu:  $T = 430^\circ\text{C}$ ,  $t = 60$  min,  $v = 2,5$  cm/min.

Nowadays, the aim is to develop new and improve existing methods of preventive health care as well as the treatment of cardiovascular pathologies. Most likely it is caused by increasing awareness of the importance of blood circulation to remain in good health. Long term observation of the operating circulatory system phenomena, as well as the research cooperation of doctors and engineers allowed for modelling of structures and biological processes associated with blood circulation. There are various methods of treatment of cardiovascular system disorders currently used, including surgical implantation. The coronary stents are the most common group of implants in terms of application [1-3]. However, their use entails two fundamental problems associated with clotting and restenosis. The designing of physical and chemical properties of the surface layer of the implants is indicated in order to reduce these negative processes. In this field the completely satisfactory results still have not been achieved. In the literature, little space is devoted to the role of the surface modification process of metallic biomaterials [3]. As part of this work the application of silica layer was proposed due to the fact that depending on the methods and parameters, it is characterized by: good adhesion to the metallic substrates, very high biotolerance and increased corrosion resistance in comparison to uncoated materials [4-5]. The literature indicated a number of not defined phenomena during producing oxide coatings containing silicon on the surface of metallic biomaterials [6]. There are still many unresolved issues such as selection of appropriate parameters of coating technology and comprehensive study demonstrating full characterization of their behaviour under conditions of implantation and prolonged contact with the tissue environment during use of the implant. In recent years, the oxide layers deposited in sol-gel processes or Atomic Layer Deposition (ALD) are more frequent as an object of interest by many researchers developing the modification of metallic biomaterials [7-9]. The main advantage of these methods is the possibility of obtaining coatings at low temperatures. Therefore, the authors propose a comparison of selected functional properties of the modified surface of steel 316LVM by applying a layer of SiO<sub>2</sub> by two methods: sol-gel and ALD.

## Materials and Methods

Samples of stainless steel Cr-Ni-Mo (LVM 316) in the form of discs with a diameter  $d = 14$  mm were chosen for studies. Then the surface treatment was conducted, which consisted of the following processes: electrochemical polishing and chemical passivation. Electrochemical polishing was carried out in phosphoric and sulfuric acids bath until obtaining a surface roughness of  $Ra < 0.16 \mu\text{m}$  recommended for implants. Then the samples were subjected to chemical passivation in 40% nitric acid. These are the basic stages of development of functional properties of metallic biomaterials used for miniaturized implants. Then so-prepared samples were subjected to SiO<sub>2</sub> layer application using two methods: ALD and sol-gel. A layer of SiO<sub>2</sub> using sol-gel method was applied with the following process parameters:  $T = 430^\circ\text{C}$ ,  $t = 60$  min,  $v = 2.5$  cm/min.

Stosowanym w badaniach prekursorem krzemionki był tetraetoksylan  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , tzw. TEOS i tetrametoksylan  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ , tzw. TMOS. Pozostałe składniki wyjściowe zawierały alkohol etylowy (EtOH) i wodę. Jako katalizator zastosowano kwas solny [10]. Z kolei warstwę  $\text{SiO}_2$  metodą ALD naniesiono przy parametrach: 2000 cykli i  $T = 300^\circ\text{C}$ . Stosowanym prekursorem w tym przypadku był Tris(dimethylamino)silan  $((\text{CH}_3)_2\text{N})_3\text{SiH}$  (TDMAS) i  $\text{O}_3$ . Parametry procesu nanoszenia warstwy  $\text{SiO}_2$  zarówno metodą zol-żel, jak i ALD wytypowano na podstawie wcześniejszych badań autorów pracy [10], które wykazały zbliżoną grubość warstwy  $\text{SiO}_2$  (ok. 200 nm). W końcowym etapie tak przygotowane próbki poddano procesowi sterylizacji parowej w autoklawie w temperaturze  $T = 134^\circ\text{C}$  przy ciśnieniu  $p = 2,1$  bar przez czas  $t = 12$  min.

W celu oceny przydatności stosowania analizowanych warstw w ramach pracy przeprowadzono badania własności mechanicznych, elektrochemicznych oraz fizycznych zmodyfikowanej powierzchniowo stali 316LVM.

W ramach oceny własności mechanicznych przeprowadzono badania przyczepności analizowanych warstw do podłoża z wykorzystaniem metody zarysowania (scratch test) [11]. Test polegał na wykonaniu rysy z wykorzystaniem penetratora – stożka diamentowego Rockwella – przy stopniowym wzroście siły normalnej obciążającej ten penetrator. Siła krytyczna, będąca miarą adhezji, to najmniejsza siła normalna powodująca utratę adhezji powłoki z podłożem. Do oceny wartości siły krytycznej  $L_c$  posłużył zapis zmian sygnałów emisji akustycznej, siły tarcia i współczynnika tarcia oraz obserwacje mikroskopowe wykonane na mikroskopie świetlnym stanowiącym integralną część platformy. Badania wykonano przy narastającej sile obciążającej  $F_c = 0,03\div 30$  N i przy następujących parametrach pracy: szybkość obciążania  $v_s = 10$  N/min, prędkość przesuwu stolika  $v_t = 10$  mm/min, długość rysy  $l = 3$  mm.

Dodatkowo w ramach oceny własności elektrochemicznych przeprowadzono badania odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną rejestrując krzywe polaryzacji. Badanie przeprowadzono zgodnie z zaleceniami normy ASTM F2129 [12]. Stanowisko pomiarowe składało się z potencjostatu VoltaLab PGP201, elektrody odniesienia (nasycona elektroda kalomelowa SCE typu KP-113), elektrody pomocniczej (elektroda platynowa typu PtP-201), anody (badana próbka) oraz komputera PC wraz z oprogramowaniem VoltaMaster 4. Badania korozyjne rozpoczynano od wyznaczenia potencjału otwarcia  $E_{\text{OCP}}$  w warunkach bezprądowych. Krzywe polaryzacji rejestrowano od wartości potencjału początkowego  $E_{\text{pocz}} = E_{\text{OCP}} - 100$  mV. Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością  $0,167$  mV/s. Na podstawie uzyskanych krzywych wyznaczono potencjał korozyjny  $E_{\text{kor}}$  oraz korzystając z metody Sterna wartość oporu polaryzacyjnego  $R_p$ . Dodatkowo wyznaczono również gęstość prądu korozyjnego  $i_{\text{kor}}$ , którą wyznaczono ze wzoru (1). Badanie to zrealizowano w próbce roztworu (250 ml) - sztucznego osocza w temperaturze  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7 \pm 0,2$ .

$$i_{\text{kor}} = 0,026/R_p \quad (1)$$

Ostatnim etapem badań była ocena własności fizycznych, w ramach których przeprowadzono badania zwilżalności powierzchni. W ramach określenia zwilżalności powierzchni przeprowadzono analizę kątów zwilżania  $\theta$  i swobodnej energii powierzchniowej  $\gamma_s$  (SEP) metodą Owensa-Wendta. Pomiary kąta zwilżania wykonano z użyciem dwóch cieczy: wody destylowanej ( $\theta_w$ ) (prod. Poch S.A.) oraz diiodometanu ( $\theta_d$ ) (prod. Merck sp.z o.o.), każda o objętości  $1,5$   $\mu\text{l}$ , w temperaturze pokojowej na stanowisku badawczym składającym się z goniometru SURFTENS UNIVERSAL firmy OEG oraz komputera z oprogramowaniem SurfTens 4.5 do analizy zarejestrowanego obrazu kropli.

As the silica precursor the tetraethoxysilane  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  - TEOS and tetramethoxysilane  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$  - TMOS were used during the process. The other components included ethyl alcohol (EtOH) and water. Hydrochloric acid was used as a catalyst. In contrast, the  $\text{SiO}_2$  layer using ALD was applied with the parameters: 2000 cycles at  $T = 300^\circ\text{C}$ . In this case a Tris(dimethylamino)silane  $((\text{CH}_3)_2\text{N})_3\text{SiH}$  TDMAS and  $\text{O}_3$  were used as precursors. The parameters of the application process of  $\text{SiO}_2$  layer for both methods, ALD and sol-gel, were selected based on previous studies of the authors [10], which showed a similar thickness of the  $\text{SiO}_2$  layer (about 200 nm). In the final stage so-prepared samples were subjected to steam sterilization in an autoclave at a temperature  $T = 134^\circ\text{C}$ , pressure  $p = 2.1$  bar and during time  $t = 12$  min.

In order to assess the suitability of the use of analysed layers, as part of the work the mechanical, physical, and electrochemical properties of the surface-modified steel 316LVM were studied.

The study of the layer adhesion was carried out using scratch test in order to evaluate the mechanical properties of the  $\text{SiO}_2$  layer [11]. The test involved the performance of the scratch on samples surfaces using penetrator – Rockwell diamond cone – with gradually increasing load. The critical force, which is a measure of layer adhesion, is the smallest normal force resulting in the loss of adhesion of the coating to the substrate. The value of the critical force  $L_c$  was determined based on: the record of the changes in acoustic emission signals, the friction force, friction coefficient and microscopic observations performed on light microscopy. The study was performed for increasing load  $F_c = 0.03\text{-}30$  N and the following operational parameters: speed load  $v_s = 10$  N/min, feed rate of the table  $V_t = 10$  mm/min and the length of scratch  $l = 3$  mm.

Additionally, the evaluation of the electrochemical properties was carried out, which involved the performance of the research of resistance to pitting corrosion using potentiodynamic method and recording polarization curves. The study was conducted according to the recommendations of ASTM F2129 standard [12]. The test stand consisted of VoltaLab PGP201 potentiostat, reference electrode (saturated calomel electrode SCE type KP-113), the auxiliary electrode (platinum electrode type PtP-201), the anode (the test sample) and a PC with VoltaMaster 4 software. Corrosion tests were initiated from indicating the opening potential  $E_{\text{OCP}}$  with electroless conditions. Polarization curves were recorded beginning from the starting potential  $E_{\text{pocz}} = E_{\text{OCP}} - 100$  mV. The potential change was followed in the direction of the anode at a rate of  $0.167$  mV/s. The corrosion potential  $E_{\text{kor}}$  was determined based on the obtained curves and the resistance polarization  $R_p$  from Stern method. Additionally, the corrosion current density  $i_{\text{kor}}$  was determined from the formula (1) This study was carried out in the sample solution of artificial plasma (250 ml) at a temperature of  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $\text{pH} = 7 \pm 0.2$ .

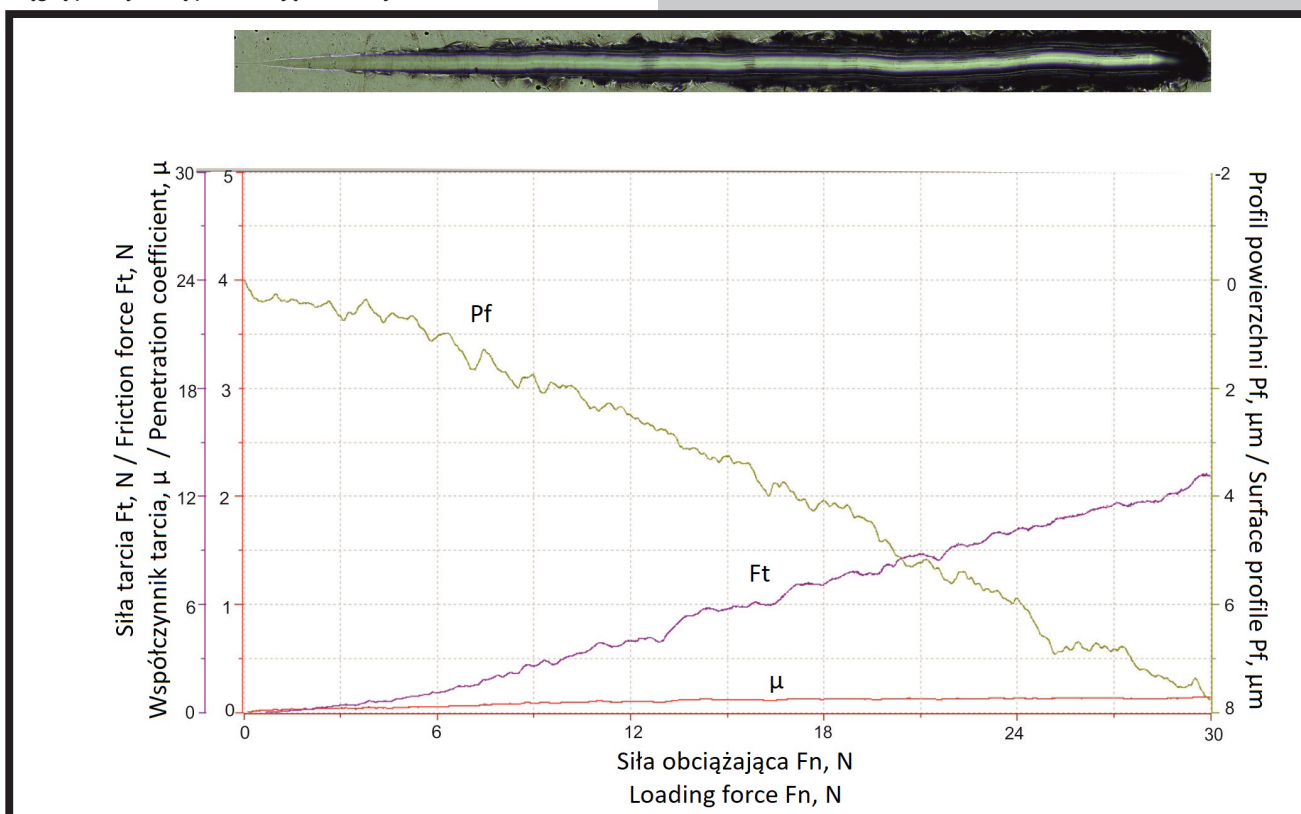
$$i_{\text{kor}} = 0.026/R_p \quad (1)$$

The final stage of the research was to evaluate the physical properties, which contained the surface wettability tests. As a part of this stage the studies of contact angles  $\theta$  and surface free energy  $\gamma_s$  (SEP) were performed with the use of Owens-Wendt method. The contact angle measurements were performed using two liquids: distilled water ( $\theta_w$ ) (prod. Poch S.A.) and diiodomethane ( $\theta_d$ ) (prod. Merck Sp. z o.o.) in drop volume of  $1.5$   $\mu\text{l}$  at room temperature. The tests were made on OEG SURFTENS UNIVERSAL goniometer and SurfTens 4.5 computer software was used to analyse the recorded drop images.



Warstwa musi charakteryzować się odpowiednimi właściwościami mechanicznymi m.in. wymaganą przyczepnością do materiału podłoża, aby mogła należycie spełniać swoje zadanie. Dlatego też w pierwszej kolejności przeprowadzono badania metodą zarysowania scratch test. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że większą przyczepnością do podłoża ze stali 316LVM charakteryzuje się warstwa  $\text{SiO}_2$  naniesiona metodą ALD. Dla tego przypadku zaobserwowano większą wartość siły krytycznej  $L_{c2}$  powodującej delaminację warstw, gdzie  $L_{c2} = 7,8 \text{ N}$ . Z kolei wartość siły dla warstwy naniesionej metodą zol-żel była zdecydowanie mniejsza i wynosiła  $L_{c2} = 3,5 \text{ N}$  (FIG. 1). Dodatkowo niezależnie od metody nanoszenia warstwy  $\text{SiO}_2$  nie wystąpił sygnał emisji akustycznej, co świadczy o tym, że energia wiązania między powłoką a podłożem była zbyt niska. Ponadto w każdym przypadku zaobserwowano ciągłą plastyczną perforację warstwy.

The layer must be characterized by the appropriate mechanical properties, i.e. the required adhesion to the substrate, in order to properly fulfil its specified task. Therefore, scratch test was performed as the first stage, which allowed to observe that  $\text{SiO}_2$  layer applied by ALD method is characterized by the higher adhesion to 316LVM substrate. In this case, a higher value of the critical force  $L_{c2}$  was observed, which is responsible for causing delamination of layers and equals  $L_{c2} = 7.8 \text{ N}$ . Whereas the value of the critical force of the layer applied by sol-gel method was much lower and equals  $L_{c2} = 3.5 \text{ N}$  (FIG. 1). Additionally, regardless of the applying method of the  $\text{SiO}_2$  layer, there was no acoustic emission signal, which indicates that the binding energy between the layer and the substrate is too low. Furthermore, in any case, the continuous plastic perforation of the layer was observed.



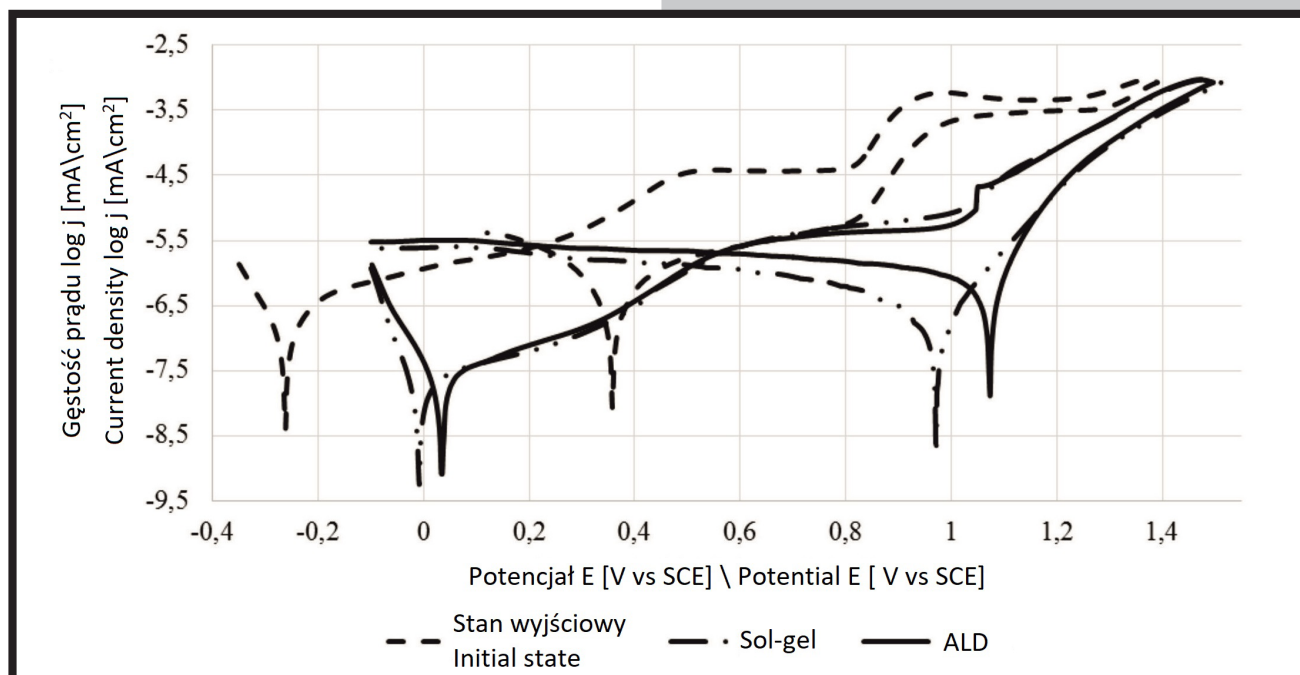
RYS. 1. Przykładowe wyniki adhezji dla próbek z warstwą  $\text{SiO}_2$  naniesioną metodą ALD.  
FIG. 1. Exemplary results for the samples from the adhesion layer of  $\text{SiO}_2$  deposited by ALD.

Wyniki uzyskanych badań potencjodynamicznych przedstawiono w TABELI 1 i na RYS. 2. Analiza uzyskanych w pracy przebiegów krzywych polaryzacji dla próbek w stanie wyjściowym jak i po procesie ALD i zol-żel wykazała brak pętli histerezy oraz występowanie korzystnego, w porównaniu do potencjału przebicia, potencjału transpasywacji (RYS. 2 i TABELA 1) świadczącego o dobrej odporności korozyjnej badanej stali w środowisku sztucznego osocza. Zarówno proces nanoszenia warstwy  $\text{SiO}_2$  metodą ALD, jak i zol-żel w odniesieniu do powierzchni w stanie wyjściowym przyczynił się do korzystnej poprawy odporności korozyjnej i zmniejszenia aktywności badanej powierzchni w środowisku korozyjnym. W szczególności zaobserwowano wzrost wartości potencjału korozyjnego  $E_{kor}$  oraz oporu polaryzacyjnego  $R_p$ , przy jednoczesnym obniżeniu wartości prądu korozyjnego  $i_{kor}$  (TABELA 1).

The obtained results of potentiodynamic tests are shown in TABLE 1 and FIG. 2. The analysis of the obtained polarization curves for baseline samples and after the application process of  $\text{SiO}_2$  layer using ALD and sol-gel method, showed no hysteresis loop and the presence of favourable transpassivation potential (FIG. 2 and TABLE 1) in comparison to the breakthrough potential, providing good corrosion resistance of this material in artificial plasma. Either, the process of applying the layer of  $\text{SiO}_2$  using ALD and sol-gel method in relation to the surface in the initial state contributed to a preferred improvement of the corrosion resistance and reduction of the activity of tested layers in a corrosive environment. There was observed an increase in corrosion potential  $E_{kor}$  and polarization resistance  $R_p$ , while reducing the corrosion current  $i_{kor}$  (TABLE 1).

TABELA 1. Wyniki badań potencjodynamicznych - wartości średnie.  
TABLE 1. The potentiodynamic test results - average values.

Próbka Sample	$E_{kor}$ , mV	$E_{tr}$ , mV	$R_p$ , $k\Omega \cdot cm^2$	$i_{kor}$ , $\mu A/cm^2$
stan wyjściowy initial state	$-211.7 \pm 63.5$	$1198.5 \pm 12.0$	$221.4 \pm 79.4$	$0.094 \pm 0.011$
ALD	$+15.8 \pm 32.0$	$1262.5 \pm 0.7$	$1075.0 \pm 21.2$	$0.017 \pm 0.005$
zol-żel sol-gel	$-13.7 \pm 22.0$	$1223 \pm 0.6$	$479 \pm 52.4$	$0.054 \pm 0.008$



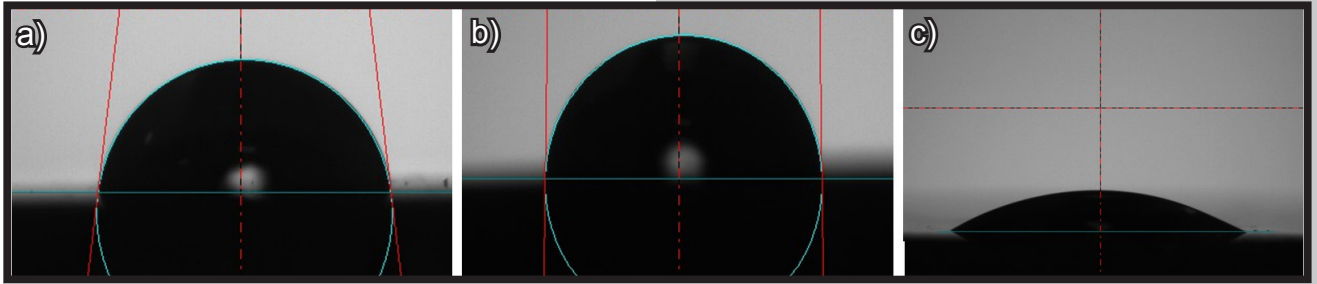
RYS. 2. Krzywe polaryzacji dla zmodyfikowanej powierzchniowo stali 316LVM.  
FIG. 2. Polarization curves for the surface-modified steel 316LVM.

Z kolei autorzy pracy [13] donoszą, że badania implantów ze stali 316LVM zarówno przed jak i po implantacji, których powierzchnia została poddana polerowaniu elektrolitycznemu i pasywacji chemicznej, przeprowadzone w SBF wykazały występowanie pętli histerezy pomiędzy potencjałami przebiccia o wartości około  $E_b = 1285$  mV oraz potencjałami repasywacji wynoszącymi około  $E_{cp} = -41$  mV. Z kolei autorzy pracy [10] donoszą, że na odporność korozyjną stali 316LVM z warstwą  $SiO_2$  niekorzystnie wpływa proces sterylizacji zarówno parowej, jak i tlenkiem etylenu przyczyniając się do obniżenia wartości potencjału korozyjnego, oporu polaryzacyjnego i wzrostu gęstości prądu korozyjnego.

Wyniki zwilżalności powierzchni przedstawiono na RYS. 3 i 4. Jedną z ważniejszych właściwości materiału jest jego hydrofilowość, którą określa się poprzez pomiar kąta zwilżania. Wpływa ona między innymi na poziom adsorpcji na powierzchni różnych molekuł, co związane jest z energią powierzchniową. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że próbki o powierzchni polerowanej elektrochemicznie i pasywowanej są hydrofilowe o dużej zwilżalności powierzchni ( $\theta_{av} = 81,63^\circ$ ). Badania implantów ze stali 316 LVM prowadzili również autorzy pracy [14]. Analizowali oni wpływ środowiska tkankowego na zmianę wartości kąta zwilżania implantów o powierzchni polerowanej elektrochemicznie oraz pasywowanej. Stwierdzili oni zwiększenie zwilżalności po określonym czasie przebywania implantu w organizmie. Wartości kąta zwilżania zmieniały się od  $59,6^\circ$  do  $64,2^\circ$ .

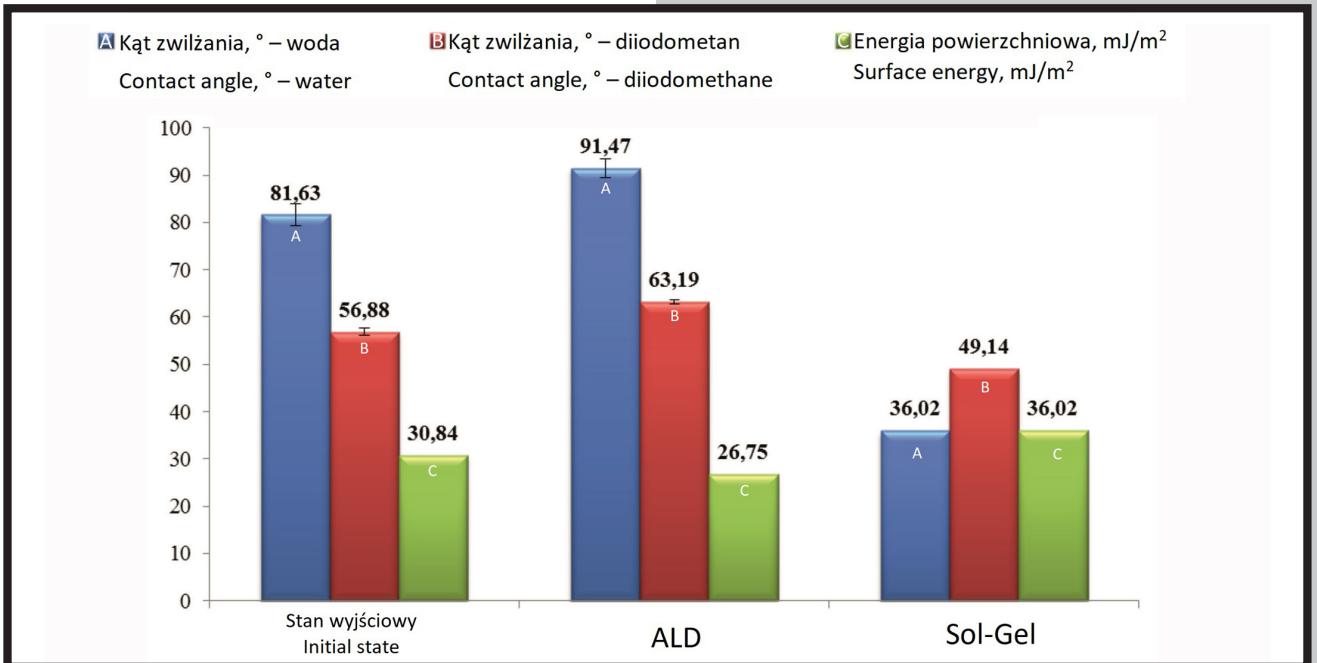
However, the authors [13] reported that studies of the implants made of steel 316LVM both before and after implantation, which surface has been subjected to electropolishing and chemical passivation performed in SBF, showed the presence of a hysteresis loop between the breakthrough potentials of about  $E_b = 1285$  mV, and the repassivation potentials amounting to about  $E_{cp} = -41$  mV. On the other hand, the authors [10] reported that the corrosion resistance of steel 316LVM with a layer of  $SiO_2$  is adversely affected by the sterilization process, both steam and ethylene oxide (EO) contributing to the reduction of the corrosion potential and polarization resistance and increase of the corrosion current density.

The results of the surface wettability are shown in FIGs. 3 and 4. One of the most important properties of the material is its hydrophilicity, which is determined by contact angle measurement. This material property affects the adsorption of different molecules on the surface, which is related to the surface energy. It was found, based on the obtained results, that the samples with surfaces after electrochemical polishing and passivation are hydrophilic with high surface wettability ( $\theta_{av} = 81.63^\circ$ ). The authors [14] have also performed studies concerning implants made of steel 316 LVM. They analysed the influence of the tissue environment on the value of contact angle of the implants after electrochemical polishing and passivation. They found an increase in the wettability after a certain residence time of the implant in the body. The contact angle varied from  $59.6^\circ$  to  $64.2^\circ$ .



RYS. 3. Przykładowy pomiar kąta zwilżania: a) stan wyjściowy, b) warstwa SiO<sub>2</sub> naniesiona metodą ALD, c) warstwa SiO<sub>2</sub> naniesiona metodą zol-żel.

FIG. 3. Example of the measurement of contact angles: a) the initial state, b) SiO<sub>2</sub> layer deposited by ALD, c) SiO<sub>2</sub> layer deposited by sol-gel.



RYS. 4. Ocena zwilżalności i energii powierzchniowej na podstawie pomiarów kąta zwilżania.

FIG. 4. Summary of wettability and surface energy on the basis of contact angle measurements.

Wytworzenie warstwy SiO<sub>2</sub> metodą ALD w temperaturze 300°C przy liczbie cykli 2000 na powierzchni badanych próbek spowodowało zwiększenie wartości kąta zwilżania ( $\theta_{av} = 91,47^\circ$ ), czyli charakter powierzchni zmienił się na hydrofobowy, co jest zjawiskiem korzystnym dla implantów do kontaktu z krwią w przeciwieństwie do warstw SiO<sub>2</sub> nanoszonych metodą zol-żel. W tym przypadku stwierdzono zwiększenie się zwilżalności powierzchni, co w przypadku biomateriałów stosowanych do kontaktu z krwią jest niekorzystne (RYS. 4).

The application of the SiO<sub>2</sub> layer on the samples surface using ALD method at 300°C with the number of 2000 cycles resulted in an increase of the contact angle ( $\theta_{av} = 91.47^\circ$ ). This indicates for a change in the surface property into hydrophobic, which is quite advantageous for implants in contact with blood. In the case of SiO<sub>2</sub> layer applied using sol-gel method the increase in the surface wettability was found, which is disadvantageous for biomaterials used in contact with blood (FIG. 4).

## Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników, niezależnie od metody nanoszenia warstwy SiO<sub>2</sub> stwierdzono korzystny jej wpływ na wybrane własności użytkowe w porównaniu do stanu bez warstwy. Ponadto zaobserwowano, że najkorzystniejszym zespołem własności mechanicznych, elektrochemicznych i fizycznych charakteryzuje się warstwa SiO<sub>2</sub> naniesiona metodą ALD. W tym przypadku zaobserwowano większą przyczepność do badanego podłoża, co ma zasadniczy wpływ na zachowanie się materiału w warunkach implantacji oraz długotrwałego kontaktu ze środowiskiem tkankowym podczas jego użytkowania (RYS. 1).

## Conclusions

Basing on the obtained results, regardless of the SiO<sub>2</sub> application method, the beneficial impact on selected functional properties was found. Moreover, it was observed that the layer of SiO<sub>2</sub> deposited by ALD was characterized by the most preferred combination of mechanical, physical and electrochemical properties. In this case, the increased adhesion of the tested layer to the substrate was observed, which has a significant impact on the behaviour of the material under conditions of implantation and prolonged contact with the tissue environment during its use (FIG. 1).



Dodatkowo warstwa SiO<sub>2</sub> naniesiona metodą ALD charakteryzowała się dwukrotnie lepszą odpornością na korozję w porównaniu do warstwy naniesionej metoda zol-żel (RYS. 2, TABELA 1). Bardzo ważna jest również analiza charakteru warstwy powierzchniowej biomateriału pod względem zwilżalności, która pozwala na ocenę, między innymi zachowania się komórek organizmu. Uzyskane wartości kąta zwilżania w przypadku metody ALD są bardzo korzystne, ponieważ warstwy charakteryzują się powierzchnią hydrofobową, czyli mniejszą zwilżalnością, dla których pożądana jest mała adsorpcja białek, która ogranicza proces krzepnięcia krwi. Jednakże w przypadku metody zol-żel uzyskano powierzchnię hydrofilową, czyli o większej zwilżalności, co jest zjawiskiem niekorzystnym, ponieważ sprzyja to adhezji komórek do powierzchni biomateriału. Zastosowane metody ALD dla analizowanego biomateriału jest uzasadnione i w pełni przydatne dla poprawy bezpieczeństwa użytkowania wszczepu. W celu pełniejszego scharakteryzowania powierzchni stali 316LVM z naniesioną warstwą SiO<sub>2</sub> metodą ALD w kolejnych etapach przeprowadzone zostaną badania m.in. stopnia hemolizy. Uzyskane wyniki będą stanowić podstawę do opracowania bardziej szczegółowych kryteriów oceny finalnej jakości wyrobów medycznych do kontaktu z krwią, co zapewni wymaganą hemokompatybilność implantów i przyczyni się do minimalizacji ryzyka powikłań pooperacyjnych. W efekcie przyczyni się to do wzrostu skuteczności leczenia schorzeń układu krwionośnego, zmniejszenia wskaźnika hospitalizacji i poprawy jakości życia pacjentów. Uzyskane wyniki badań mogą stanowić istotny wkład w wyjaśnienie procesów zachodzących na powierzchni implantów w kontakcie z krwią.

## Podziękowania

*Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr 2014/13/D/ST8/03230.*

Additionally, the SiO<sub>2</sub> layer deposited by ALD was characterized by twice better resistance to corrosion in comparison to the layer applied using sol-gel (FIG. 2, TABLE 1). It is very crucial to perform the analysis of the surface layer of the biomaterial in terms of wettability, which allows to evaluate the behaviour of blood cells. The results obtained from contact angle measurements are very favourable in the case of ALD, because the hydrophobic surface is related to low protein adsorption, which restricts the blood clotting process. However, in the case of sol-gel method, the hydrophilic surface was observed, which is disadvantageous due to the cellular adhesion to the surface of the biomaterial. The use of ALD method is fully reasonable and useful for improving the safety of the implant. In order to obtain more completed characterization of the surface of steel 316LVM with SiO<sub>2</sub> layer applied by ALD, it is necessary to carry out subsequent studies including hemolysis. The results will provide basis for the development of more specific criteria for assessing the quality of the final medical devices in contact with blood, which will determine the required hemocompatibility of implants and will help to minimize the risk of postoperative complications. As a result, this will help to increase the effectiveness of the treatment of cardiovascular system disorders, reduce the rate of hospitalization and improve the quality of patient's life. The research results can provide an important contribution to the explanation of processes occurring on the surface of the implant in contact with blood.

## Acknowledgements

*The project was funded by the National Science Centre granted under decision No 2014/13 /D/ST8/03230.*

## Piśmiennictwo

- [1] Yusuke F., Guilherme F.: A Difference in vascular response between sirolimus-eluting- and everolimus-eluting stents in ostial left circumflex artery after unprotected left main as observed by optical coherence tomography. *International Journal of Cardiology* 230(1) (2017) 284-292.
- [2] Fei W., Yan Z., Xiumian Ch., Bing L., Xin G., Tao Z.: ALD mediated heparin grafting on nitinol for self-expanded carotid stents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 143(1) (2016) 390-398.
- [3] Driver M.: Coatings for cardiovascular devices: coronary stents. *Coatings for Biomedical Applications* (2012) 223-250.
- [4] Walke W., et al.: Evaluation of physicochemical properties of SiO<sub>2</sub>-coated stainless steel after sterilization. *Materials Science and Engineering: C* 63(1) (2016) 155-163.
- [5] Raval A., Choubey A., Engineer Ch., Kothwala D.: Development and assessment of 316LVM cardiovascular stents. *Materials Science and Engineering: A* 386(1-2) (2004) 331-343.
- [6] Karasinski P.: Influence of technological parameters on the properties of sol-gel silica films. *Optica Applicata* 1 (2005) 253-63.
- [7] Dou W., Wang P., Zhang D., Yu J.: An efficient way to prepare hydrophobic antireflective SiO<sub>2</sub> film by sol-gel method. *Materials Letters*, 167 (2016) 69-72.
- [8] Lee Y., Choi D., Shong B., Oh S., Park J.: Low temperature atomic layer deposition of SiO<sub>2</sub> thin films using di-isopropylaminosilane and ozone. *Ceramics International* 43(2) (2017) 2095-2099.

## References

- [9] Owens G., Singh R., Foroutan F., Alqaysi M., Han Ch., Mahapatra Ch., Kim H., Knowles J.: Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science* 77 (2016) 1-79.
- [10] Basiaga M., Walke W., Paszenda Z., Kajzer A.: The effect of EO and steam sterilization on mechanical and electrochemical properties of titanium grade 4. *Materials in Tehnologije / Materials and Technology* 50(1) (2016) 153-158.
- [11] PN-EN 1071-3. Techniczna ceramika zaawansowana. Metody badan powłok ceramicznych.
- [12] ASTM F2129 - Electrochemical Corrosion Testing of Surgical Implants (Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices)
- [13] Xu. L.C.: Effect of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28 (2007) 3273-3283.
- [14] Kajzer A., Kajzer W., Gołombek K., Knol M., Dzielicki J., Walke W.: Corrosion resistance, EIS and wettability of the implants made of 316 LVM steel used in chest deformation treatment. *Archives of Metallurgy and Materials* 61(2) (2016) 767-770.



## OPERACYJNE LECZENIE ZŁAMANIA KOŚCI ZA POMOCĄ DRUTÓW KIRSCHNERA U MŁODEGO KOTA

MAGDALENA ZIABKA<sup>1\*</sup>, PIOTR DERKOWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA CERAMIKI I MATERIAŁÓW OGNIOTRWAŁYCH,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

<sup>2</sup> KLINIKA WETERYNARYJNA ARKA,  
UL. CHŁOPSKA 2A, 30-806 KRAKÓW

\* E-MAIL: ZIABKA@AGH.EDU.PL

### Streszczenie

W pracy przedstawiono technikę stabilizacji złuszczonej nasady dalszej kości promieniowej i złamanie przynasadowe dalsze kości łokciowej u dziesięcioletniego kota rasy europejskiej za pomocą drutów Kirschnera. Wykonano diagnostykę obrazową metodą rentgenograficzną przed i po zaimplantowaniu drutów. Na podstawie badania rentgenowskiego postawiono diagnozę: kilkudniowe złuszczenie nasady dalszej kości promieniowej lewej i złamanie wyrostka ryłkowego kości łokciowej. Kot został poddany sedacji, a następnie narkozie wziewnej. Przeprowadzono zabieg operacyjny polegający na stabilizacji kości promieniowej za pomocą drutów Kirschnera stosując ułożenie na krzyż przechodzące przez nasadę dalszą i istotę korową kości promieniowej. Kończyna została zabandażowana i usztywniona na okres 4 tygodni. Po miesiącu przeprowadzono zabieg reoperacji mający na celu usunięcie wszczepów. Następnie przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego i spektrometru dyspersji energii promieniowania X (SEM-EDX) przeprowadzono obserwacje mikrostrukturalne i analizę chemiczną EDS w mikroobszarach implantów. Przeprowadzone badania RTG wykazały poprawne nastawienie kości i całkowite jej zrośnięcie po 4 tygodniach od operacji. Analiza SEM-EDS wykazała brak śladów korozji drutów Kirschnera oraz brak obecności niklu w tkankach otaczających implanty. Przez cały czas rehabilitacji zastosowana stabilizacja zapewniła kotu normalne funkcjonowanie, bez znacznego dyskomfortu.

**Słowa kluczowe:** druty Kirschnera, implanty do osteosyntezy, analiza RTG, analiza SEM-EDS

[Inżynieria Biomateriałów 141 (2017) 20-27]

### Wprowadzenie

Koty, mimo że w swojej naturze przygotowane do oddawania długich skoków i amortyzowania zeskoków z dużej wysokości, ulegają urazom kończyn. Najczęściej dochodzi do nich podczas zeskoku, zaplątania (np. w siatkę ogrodzeniową), potrącenia przez samochód lub agresji ze strony innego zwierzęcia lub człowieka. Kot ze złamaną kończyną wymaga opieki weterynaryjnej.

## OPERATIVE TREATMENT OF BONE FRACTURE WITH KIRSCHNER WIRES - YOUNG CAT CASE

MAGDALENA ZIABKA<sup>1\*</sup>, PIOTR DERKOWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMIC,  
DEPARTMENT OF CERAMICS AND REFRACTORIES,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup> VETERINARY CLINIC ARKA,  
UL. CHŁOPSKA 2A, 30-806 KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: ZIABKA@AGH.EDU.PL

### Abstract

This case study shows a cross pin technique of treating an epiphyseal fracture using the Kirschner wires in the case of a ten-month old European cat. The radiological diagnosis was performed both before and after the implantation. The radiological diagnosis proved a few day epiphyseal exfoliation of the left distal radius and the epiphyseal fracture of the distal ulna. The cat was sedated and subjected to general anesthesia. An operation was performed to stabilize the radius with the Kirschner wires, using the cross pin technique going through the distal epiphyseal and the cortical bone of the radius. The limb was immobilised for 4 weeks. After one month the reoperation was performed to remove the Kirschner wires. The microstructure of the implanted wires was observed using the scanning electron microscope equipped with X-ray energy dispersion spectrometer (SEM-EDS). The chemical analysis in the area around the operated tissue was performed. The radiological analysis showed the proper bone adjustment and its complete healing after 4 weeks after the surgery. The SEM-EDS analysis revealed no corrosion of the wire and lack of nickel in the tissues surrounding the implants. Throughout the rehabilitation the applied stabilization assured the cat the ordinary living conditions without noticeable discomfort.

**Keywords:** Kirschner wires, implants for osteosynthesis, RTG analysis, SEM-EDS analysis

[Engineering of Biomaterials 141 (2017) 20-27]

### Introduction

Cats, despite their natural ability of agile moves and absorbing jumps from heights, sometimes fall victim to accidents. Injuries occur as a consequence of entangling the limbs, being hit by a car or attacked by another animal or human. An injured cat requires a veterinary treatment.

At first, depending on the type of injury, it is recommended to treat the injured cat with anti-shock drugs and painkillers in order to calm it and prepare for further procedures. Next, the radiological examination should be performed to define the injuries and take decisions regarding the further steps and prevision concerning the wound healing. The technique of stabilization the fracture with nails or wires is well-known and it is often used to help small animals [1-4]. Although it is quite easy to implement, it is not suitable for every injury.

W pierwszej kolejności zaleca się, w zależności od urazu, odpowiednie zaopatrzenie przeciwwstrząsowe pacjenta oraz podanie leków przeciwbólowych, aby uśmierzyć ból i uspokoić kota. Po stabilizacji stanu ogólnego wykonuje się badanie radiologiczne w celu określenia uszkodzeń, podjęcia decyzji dalszego leczenia i przewidywań dotyczących gojenia się rany. Technika stabilizacji przy pomocy gwoździa lub drutu jest często stosowana u małych zwierząt i stosunkowo prosta jednak nie w każdym wypadku wystarczająco skuteczna [1-4]. Niezależnie od tego wymaga cierpliwości i ekspertyzy technicznej połączonej z dobrym zrozumieniem biomechaniki i procesu gojenia się złamanych kości. Zwykle u kotów używane są druty Kirschnera. Celem każdego zabiegu zespolenia złamania jest szybkie i kompletne przywrócenie funkcji kończyny. Niezbędne jest zapewnienie stabilnego ustawienia kości i przywrócenie pełnego zakresu ruchu stawu. Osteosynteza przy użyciu wewnętrznie zamocowanych implantów zmierza do osiągnięcia tego celu poprzez wykonanie repozycji i stabilizacji złamania poprzez założenie stabilizujących drutów Kirschnera [5,6].

Techniki zespolenia wewnętrznego zaczerpnięte są z technik i metod zespolenia stosowanych u ludzi. Wyroby medyczne, czyli implanty stosowane w medycynie weterynaryjnej obejmują między innymi szpilkę Steinmanna, drut Kirschnera, gwoździe Kuntschera, szpilki Rusha, drut kostny, płyty blokowane oraz stabilizację zewnętrzną [7-9]. Asortyment implantów dostępnych dla zwierząt jest coraz większy, jednakże to lekarz weterynarz mając na uwadze dobro swojego pacjenta oraz indywidualny charakter złamania decyduje o wyborze wszczepu oraz techniki operacyjnej. Podstawowym warunkiem decydującym o wyborze materiału przeznaczonego na implant jest jego biogodność, czyli zgodność biologiczna, która związana jest z zachowaniem się biomateriału w organizmie. Materiały biogodne nie powinny wykazywać działania cytotoksycznego dla otaczającego układu biologicznego.

Typowe przykłady metali stosowanych na implanty ortopedyczne u zwierząt obejmują stopy chirurgicznej stali nierdzewnej i tytanu. Stal nierdzewna używana jest do produkcji implantów ze względu na dobre właściwości mechaniczne, stosunkowo niską cenę i łatwy sposób wytwarzania. Wykazuje ona jednak słabą odporność na zużycie i niską odporność na korozję. Interakcja między otaczającym środowiskiem fizjologicznym a powierzchnią implantu ma także kluczowe znaczenie, ponieważ może prowadzić do utraty funkcji implantu i mieć niepożądany wpływ na pacjenta, powodując odrzucenie implantu przez otaczające tkanki [10].

Celem tego artykułu jest zatem przekazanie czytelnikowi informacji o leczeniu złamań kości za pomocą drutów metalowych i wykazanie, że te badane implanty są odporne na korozję.

## **Materiały i metody**

Kot rasy europejskiej w wieku 10 miesięcy został przywieziony do kliniki ARKA, z utrzymującą się kulawizną lewej przedniej kończyny od kilku dni. Badanie kliniczne wykazało bolesność i deformację okolicy lewego nadgarstka. W badaniu radiologicznym stwierdzono złuszczenie nasady dalszej kości promieniowej lewej, złamanie przynasadowe dalszej kości łokciowej. Złamanie zgodnie z klasyfikacją Saltera-Harrisa sklasyfikowano jako typ I [11]. Jest to uraz występujący u młodych zwierząt z niedojrzałym kośćcem i niezakończonym procesem wzrostu.

It also takes an experienced surgeon to correctly define a scale of the damage and act in respect to biomechanical details and the healing process of the broken bones. In general, cats' injuries might be successfully treated with the Kirschner wires. The aim of any fracture treatment is a rapid and complete restoration of the limb function. A stable realignment of bones and restoration of the full range of motion in the joint are necessary for the complete limb function. Osteosynthesis attempts to achieve this goal by open reduction and internal fixation using implants [5,6].

The technique of the internal fixation of the animal bone fractures is derived from the one used for humans. The medical devices, i.e. implants used in veterinary medicine include among others: the Steinmann pin, Kirschner wire, Rush pin, Kuntscher nail, bone wire, locking plates and external joints [7-9]. The assortment of implants available for animals is increasing. Therefore, keeping in mind the wellness of the patient and the individual nature of the fracture, a veterinary doctor chooses the implant type and the surgical technique. The fundamental requirement for a metallic implant material is its biocompatibility, which is related to the behaviour of biomaterials. Materials should not exhibit any toxicity to the surrounding biological system.

Common metals used in animal orthopaedic implants include the surgical stainless steel and titanium alloys. Stainless steel is used as an implant due to its good mechanical properties, a relatively low price and an easy manufacturing process. However, it possesses poor wear properties, such as the force-bearing surface and low corrosion endurance. The interaction between the surrounding physiological environment and the surface of the implant is crucial as it may lead to the failure of the implant to function the way it was intended to. Another risk may be an adverse effect on the patient, resulting in the rejection of the implant by the surrounding tissue [10].

Therefore, the aim of this study is to give a reader the information of bone fracture treatment using metallic wires and prove the corrosion resistance of the investigated implants.

## **Materials and Methods**

A 10-month old European cat was delivered to the ARKA veterinary center with the lameness of the left forelimb persisting for several days. The clinical examination showed pain and deformation in the area of the wrist. The radiological diagnosis proved epiphyseal exfoliation of the left distal radius and epiphyseal fracture of the distal ulna. According to the Salter-Harris classification, the bone fracture was described as type I [11]. Such an injury is typical for young cats with immature skeleton and still within the growing process. In many cases such injuries are treated in a traditional manner, i.e. the fracture reposition and application of a stiffening bandage.

In this case such a treatment would not have been effective as the accident had taken place quite a long time before and the bone fracture was considerably displaced. Therefore, the Kirschner wires were selected as the most effective method of treatment (FIG. 1).

In addition, it was decided to use the Kirschner wires because of the simplicity of the method, the minimal risk of growth plate damage and a very small (a few millimeters) size of the distal fraction. Such a method also makes the removal of the implant an easy procedure. The proposed stabilization is an optimal solution for young cats. It was decided to stabilize only the radial bone, which is responsible for load carrying of the front limb. The ulna fracture was left to spontaneous healing.

••••• Często metodą leczenia takiego urazu jest leczenie zachowawcze, repozycja i opatrunek ustalający. Jednak w tym wypadku, ze względu na znaczne przesunięcie odłamów i czas, który upłynął od urazu zaproponowano leczenie operacyjne przy użyciu stabilizacji drutami Kirschnera (RYS. 1).

Dodatkowo zdecydowano się na zastosowanie drutów Kirschnera ze względu na prostotę metody, minimalne uszkodzenie chrząstki wzrostu, bardzo mały (kilkumilimetry) rozmiar odłamu dalszego oraz łatwość późniejszego usunięcia implantów. Zaproponowana stabilizacja jest optymalnym rozwiązaniem do zastosowania u młodych kotów. Zdecydowano się na stabilizację tylko kości promieniowej, która przenosi większość obciążeń kończyny przedniej, złamanie kości łokciowej pozostawiono do samoistnego zagojenia.

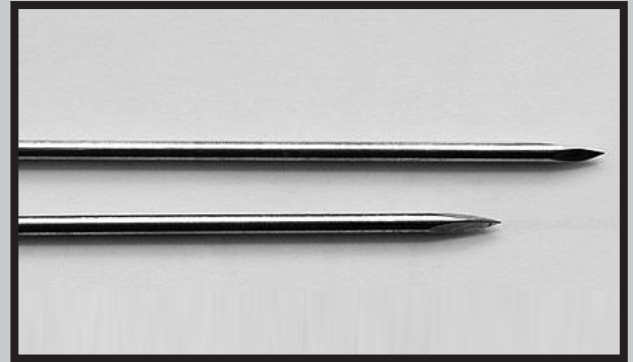
Kot został poddany sedacji: Medetomidyny chlorowodorek (Dorbene) w dawce 50 µg/kg j.m. + Butorfanol (Torbugesic) w dawce 25 µg/kg j.m. + Ketamina (Bioketan) w dawce 3 mg/kg j.m. Następnie założono kateter dożylny. Indukcja znieczulenia ogólnego - Propofol (Scanofol) dożylnie według efektu działania. Intubacja pacjenta i narkoza wziewna izofluranowa + tlen. Przygotowano powierzchnię operacyjną. W tym celu kończyna, część obwodowa (palec i dłoń) została zabezpieczona sterylną serwetą. Dostęp chirurgiczny: okolica grzbietowa nadgarstka pomiędzy mięśniami: prostownikiem wspólnym palców a prostownikiem promieniowym nadgarstka. Dokonano repozycji złamania przy zgiętym stawie nadgarstkowym, a następnie ustabilizowano złamanie przy pomocy dwóch gwoździ Kirschnera o średnicy 1,2 mm firmy Medgal, wprowadzonych od strony bocznego i przyśrodkowego wyrostka rylcowatego i zakotwiczonych w przeciwległej istocie korowej przynasady kości promieniowej. Zamknięcie rany było rutynowe: resorbowalne nici chirurgiczne, Biosyn 3/0. Na ranę w obszarze operacyjnym zastosowano maść gentamycynową i założono opatrunek Roberta-Jonesa. Po zabiegu zastosowano osłonę antybiotykową amoksycylina + kw. klawulonowy początkowo w iniekcji (Synulox), a w kontynuacji w tabletkach (Clavaseptin) 10 mg/kg, oraz ochronę przeciwbólową początkowo Tramadol (Tramal) 4 mg/kg + Meloxicam (Meloxidyl) 0,2 mg/kg w iniekcji, a następnie Meloxidyl w zawieszynie 0,05 mg/kg. Kończyna została zabandażowana i usztywniona na okres 4 tygodni.

W przypadku niedojrzałych pacjentów ważne jest by wszczepy usuwać, gdy tylko ich obecność przestaje być niezbędna dla stabilności i funkcjonowania kości. Może to być moment zrostu klinicznego (6-12 tygodni), ale bezpieczniejszy jest moment zrostu radiologicznego [12]. W przypadku badanego pacjenta czas ten wyniósł 4 tygodnie.

Po upływie miesiąca wykonano ponownie prześwietlenie RTG i przeprowadzono reoperację celem usunięcia drutów stabilizujących. Druty poddano obserwacjom i analizie przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego współpracującego ze spektrometrem dyspersji energii promieniowania X.

### Diagnostyka RTG

Diagnostykę obrazową RTG wykonano przy użyciu analizy rentgenowskiej (Lampa Orange 1060HF, Skaner CR- Agfa CR 10-X w warunkach: 3,2 mAs i 46 kV).



**RYS. 1. Druty Kirschnera przed implantacją.**  
**FIG. 1. Kirschner wires before the implantation.**

The cat was sedated with Medetomidine hydrochloride, (Dorbene) in the amount of 50 µg/kg IU + Butorphanol, (Torbugesic) in the amount of 25 µg/kg IU + Ketamine (Bioketan) in the amount of 3 mg/kg IU. An intravenous catheter was then placed. The induction of general anesthesia was achieved by means of Propofol (Scanofol) applied intravenously as needed. Next, the patient was intubated and inhaled with narcotic isoflurane + oxygen. The surgical area was prepared. For this purpose the peripheral part of limb (fingers and palm) was protected by a sterile serviette. The surgical access was the dorsal region of the wrist between the muscles: common finger joint rectifier and the radial wrist rectifier. Afterwards, the bone fracture was repositioned and stabilized with two Kirschner wires of 1.2 mm in diameter (Medgal Company), using the cross pin technique. The wires were inserted from the lateral and paracentral styloid process and anchored in the opposite cortical bone of the radius epiphyseal. The surgical wound was sutured with needled Biosyn 3-0. The wound area was treated with the gentamicin ointment and protected with a stiff bandage by Robert-Jones. After the surgery the cat was treated with antibiotics and painkillers: initially Amoxicillin + Clavulanic acid (Synolux), followed by tablets (Clavaseptin) 10 mg/kg and analgesic treatment- initially Tramadol (Tramal) 4 mg/kg + injection of Meloxicam (Meloxidyl) 0.2 mg/kg, followed by Meloxidyl in suspension of 0.05 mg/kg. The limb was immobilised for 4 weeks.

In the case of immature patients, it is important to remove the implants as soon as their presence is no longer necessary for the bone stability and function. This may be a time of clinical symphysis (6-12 weeks), but radiological symphysis is safer [12]. For the examined patient 4 weeks were a sufficient enough period before reoperating.

After one month the RTG analysis was performed and the Kirschner wires were removed during the reoperation. The wires were observed using the scanning electron microscope equipped with X-ray energy dispersion spectrometer.

### RTG analysis

The X-ray imaging was performed using an X-ray imaging device Orange-Lamp 1060HF, Scanner CR- Agfa CR 10-X under the following conditions: 3.2 mAs and 46 kV.



### Skaningowa Mikroskopia Elektronowa (SEM)

Mikrostruktura drutów Kirschnera była badana przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (Nova Nano SEM 200, FEI). Analizę chemiczną wykonano przy użyciu spektrometru dyspersji energii promieniowania X umożliwiającego analizę w mikroobszarach (EDS, EDAX). W celu przeprowadzenia precyzyjnych analiz do badań użyto detektora elektronów wstecznie rozproszonych (BSE). Wyniki przedstawiono w formie map rozkładu pierwiastków w badanych obszarach przed i po reimplantacji oraz widm pokazujących jakościowy skład chemiczny i w formie tabel zawierających ilościową zawartość poszczególnych pierwiastków w badanych implantach.

## Wyniki i dyskusja

### Diagnostyka RTG

Na RYS. 2A pokazano złamanie lewego podramienia 10 miesięcznego kota. Wyraźnie widać przemieszczenie się nasady dalszej kości promieniowej i złamanie kości łokciowej wraz z odklejeniem chrząstki. Na RYS. 2B pokazano stabilizację złamania poprzez zaimplantowanie drutów Kirschnera. Widać prawidłową stabilizację kończyny, dwa druty Kirschnera wprowadzone od końca kości (wprowadzenie w kierunku wstępującym) i przeprowadzony przez miejsce złamania. Druty ułożone na krzyż zapewniają stabilizację złamanego fragmentu kości. RYS. 2C pokazuje stabilizację złamanej kości drutami Kirschnera przed reoperacją mającą na celu ich usunięcie. RYS. 2D pokazuje natomiast zespolone złamanie po wyjęciu implantów.

Wewnętrzne łączenie kości u kotów najlepiej się sprawdza, ponieważ na zewnątrz jest tylko mała rana, zszyta i nieuciążliwa dla kota. Kot tuż po wybudzeniu się z narkozy może zacząć chodzić, co zapewnia mu duży komfort i znacznie przyspiesza rehabilitację. Oczywiście kot powinien mieć ograniczoną ruchliwość, należy sprawić, aby unikał zeskoków, ale poza tym taka stabilizacja zapewni mu normalne funkcjonowanie, bez znacznego dyskomfortu.

### Scanning electron microscopy (SEM) analysis

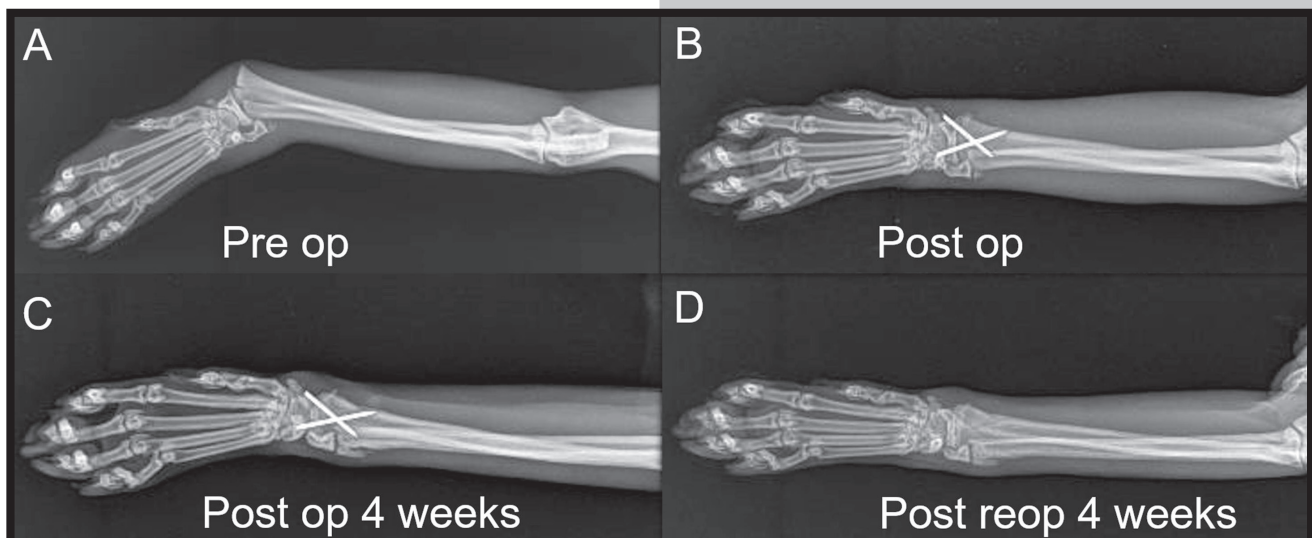
The wires' microstructure was investigated with the field emission gun scanning electron microscopy FEG-SEM utilizing a Nova Nano SEM 200, FEI Company. The observations were performed together with the chemical analysis of the specimens in microareas with the energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS, EDAX). The observations were carried out using Back Scattered Electron Detector (BSE) providing the detailed chemical analysis. The results are presented in the form of elements mapping distribution in the measured area, spectra and table demonstrating the qualitative and quantitative chemical composition of elements present on the surface of the tested implants.

## Results and Discussions

### RTG diagnostics

FIG. 2A shows the radial physeal fracture of a 10-month old cat. It is clearly visible that the epiphyseal distal of radius is displaced, the ulna - fractured and the growth plate - separated. FIG. 2B shows the bone fracture stabilization with the Kirschner wires. The proper bone fracture stabilization with Kirschner wires is visible. The wires are inserted from the distal part of the bone through the bone fracture. The cross pin fixation technique provides an excellent stabilization of the bone fracture. FIG. 2C shows the bone fracture stabilization with the Kirschner wires before reoperating while in FIG. 2D the bone without the Kirschner wires after reimplantation is shown.

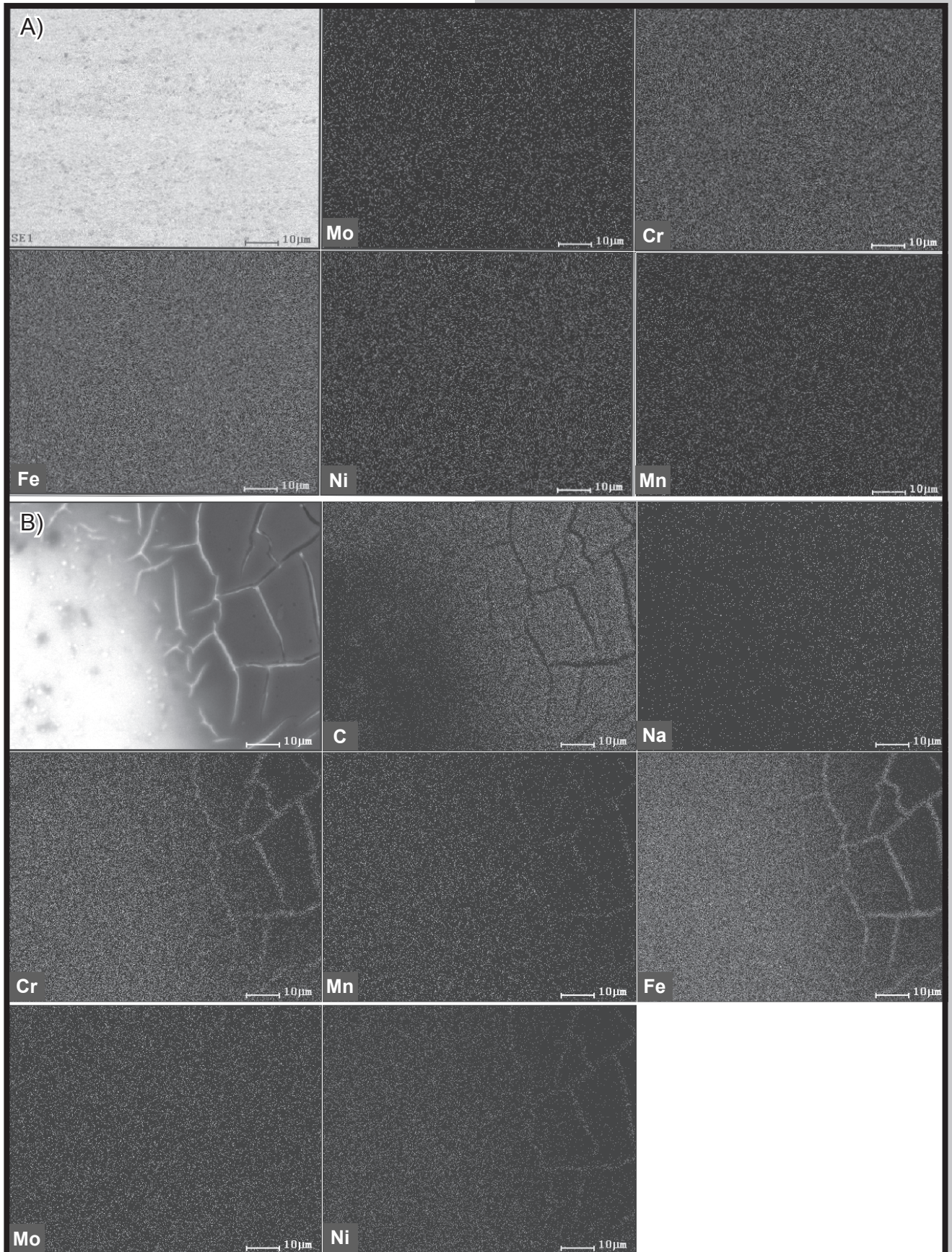
The method of intramedullary pin fixation of epiphyseal fracture is very comfortable as it assures quite a normal behavior of the animal during the convalescence. There is just a little wound outside, with small stitches. The cat straight after anesthesia is able to walk, which also shortens the time required for healing. Obviously, the cat should have only a limited area to move freely and a number of jumps should be minimized. Apart from such limitations, this kind of stabilization ensures the ordinary living conditions without noticeable discomfort.



RYS. 2. Zdjęcie RTG złamanych kości (A) wykonane bezpośrednio przed operacją, (B) po stabilizacji drutami Kirschnera, kontrola bezpośrednio po operacji, (C) po stabilizacji drutami Kirschnera, kontrola po miesiącu od operacji, (D) po reoperacji i wyjęciu drutów, kontrola po miesiącu od operacji.

FIG. 2. RTG of bone fracture (A) before the implantation, (B) with the Kirschner wires after the implantation - control immediately after the surgery, (C) with the Kirschner wires after the implantation - control after one month of the surgery, (D) control after one month after the reoperation.





RYS. 3. Mapa rozkładu pierwiastków dla drutu Kirschnera (A) przed implantacją - widoczne pierwiastki (Mo, Cr, Mn, Fe, Ni) odpowiadają składowi chemicznemu charakterystycznemu dla drutu, (B) miesiąc po reimplantacji - widoczne pierwiastki (Mo, Cr, Mn, Fe, Ni, C, Na) odpowiadają składowi chemicznemu charakterystycznemu dla drutu i tkanki pokrywającej powierzchnię implantu.

FIG. 3. EDS elements mapping of the Kirschner wire (A) before the implantation - the visible elements (Mo, Cr, Mn, Fe, Ni) correspond to the chemical composition of the wire (B) after one month of the reimplantation - the visible elements correspond to the chemical compositions of the wire and the tissue covering the implant.



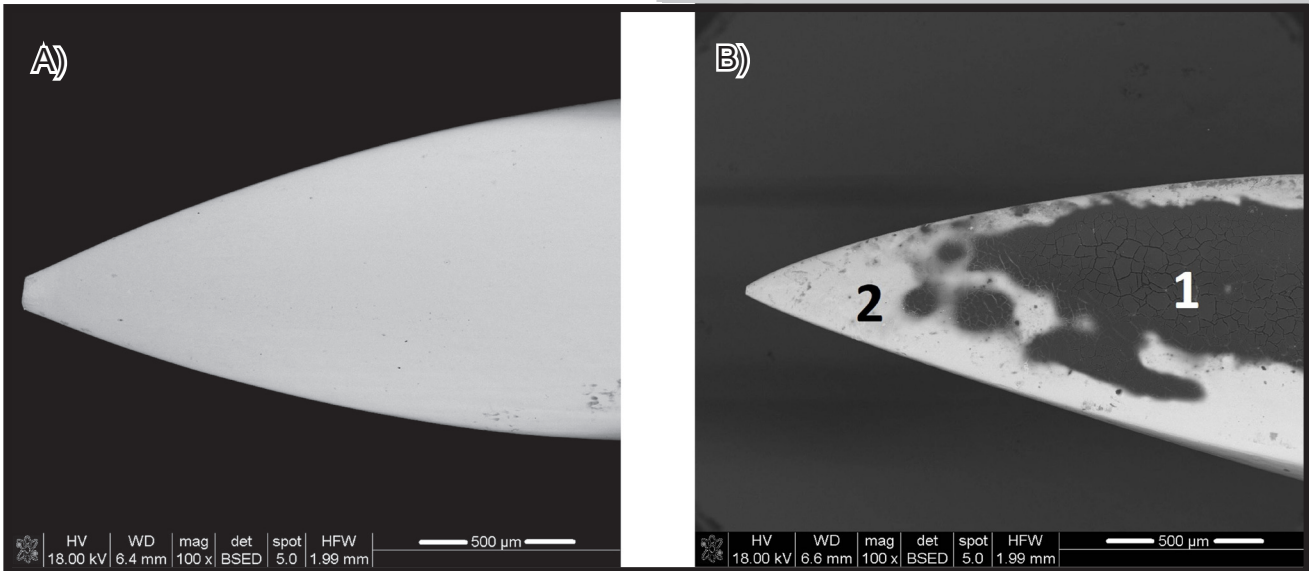
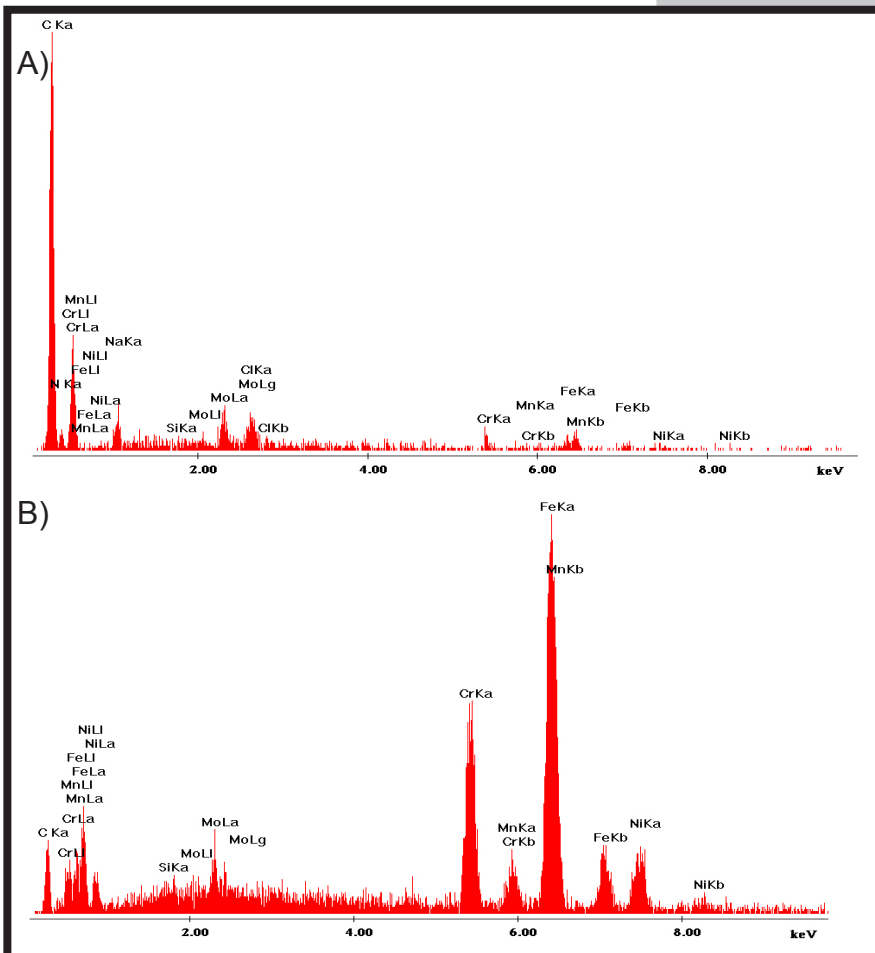


FIG. 4. Zdjęcia SEM drutów Kirschnera: A) sterylnego drutu przed implantacją i B) drutu wyjętego po miesiącu od implantacji – na zdjęciu widoczne dwa punkty, w których przeprowadzono analizę EDS.

FIG. 4. SEM picture of the Kirschner wire: A) before and B) after one month of implantation - two points in which the EDS analysis was performed.



RYS. 5. Analiza EDS drutu Kirschnera wyjętego po miesiącu od implantacji (A) odpowiadająca punktowi 1 - pokazującemu skład chemiczny występującej tkanki, (B) odpowiadająca punktowi 2 - pokazującemu skład chemiczny wszczepu.

FIG. 5. EDS analysis of the Kirschner wire after one month of implantation (A) corresponding to point 1 showing the chemical composition of the tissue, (B) corresponding to point 2 showing the chemical composition of the implant.

TABELA 1. Skład chemiczny drutu Kirschnera wyjętego po miesiącu od implantacji, P1 - badany w obszarze pozostałości tkanki, P2 - badany w obszarze samego wszczepu.  
TABLE 1. Element composition of the Kirschner wire after one month of implantation, P1 - examined in the area of the occurring tissue, P2 - examined in the area of the implant.

P1		
Pierwiastek Element	% wag. wt%	At %
<b>C K</b>	<b>75.0</b>	<b>84.9</b>
<b>N K</b>	<b>11.5</b>	<b>11.1</b>
<b>NaK</b>	<b>2.0</b>	<b>1.2</b>
SiK	0.2	0,1
MoL	4.2	0.6
<b>CrK</b>	<b>2.1</b>	<b>0.8</b>
CrK	1.4	0.4
MnK	0.0	0.0
FeK	3.7	0.9
NiK	0.0	0.0
Total	100.0	100.0
P2		
Pierwiastek Element	% wag. wt%	At %
<b>C K</b>	<b>11.8</b>	<b>38.4</b>
SiK	0.5	0.7
MoL	3.2	1.3
<b>CrK</b>	<b>16.3</b>	<b>12.2</b>
MnK	2.6	1.8
<b>FeK</b>	<b>52.2</b>	<b>36.5</b>
<b>NiK</b>	<b>13.6</b>	<b>9.0</b>
Total	100.0	100.0

## Obserwacje SEM

Na RYS. 3 pokazano mapę rozkładu pierwiastków dla sterylnego drutu Kirschnera i drutu zbadanego po wyjęciu go miesiąc po operacji zespalającej. Rozkład pierwiastków zmierzony dla czystego implantu wskazuje na równomierne rozłożenie wszystkich pierwiastków odpowiadających składem stali implantacyjnej (Mo, Cr, Mn, Fe, Ni). W przypadku drutu badanego po usunięciu go z kończyny kota, na powierzchni implantu zaobserwowano obecną wyraźną warstwę, która przybrała formę sieci. W składzie chemicznym oprócz pierwiastków odpowiadających stali wykryto dodatkowo węgiel, azot, sód, chlor, a więc pierwiastki pochodzące od tkanki.

Na RYS. 4 pokazano mikrostrukturę drutów po wyjęciu z kości. Badana powierzchnia drutów jest gładka, nie widać na niej śladów korozji (RYS. 5B). Na badanej powierzchni nie zaobserwowano jakichkolwiek wad, takich jak pęknięcia lub pory, które mogłyby mieć wpływ na proces korozji. Analiza EDS (TABELA 1, P2) wykonana w punktach potwierdziła skład chemiczny badanych drutów odpowiadający stali 316L. Wartość poszczególnych pierwiastków zgodna jest z typowym składem stali implantacyjnej poza obecnością dużej zawartości węgla. Jego zwiększona zawartość spowodowana jest prawdopodobnie obecnością niewielkiej ilości tkanki na całej powierzchni wszczepu. W analizie EDS zaobserwowano także występowanie obszarów pokrytych tkanką – obszar widoczny w punkcie P1 (RYS. 5A) o składzie odpowiadającym fazie organicznej, tj. charakteryzującym się wysoką zawartością węgla i azotu (TABELA 1, P1). W tkance otaczającej wszczep nie zaobserwowano obecności niklu, co jest istotne ze względu na jego drażniące działanie. Tym samym analiza w punkcie 1 potwierdza, że nikiel nie uwalnia się ze stali implantacyjnej 316L do tkanki.

Materiały, z których wykonuje się wyroby medyczne i implanty klasy medycznej muszą spełniać najwyższe standardy jakości. Implanty metalowe wykonane ze stali nierdzewnej są szczególnie narażone na proces korozji. Procesy elektrochemiczne i mechaniczne (na przykład korozja naprężeniowa, zmęczeniowa i korozja cierna) mogą powodować przedwczesne zużycie i przyspieszone uwalnianie cząstek metalu i jonów do tkanek. Kliniczne znaczenie degradacji implantów metalowych uwidacznia się w korozji i produktach zużycia występujących w tkance otaczającej implant, co może ostatecznie doprowadzić do kaskady zdarzeń prowadzących do ubytku masy kostnej wokół implantu [13]. Szczegółowe badanie mikrostruktury za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej i spektroskopii dyspersyjnej energii - analiza SEM-EDS zapewnia, że skład chemiczny implantów metalicznych, proces obróbki cieplnej i/lub czystość spełniają wymagania dotyczące produktów oraz rygorystyczne standardy bezpieczeństwa. Ponadto analiza SEM-EDS pozwala na obserwację, czy powierzchnia implantu jest pokryta warstwą tlenków, które powstały w wyniku do korozji i świadczą o uszkodzeniach implantu. Charakter powstawania pasywnej warstwy tlenków i właściwości mechaniczne materiałów stanowią jedno z podstawowych kryteriów wyboru alternatywnych lub opracowania nowych materiałów. Mikrostruktura implantu ma również istotny wpływ na proliferację i różnicowanie komórek. Strukturyzacja powierzchni prowadzi do szybszej, zoptymalizowanej osteointegracji i zapewnia uzyskanie wyższych wskaźników sukcesu zaimplantowanych wszczepów [14].

Ze względu na to, że korozja jest jednym z głównych problemów powodujących uszkodzenia implantów, autorzy zalecają badanie powierzchni wszczepów przy użyciu techniki SEM-EDS jako prostej i szybkiej metody obserwacji mikrostruktury i analizy składu chemicznego.

## SEM observation

FIG. 3 shows the elements mapping distribution measured for the sterile Kirschner wire and for the wire removed after one month of the surgery. The main elements visible in the mapping correspond to the chemical composition of stainless steel, whereas for the wire analyzed after one month we observe a web on the implant surface. The analysis shows additionally the presence of carbon and sodium which come from the tissue.

FIG. 4 shows the microstructure of the wires just after removing them from the limb. The examined surface is smooth, with no signs of corrosion – FIG. 5B. There are no defects, such as cracks or porosity presence on the investigated surface, which may have influenced the corrosion process. The EDS analysis (TABLE 1, P2) confirmed the chemical composition of the examined wires – corresponding to 316L steel. The elements content is similar to the typical composition of the implant steel, except for the presence of high carbon content. Its increased content probably results from the presence of a small amount of tissue over the entire surface of the implant. In the EDS analysis some tissue remnants are observed (P1 – FIG. 5A) and the composition corresponding to the organic matter (TABLE 1, P1) - high carbon and nitrogen content. Nickel was not present in the tissue, which is important due to the irritant properties of this element. Thus, the analysis in point 1 confirms that nickel was not released from the implant into the tissue.

Medical grade materials, devices and implants must meet the highest quality standards. Metallic implants made of stainless steel are especially subjected to corrosion processes. Electrochemical and mechanical processes (for example stress corrosion cracking, corrosion fatigue and fretting corrosion) may interact, causing a premature structural failure and an accelerated release of metal particles and ions. The clinical importance of degradation of metal implants is evidenced by particulate corrosion and wear products in the tissue surrounding the implant, which may ultimately result in a cascade of events leading to periprosthetic bone loss [13]. The detailed microstructure testing using Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive Spectroscopy – SEM/EDS analysis ensures the composition of the metallic medical devices, the heat treat process, the cleanliness of the product requirements and the stringent regulatory and safety industry standards. Moreover, SEM-EDS analysis reveals if the implant surface is covered with passive oxide films, which leads to the implant failure. The nature of the passive oxide films and the mechanical properties of the materials are the basis for selecting a proper alternative or might serve as the background for further development of new materials. The microstructure of the implant has also a major influence on cells proliferation and differentiation. The surface structuring leads to faster optimized osseointegration and facilitating higher success rates and/or earlier loading of the inserted implants [14].

Due to the fact that corrosion is one of the major issues resulting in the failure of biomedical implant devices, authors recommend to investigate the implant's surface using SEM-EDS technique as a simple and fast method of microstructure observation and analysis of chemical composition.



## Wnioski

Po 4 tygodniach od implantacji drutów Kirschnera kończyna kota wykazywała prawidłową ruchomość. Nie zaobserwowano nasilonego stanu zapalnego. Leczenie operacyjne przy zastosowaniu zaproponowanej techniki stabilizacji złamania małych kości łokcia za pomocą drutów Kirschnera to jedna z najbardziej skutecznych technik leczenia złamań szczególnie u młodych zwierząt. Nie zaobserwowano powikłań, takich jak stres, infekcja, lub podrażnienie tkanek miękkich.

Jednoczesne wykorzystanie skaningowej mikroskopii elektronowej i spektroskopii dyspersji energii promieniowania X dostarcza informacji w zakresie analizy implantów metalicznych pod względem obserwacji śladów korozji. Obydwie techniki umożliwiają śledzenie zmian w składzie chemicznym implantów ewentualnie zachodzących podczas degradacji bądź korozji.

Niniejsza praca opisuje tylko jeden przypadek stabilizacji złamania przy zastosowaniu drutów Kirschnera i pokazuje możliwość obrazowania i analizy nie tylko samego złamania, ale także zachowania się implantów *ex vivo*. Kolejnym krokiem badawczym będzie przeprowadzenie obserwacji na większej grupie pacjentów i przeanalizowanie wyników uwzględniając różne czasy implantacji.

## Podziękowania

*Publikacja pracy jest finansowana w ramach badań statutowych nr 11.11.160.617.*

## Conclusions

After 4 weeks from stabilization the limb showed proper functionality. The surgical procedure using the Kirschner wires is one of the most effective techniques to treat broken ulna, especially in the case of young animals. There were no complications observed, such as stress, infection, or soft-tissue irritation. No inflammation was noticed either.

The combination of scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy is a useful method to investigate the corrosion phenomena on the extracted metallic implants. Both techniques are effective in tracking changes in the chemical composition during degradation or corrosion of the implants.

This paper describes only one case of the Kirschner wires stabilization and shows the possibility of imaging and analysis not only of the fracture but also of the *ex vivo* implants assessment. The next step of the study will be the observation of a large group of patients and the implant analysis after various implantation times.

## Acknowledgments

*This work was supported by the Statutory research, No 11.11.160.617.*

## Piśmiennictwo

- [1] A.R. Coughlan, A. Miller: BSAVA Manual of Small Animal Fracture Repair and Management, Wiley, 6 mar 1998 – 332.
- [2] W.O. Brinker: The use of intramedullary pins in small animal fractures. *North Am Vet* 29 (1948) 292-297.
- [3] E.A. Ehmer: Bone pinning in fractures of small animals. *J Am Vet Med Assoc* 110 (1947) 14-19.
- [4] R.L. Rudy: Principles of intramedullary pinning. *Vet Clin North Am* 5 (1975) 209-228.
- [5] U. Matis: Current Techniques of Fracture Fixation in Dogs and Cats, World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, 2007
- [6] G.D. Pettit: Kirschner fixation splint. *Kirschner Catalogue* (1980) 80-81.
- [7] Ch.D. Newton, D.M. Nunamaker: Small animal orthopaedics. *Methods of internal fixation*, Chapter 16, (1985)
- [8] J. L. Milton, R. D.Horne, G. M. Goldstein: Cross-pinning: a simple technique for treatment of certain metaphyseal and physeal fractures of the long bones. *Journal of the American Animal Hospital Association* 16 (1980) 891-906.

## References

- [9] G. Schwarz: Fractures of the proximal tibia, *AO principles of fracture management in the dog and cat*, Time, NY, 2005, A0 Publishing.
- [10] D.C. Hansen: Metal Corrosion in the Human Body: The Ultimate Bio-Corrosion Scenario. *The Electrochemical Society Interface* (2008) 31-34.
- [11] R.B. Salter, R.W. Harris: Injuries involving the epiphyseal plate. *J Bone Joint Surg Am* 45 (1963) 587-622.
- [12] V. Brioschi, S. J. Langley-Hobbs, S. Kerwin, R. Meeson, H. Radke: Combined physeal fractures of the distal radius and ulna: complications associated with K-wire 1 fixation and long-term prognosis in six cats. *J Feline Med Surg.* 19(8) (2017) 907-914.
- [13] J. J. Jacobs, J. L. Gilbert, R. M. Urban: Current Concepts Review Corrosion of Metal Orthopaedic Implants. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 17 (2011) 268-282.
- [14] D. Duddeck, J. Neugebauer: Surface analysis of sterile-packaged implants. *Clinical Science* (2015) 54-63.



.....

**STUDIA PODYPLOMOWE**  
**Biomateriały – Materiały dla Medycyny**  
**2017/2018**

<p><b>Organizator:</b> Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów</p> <p><b>Kierownik:</b> prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła <b>Sekretarz:</b> dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz</p>	<p><b>Adres:</b> 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208, 210 lub 501 tel. 12 617 44 48, 12 617 23 38, fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl</p> <p><a href="http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny/">http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/ studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny/</a></p>
<p><b>Charakterystyka:</b> Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Słuchacze zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Słuchacze zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami w zakresie nowoczesnych nośników leków, medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.</p>	
<p><b>Sylwetka absolwenta:</b> Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.</p>	
<p><b>Zasady naboru:</b> Termin zgłoszeń: od 20.09.2017 do 20.10.2017 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Osoby przyjmujące zgłoszenia: prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (pawilon A3, p. 208, tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (pawilon A3, p. 210, tel. 12 617 23 38, e-mail: krok@agh.edu.pl)</p>	
<p><b>Czas trwania:</b> 2 semestry (od XI 2017 r. do VI 2018 r.) 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu</p>	<p><b>Opłaty:</b> 2 600 zł</p>

