

# 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 119**

Numer 119

**Volume XVI**

Rok XVI

**APRIL 2013**

KWIECIEŃ 2013

**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

Górnictwo-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

**Issue: 250 copies**

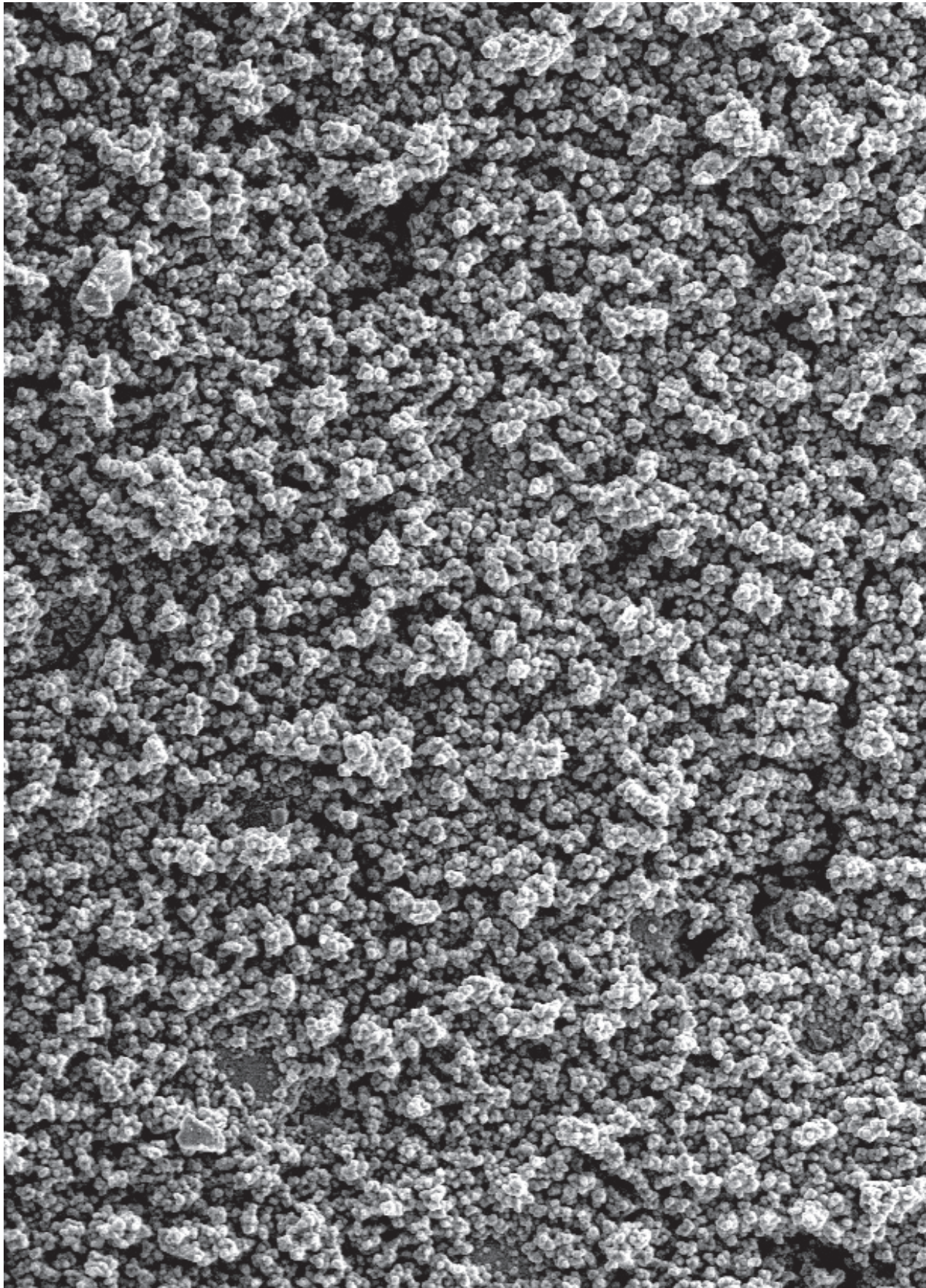
Nakład: 250 egz.

**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 - WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 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 - BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Andrzej Górecki - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Wojciech Maria Kuś - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Małgorzata Lewandowska-Szumieł - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Jan Marciniak - SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Roman Pampuch - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, 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 Tsiapas - 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 • 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

## 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

*XXIII Conference on  
BIOMATERIALS  
IN MEDICINE  
AND  
VETERINARY  
MEDICINE*

*10-13 October 2013  
Hotel "Perła Południa"  
Rytro, Poland*

**[www.biomat.agh.edu.pl](http://www.biomat.agh.edu.pl)**





## SPIS TREŚCI

TISSUE ENGINEERING OF BONE: THE ROLE OF OSTEOBLASTS IN OSTEOGENESIS AND PERI-IMPLANT BONE HEALING EDYTA WRÓBEL, MAŁGORZATA WITKOWSKA-ZIMNY	2
PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF DRUG DELIVERY CARRIERS FOR LOCAL ADMINISTRATION OF SODIUM ALENDRONATE URSZULA POSADOWSKA, ANA MOREIRA, RITA MARTINS, ELZBIETA PAMULA	8
OCENA WPŁYWU DRGAŃ MECHANICZNYCH ORAZ BOGATOPŁYTKOWEGO OSOCZA NA GOJENIE TRZONÓW KOŚCI PISZCZELOWYCH LECZONYCH ELASTYCZNYM STABILIZATOREM WĘGLOWYM „CARBOELASTOFIX” MACIEJ AMBROZIAK, ANDRZEJ GÓRECKI, MACIEJ LUTEREK, PIOTR KRAKOWIAN, TOMASZ LEKSZYCKI, IGOR BISSENIK, ŁUKASZ KOPERSKI, JAN CHŁOPEK, PAWEŁ SKOWRONEK	13
BADANIA BIOAKTYWNOŚCI I CYTOTOKSYCZNOŚCI IN VITRO BIOSZKIEŁ Z UKŁADU SiO <sub>2</sub> -CaO WYTWORZONYCH METODĄ ZOL-ŻEL Z ZASTOSOWANIEM SILANÓW LIDIA CIOŁEK, JOANNA KARAŚ, ANDRZEJ OLSZYNA, EWA ZACZYŃSKA, ANNA CZARNY, BOGUSŁAWA ŻYWICKA	21
WPŁYW RÓŻNEJ NANOTOPOGRAFII WARSTW AZOTOWANYCH NA ADHEZJĘ PŁYTEK KRWI AGNIESZKA SOWIŃSKA, MICHAŁ TARNOWSKI, WITOLD JAKUBOWSKI, JUSTYNA OLEKSIK, TADEUSZ WIERZCHOŃ, ELŻBIETA CZARNOWSKA	27
POWIERZCHNIA IMPLANTU TYTANOWEGO PIASKOWANEGO HYDROKSYAPATYTEM JEREMIASZ KRZYSZTOF KOPER, RADOMIR MAJCHROWSKI, JAROSŁAW JAKUBOWICZ	33
SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI WARSTW WĘGLOAZOTKU KRZEMU NA POLIETEROETEROKETONIE ANNA MAŁEK, JADWIGA KONEFAŁ-GÓRAL, STANISŁAWA KLUSKA, KATARZYNA TKACZ-ŚMIECH, STANISŁAWA JONAS, TADEUSZ WIERZCHOŃ	40
BADANIA WŁASNOŚCI MECHANICZNYCH KOŚCI WOŁOWYCH I WIEPRZOWYCH ANITA KAJZER, WOJCIECH KAJZER, MARCIN BASIAGA, ELŻBIETA KUNA	45

## CONTENTS

TISSUE ENGINEERING OF BONE: THE ROLE OF OSTEOBLASTS IN OSTEOGENESIS AND PERI-IMPLANT BONE HEALING EDYTA WRÓBEL, MAŁGORZATA WITKOWSKA-ZIMNY	2
PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF DRUG DELIVERY CARRIERS FOR LOCAL ADMINISTRATION OF SODIUM ALENDRONATE URSZULA POSADOWSKA, ANA MOREIRA, RITA MARTINS, ELZBIETA PAMULA	8
ASSESSMENT OF THE EFFECT OF MECHANICAL VIBRATIONS AND PLATELET-RICH PLASMA ON THE HEALING OF TIBIAL STEMS TREATED WITH THE ELASTIC CARBON STABILIZER „CARBOELASTOFIX” MACIEJ AMBROZIAK, ANDRZEJ GÓRECKI, MACIEJ LUTEREK, PIOTR KRAKOWIAN, TOMASZ LEKSZYCKI, IGOR BISSENIK, ŁUKASZ KOPERSKI, JAN CHŁOPEK, PAWEŁ SKOWRONEK	13
STUDY ON BIOACTIVITY AND IN VITRO CYTOTOXICITY OF BIOGLASSES FROM THE SiO <sub>2</sub> -CaO SYSTEM OBTAINED BY THE SOL-GEL METHOD USING SILANES LIDIA CIOŁEK, JOANNA KARAŚ, ANDRZEJ OLSZYNA, EWA ZACZYŃSKA, ANNA CZARNY, BOGUSŁAWA ŻYWICKA	21
EFFECT OF NITRIDED SURFACE LAYERS WITH DIFFERENT NANOTOPOGRAPHY ON PLATELETS ADHESION AGNIESZKA SOWIŃSKA, MICHAŁ TARNOWSKI, WITOLD JAKUBOWSKI, JUSTYNA OLEKSIK, TADEUSZ WIERZCHOŃ, ELŻBIETA CZARNOWSKA	27
TITANIUM IMPLANT SURFACE AFTER HYDROXYAPATITE SANDBLASTING JEREMIASZ KRZYSZTOF KOPER, RADOMIR MAJCHROWSKI, JAROSŁAW JAKUBOWICZ	33
SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SILICON CARBONITRIDE LAYERS ON POLYETHERETHERKETONE ANNA MAŁEK, JADWIGA KONEFAŁ-GÓRAL, STANISŁAWA KLUSKA, KATARZYNA TKACZ-ŚMIECH, STANISŁAWA JONAS, TADEUSZ WIERZCHOŃ	40
STUDY OF THE MECHANICAL PROPERTIES OF OX AND PIG BONES ANITA KAJZER, WOJCIECH KAJZER, MARCIN BASIAGA, ELŻBIETA KUNA	45

WERSJA PAPIEROWA CZASOPISMA „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW” JEST JEGO WERSJĄ PIERWOTNĄ  
 PRINTED VERSION OF „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW” IS A PRIMARY VERSION OF THE JOURNAL

# TISSUE ENGINEERING OF BONE: THE ROLE OF OSTEOBLASTS IN OSTEOGENESIS AND PERI- IMPLANT BONE HEALING

EDYTA WRÓBEL\*, MAŁGORZATA WITKOWSKA-ZIMNY

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,  
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW, POLAND  
\* E-MAIL: EDYTA.WROBEL@WUM.EDU.PL

## Abstract

*Osteoblasts are cells of mesenchymal origin, which rebuild resorbed bone by synthesizing bone matrix proteins and by inducing bone matrix mineralization. Osteoblasts play a crucial role in creating and maintenance of healthy bone architecture, bone repair, and peri-implant bone healing (osseointegration). These bone-forming cells are also involved in regulation of osteoclasts function, and hence bone resorption in osteoclastogenesis process. We have presented our own studies on the subsequent stages of differentiation of Human Bone-Derived Cells (HBDCs) that could be a good candidate as an autogenous source for reconstruction and rebuilding of own patient's bone using tissue engineering methods. In this review we discussed the biology of osteoblasts, compared with the HBDCs cultures, under the influence of growth factors (FGF-2, TGF- $\beta$ , IGF, PDGF) and hormones (PTH, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, leptin). Our review is also focused on the participation of intercellular adhesion proteins (cadherins, claudins, connexin, 'OsteoMacs'), transcription factors (Cbfa1, Msx-2, Osx, ATF4), and others molecules (RANKL, OPG, BMP2, lactoferrin, PPAR $\gamma$ ) in modulating osteoblasts functions on the basis of current reports, throwing new light on the involvement of osteoblasts during osteogenesis and peri-implant bone healing.*

**Keywords:** bone tissue engineering, osteoblasts, Human Bone-Derived Cells, peri-implant bone healing, osteogenesis, cell culture

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 2-7]

## Introduction

Well vascularized mineralized bone tissue is a major reservoir of calcium ions and serves also as a source of different bone cell types such as osteoprogenitors cells, endothelial cells, periosteum, and bone marrow cells. The particular architecture of bone, its function and metabolism are effects of two opposite processes, i.e. bone formation and bone resorption. Hence bone is a dynamic, highly specialized tissue that undergoes continuous remodeling. This tissue is composed from mineralized extracellular matrix, and three major cell types, i.e. osteoblasts (bone-forming cells), osteoclasts (bone-resorbing cells), and osteocytes (mature osteoblasts entrapped within lacunae), which all are essential for its structural, mechanical and metabolic functions.

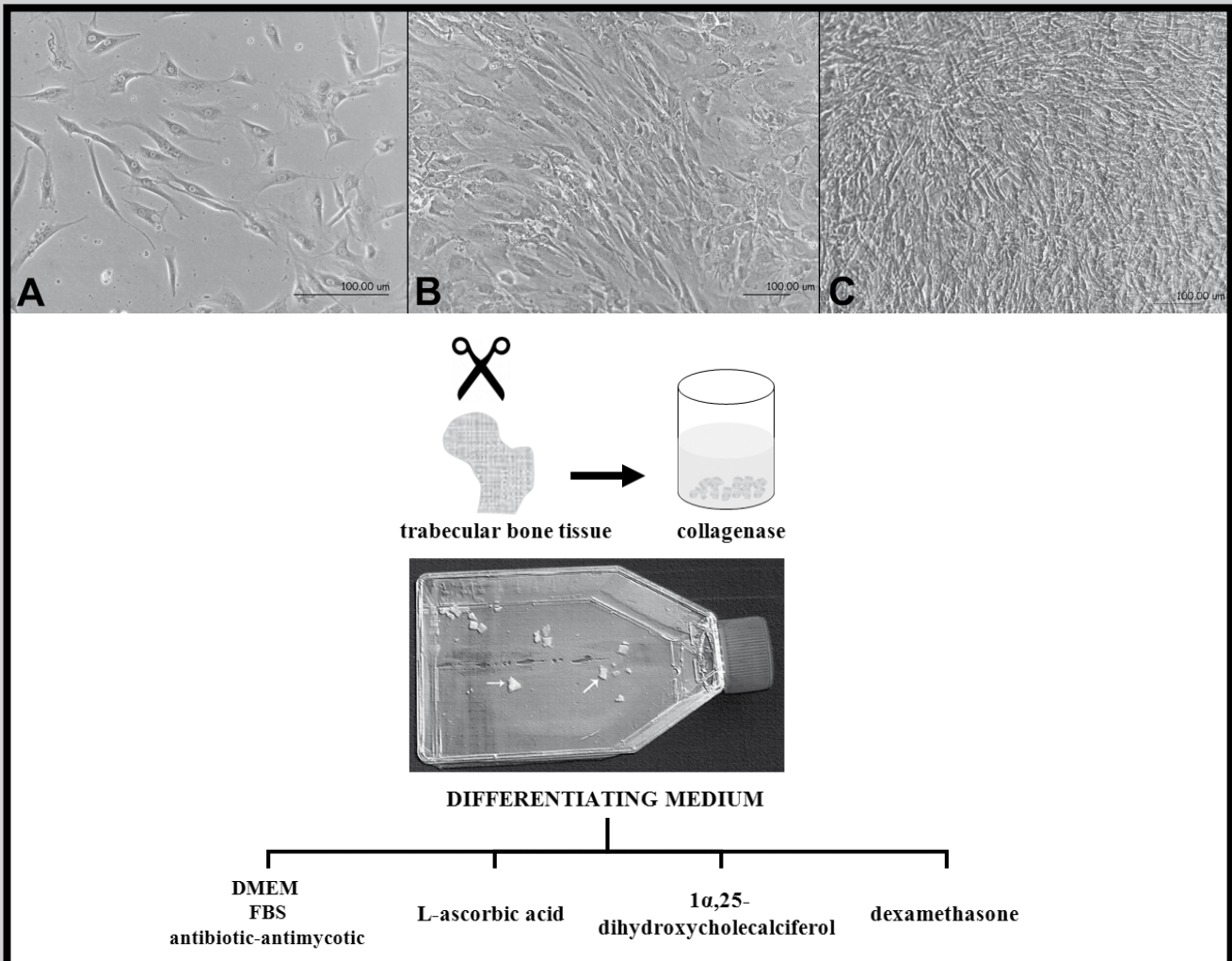
The structural and metabolic activity of bone is compromised by an imbalance between the formation and the rate of bone resorption, which depend on osteoblasts and osteoclasts, respectively. Therefore, bone mass and homeostasis are controlled by continuous remodeling throughout life. Dysregulation of the process can lead to a variety of defects and bone diseases [1,2].

The osteoblasts are the fundamental cells controlling extracellular matrix (ECM) production and mineralization, as well as receiving and processing mechanical and chemical signals to bone, and most likely also directing osteoclast function [3]. These bone-forming cells are indispensable for bone development, growth, repair, and maintenance of healthy skeletal architecture. This is achieved by the existence of network of interactions between cells and a wide variety of factors or mediators, including intercellular communication with other bone cell types [4]. Active osteoblasts synthesize the extracellular matrix proteins, mainly type I collagen (Col I). Simultaneously, the expression of bone-specific alkaline phosphatase (ALP) increases. With ongoing differentiation cells start to produce a numerous of non-collagenous proteins such as bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OP), osteonectin (ON), and osteocalcin (OC). Finally, mineralization of ECM indicates mature osteoblasts [5]. ECM proteins serve also as organic components during osteogenesis in vitro, and are necessary in the course of bone healing after injury. During the osteogenic induction primary human osteoblasts also express collagen and ALP, which is defined as the early marker of osteogenic differentiation in vitro. In the last phase of HBDCs in vitro differentiation, the cells secrete osteocalcin, the late marker of mature osteoblasts. These parameters are routinely used to monitor the phenotype of osteogenic cells during their differentiation in culture because these cells have the potential osteogenic activity and seems to be the best autogenous source for implantation and reconstruction of own patient's bone. Moreover, a dynamic cell seeding in bioreactor and cell culture conditions maintain the proliferative potential and also osteogenic phenotype of HBDCs cultured on the selected three-dimensional polyurethane scaffold [6].

In distance osteogenesis new bone tissue is formed on the surfaces of the existing bone in the peri-implant site. The bone surfaces provide a population of osteogenic cells, which lay down a new matrix encroaching on the implant. An essential observation is that new bone is not formed on the implant, but the latter does become surrounded by the bone. Success in maintaining of dental implant depends largely on the progress of osseointegration. In histology this process is defined as a direct anchorage of an implant by the formation of bone tissue around the implant, without the growth of fibrous tissue at the bone-implant interface [7]. The processes of activation, differentiation, and maturation of osteoblasts lead to the new bone formation and are of particular importance in the phenomenon of peri-implant bone healing. Components accelerating post-implantation healing process also include growth factors and hormones.

In this review, we discussed the biology of osteoblasts, with their role in the regular course of osteogenesis and in the regulation of bone resorption in osteoclastogenesis process, as well as in peri-implant bone healing. Moreover, this report presents the current state of knowledge in the terms of intercellular communication of osteoblasts, with an indication of adhesion molecules and various factors, which promote the process of new bone formation in vivo, and also in in vitro model.





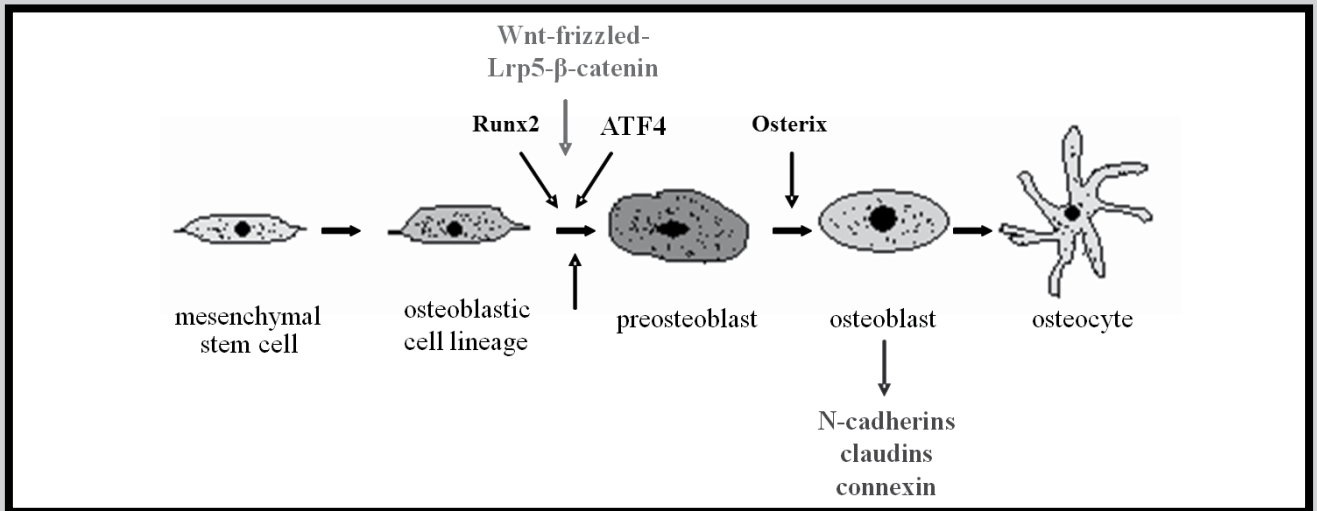
**FIG. 1. Morphological changes of primary human osteoblasts during their in vitro differentiation. (A). Adherent osteoblasts – 1st day after cells seeding. (B). Proliferating osteoblasts – 14th day of culture. (C). Differentiated, mature osteoblasts – 28th day of culture.**

Human osteoblasts were isolated from the trabecular bone tissue chips, which were harvested from the bottom distal part of the long tight bone during the standard procedure of the knee joint alloplasty. Cells harvested from donor were cultured in DMEM enriched with 10% of heat-inactivated FBS, antibiotic-antimycotic, and L-glutamine. 100 mM L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 nM dexamethasone, and 100 nM 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol were used to induce the differentiation of human osteoblasts in vitro. Such culture medium conditions favored also the development of the osteoblasts phenotype. All procedures were performed according to the requirements of the 2nd Local Ethical Committee at the Medical University of Warsaw. The cell culture was observed and analyzed using inverted, phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TE2000-u) throughout the experimental period. Morphology of Human-Bone-Derived Cells (HBDCs) changed from a fibroblastic (A) to a cuboidal one (B), and then the cells formed multiple layers (C). Scale bar, 100  $\mu$ m.

## The role of osteoblasts in bone formation

Osteoblasts arise from multipotential mesenchymal stem cells (as well as muscle, adipocytes, chondroblasts, fibroblasts) and under the influence of the appropriate transcription factors, growth factors, and hormones differentiate to preosteoblasts, and then to mature osteoblasts. Molecules mentioned above modulate the proliferation, differentiation, and migration of progenitor cells. In vitro phenotypic osteoblasts heterogeneity is associated with the progress of cell differentiation. In our studies we indicated that the expression of Col I, ALP, and OC demonstrated differed at mRNA level during differentiation of Human-Bone-Derived Cells (HBDCs). We also showed that these factors are fundamental for the developmental expression of the osteoblasts phenotype and formation of the mineralized matrix.

During in vitro HBDCs differentiation three distinct stages were identified (adhesion phase – 24 h after cell seeding; proliferation phase – from day 7 until day 14 of cell culture; maturation and mineralization phase – between 21 and 28 day of cell culture). Each period exhibits unique, stage-specific responsiveness to steroid hormones and growth factors that establish of the primary human osteoblasts phenotype. The process of in vitro differentiation of osteogenic cells is induced by the presence of osteogenic supplements in culture medium, such as dexamethasone, L-ascorbic acid-2-phosphate and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol (active hormonal form of vitamin D<sub>3</sub>). Morphology of primary human osteoblasts during their in vitro differentiation, in the differentiated osteoblasts was analyzed in our laboratory and showed in representative images (FIG. 1). Their differentiated phenotype was verified by demonstrating the induction of osteoblasts-specific indicators, as described above.



**FIG. 2. Osteoblast differentiation pathway involving the major transcription factors and secreted molecules.**

Osteoprecursors are found among bone marrow hematopoietic cells. Osteoblasts are usually located on the surface of trabeculae and Haversian canal. When they are active, large Golgi apparatus and abundant rough endoplasmic reticulum are visible, making osteoblasts similar to epithelial cells with a large spherical nucleus and basophilic cytoplasm. These osteoblasts form tight junctions with adjacent osteoblasts and have regions of the plasma membrane specialized in vesicular trafficking and secretion. Ultimately, some osteoblasts become trapped in their own bone matrix giving rise to osteocytes, which gradually stop secreting osteoid [8]. Osteoblasts exhibit also expression of some characteristic genetic markers (Osterix – *Osx*, *Cbfa1* – core-binding factor  $\alpha 1$ , also known as *Runx2*) [5,9]. Transcription factors such as *Cbfa1*, *Osx*, and *ATF4* (activating transcription factor 4) have been identified as the controllers of the osteoblastic lineage [10]. In the absence of *Cbfa1* and *Osx* no osteoblasts are formed. Formation and proliferation of preosteoblasts requires signaling through the Wnt-frizzled-Lrp5- $\beta$ -catenin signaling pathway (FIG. 2). Deficiencies of *Lrp5* (low density lipoprotein receptor 5-related protein) lead to the development of osteoporosis in both mice and humans. The function of mature osteoblasts, including the ability to synthesize ECM proteins requires *Lrp5* as well as *ATF4* signaling protein [11]. Osteoblasts also play essential role in the regulation of bone resorption through receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand – RANKL, which links to its receptor (RANK) on the surface of preosteoclast, inducing their differentiation and fusion. In addition, osteoblasts secrete a soluble decoy receptor OPG, which blocks RANK/RANKL interaction by binding to RANKL, and thus prevents osteoclasts differentiation and activation. Therefore, the equilibrium between RANKL and OPG determines the regulation of osteoclastogenesis [8,12]. Lamghari et al. suggested that leptin modulates positively OPG/RANKL balance by inhibiting the expression of RANKL gene [13].

On the other hand, the cellular communication between osteoblasts, osteocytes, and pre-osteoclasts is essential for bone formation as well as for osteoclastogenesis. Osteoblasts induce migration and differentiation of pre-osteoclasts into mature osteoclasts, what initiate bone resorption. After completion of bone resorption, apoptosis of mature osteoclasts and differentiation of osteoblasts are initiated. At this time the osteoblasts do not support osteoclasts differentiation, but promote bone formation. Finally, osteoblasts differentiate into osteocytes in bone or into bone lining cells on the bone surfaces. Direct cell-cell communication occurs between osteocytes and osteoblasts

via gap junction channels formed by connexin molecules. In this case osteoblasts may sense osteocyte cell death via gap junctional intercellular communication (GJIC) [14]. Osteoblasts express also adhesion molecules: e.g., cadherins [15,16], claudins [17], connexin [18], and are thought to be polarized cells [19]. Notably, the cell adhesion N-cadherin is an important regulator of chondrogenesis and osteogenesis. The molecular mechanism by which N-cadherin can promote osteoblasts differentiation is by increasing cell-cell adhesion, what results in the activation of gene expression in osteoblasts. Cadherins trigger intercellular signals by interacting with Wnt signaling pathway and with the participation of  $\beta$ -catenin molecules. Recent data provide a new mechanism, where N-cadherin controls the function of osteoblasts. N-cadherin was found to interact with Wnt-co-receptors *Lrp5* or *Lrp6* in osteoblasts in vitro and in vivo. These findings suggest that N-cadherin is a novel *Lrp5* antagonist which negatively regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in osteoblasts. This concept is highly relevant to the regulation of osteoblastogenesis since both N-cadherin and *Lrp5* are strongly expressed in osteoblasts, and Wnt signaling is a major modulator of osteoblasts function and bone mass [15]. It has been also recently reported that the resident tissue macrophages termed OsteoMacs or cell cycle arrested quiescent osteoclast precursors (QuOPs) are present on osteoblasts. OsteoMacs are an integral component of bone tissues and play a novel role in bone homeostasis through regulating osteoblasts function. These observations implicate OsteoMacs, in addition to osteoclasts and osteoblasts, as principal participants in bone dynamics [20]. However, it is unclear whether OsteoMacs differentiate into osteoclasts or not. The QuOPs may be identical to OsteoMacs, in terms of their localization. These resident osteoclast precursors are one of the sources of osteoclasts, in addition to bone marrow-derived osteoclast precursors [14].

Bone formation, growth, repair, and remodeling, are continuous processes throughout human life. There are three commonly known main mechanisms of bone formation such as intramembranous, endochondral, and appositional. Intramembranous bone is formed by the condensation of mesenchymal cells, what induces the expression of cartilage phenotype [21]. Undifferentiated mesenchymal cells differentiate into osteoblasts. The bone is formed directly within the condensed membranes, made of highly vascularized primitive mesenchyme. At the points of ossification, undifferentiated mesenchymal cells aggregate into membranous layers and differentiate into osteoprogenitor cells.



These cells proliferate within the capillary network and form osteoblasts in contact with primitive bone matrix. They start to produce protein matrix components, which in turn leads to the mineralization, and new bone formation. This is observed in embryonic flat bone formation, bone formation during distraction osteogenesis, and blastema bone in young children after amputations [4]. Endochondral bone is also formed by condensation of mesenchymal cells, but in this case cartilage creates a temporary model of the future bone, a process that induces expression of cartilage phenotype. The cartilage undergoes calcification, and is gradually replaced by bone tissue accumulated on the surface of calcified cartilage matrix compartments. In this way, the primary trabeculae of cartilaginous-bone are formed and covered with osteoprogenitor cells (osteoblasts). These primary trabeculae are removed by the osteoclasts, which penetrate a primary point of ossification, together with vascular buds, mesenchymal cells (the progenitors for bone marrow), and osteoblastic cells. Osteoclasts destroy primary trabeculae, while osteoblasts replace it with secondary trabecular bone, already devoid of cartilage components [21]. Osteoclastic resorption is followed by differentiated osteoblasts producing layer of peripheral bone or periosteal collar and osteoid. Next, it becomes mineralized and extends along the shaft, becoming confluent, and forming a continuous bone lining [4]. The process of appositional ossification observed during long bones formation unfolds within connective tissue. However, after birth trauma-induced activation of periosteal membrane leads to the formation of callus showing the signs of both types of ossification, i.e. endochondral and intramembranous. Appositional ossification involves formation of a new bone by aligned osteoblasts on the surfaces of existing bone, and is observed in periosteal bone enlargement, and general bone formation phases of remodeling [4]. The process of peri-implant bone healing is analogous to intramembranous healing at the fracture site. The early phase of healing proceeds from hematoma formation to woven bone formation, and finally results in bone remodeling [22].

## Osteoblasts function in bone healing

Calcification of the hematoma is the first stage of tissue regeneration during peri-implant bone healing. The bone is formed by repetitive revascularization and mineralization. These phenomena occur due to the existence of intercellular communication between different types of bone cells and influence of numerous growth factors, hormones, or mechanical factors.

The success of implant therapy largely depends on the implant osseointegration. Clinically, it is confirmed by the lack of mobility of the implant and the absence of inflammation symptoms. Osseointegration is a direct structural and functional connection between the surfaces of living bone and implant [23]. The mechanisms underlying the process of osseointegration are very similar to those that involved in the repair of fractured bone, and comprise a cascade of cellular and extracellular events. Tissue response to the implant as a foreign body gradually achieves biological stability (osseointegration) in the bone implant system, and results in the formation of new bone tissue on the surface of the implant [24]. Bone healing after injury, which was induced as a result of surgical preparation of the implant bed, consists of several successive phases. The first stage is acute inflammatory reaction, which is the response of the immune system to surgery-related trauma. The factors that activate the healing process include histamine, prostaglandins, bradykinin, leukotrienes, proteins involved in coagulation, cytokines including IL-1, IL-4, IL-8 (interleukin -1, -4, -8),

tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), growth factors such as BMPs, transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), FGF-2, and insulin-like growth factor II (IGF-II). BMPs have osteoinductive properties, which stimulate the undifferentiated stem cells to differentiate toward osteoblasts that are responsible for bone formation. Approximately 2-3 days after implantation the hematoma is formed, and formation of vascularized granulation tissue is started. Undifferentiated osteoprogenitor cells migrate and locate in the network of matrix proteins (type I, V, XIII, XVI collagens and BMPs), and next already differentiated osteoblasts secrete the proteins, which form bone matrix – osteoid. Initially, the bone matrix consists of collagen fibers, but gradually it becomes mineralized [25]. Osteoblast-like cells adhere more readily to rough surfaces. Moreover, rough surfaces induce mature osteoblasts phenotype of these cells with regards to morphology, extracellular matrix secretion, alkaline phosphatase activity, osteocalcin production, and response to systemic hormones such as, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Observations made by Boyan et al., suggest that the roughness-dependent regulation of osteoblasts proliferation, differentiation and local factor production is related to substrate-mediated activation of integrin receptors, thus regulating protein kinase C (PKC) and A (PKA) through phospholipase C (PLC) and A2 (PLA2) pathways [26]. When osteogenesis is completed, the bone remodeling usually begins. High cellular activity at the bone-implant interface initiates the formation of bone trabeculae, which are aligned with the fibers of non-collagenous proteins. In consequence, this leads to the formation of mature bone tissue [27].

## Molecules that modulate osteoblast behavior

Locally, bone remodeling is initiated by mechanical stimuli such as fracture, inflammation, and graft implantation. The process of bone remodeling is maintained by the balance between osteoblasts involved in the formation and reconstruction of bone tissue and osteoclasts, which are responsible for degradation and bone resorption [24]. Therefore, the remodeling bone cycle is strictly controlled by systemic hormones as well as local cellular pathways involved in the interaction between osteoblasts and osteoclasts, such as cytokines, growth factors, and intercellular adhesion molecules [13,14,28,29]. Osteoblasts express hormone receptors such as parathyroid hormone (PTH), 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, glucocorticoids, prostaglandins, and estrogens [4]. Stimulation of bone formation in endocortical surfaces is the hallmark of the anabolic effect of PTH, irrespectively of the studied species or experimental model. PTH stimulates osteoblasts to secrete ALP, Col I, OC, and BSP. Intermittent administration of PTH may promote osteoblastogenesis through the recently identified mechanism that involves down-regulation of transcription factor PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ ) expression [30]. The second crucial hormone for skeletal development and maintenance is 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, which is involved in the regulation of calcium and phosphorus metabolism and inhibits PTH synthesis. There is clear evidence that effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on osteoblasts growth and differentiation are mediated by binding to its nuclear receptor (VDR). This stimulates the synthesis of bone-specific proteins such as ALP and osteocalcin. Moreover, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, administered to mature osteoblasts, may promote their further maturation [31]. To compare, in culture model the primary human osteoblasts respond to the presence of ascorbic acid in culture medium by increasing of the level of Col I and ALP mRNAs expression.

Furthermore,  $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol and dexamethasone (a synthetic glucocorticosteroid) administered during the proliferation stage of HBDCs result in the inhibition of cell proliferation and up-regulating of osteogenic specific marker expression (Col I, ALP, and OC). As a result the rate of the cells differentiation is augmented.

Bone is also under control of adipose tissue, which modulates its metabolism via different adipocytokines, for example leptin. There are two opposing mechanisms, which could explain leptin's effects on regulation of bone metabolism. Firstly, leptin can act locally to promote the development of osteoprogenitor cells and increase bone formation by activation of osteoblasts. Secondly, leptin may work through the central nervous system via activation of  $\beta$ -2 adrenergic receptors, what results in increasing bone resorption and decreasing osteoblasts activity [32].

Bone formation and bone healing processes depend on the impact of various growth factors directly involved in osteoblasts response. The main growth factors that control the bone formation are FGF-2, FGF receptor-2 (FGFR-2), and BMP-2. BMP-2 is a member of TGF superfamily that stimulates osteoblasts differentiation by signal transduction via three BMP receptors (BMPR-IA, -IB and -II). Increasing of expression level of BMPR-IB in osteoblasts was found to be associated with the significant up-regulation of Cbfa1 and ALP transcripts, as well as ALP enzymatic activity [5]. Since recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) became available, many animal studies have been performed examining the induction of bone formation following implantation of rhBMP-2 using of various carriers [33]. Numerous reports from animal studies and cell culture models confirm the special role of FGF-2 and BMP-2, in bone development as well as in proliferation, differentiation, and apoptosis of human osteoblasts [34-36]. The mechanism of action of these compounds is based mainly on the involvement of adhesion molecules (N-cadherin, IL-1) and signaling pathways (via kinases such as Src, PKC) in osteoblasts. Protein kinase C activated by FGF-2 or FGFR-2 causes an increase in N-cadherin expression. As a result of N-cadherin up-regulation, intercellular adhesion is increased and transcription level of specific bone genes formation such as ALP, osteocalcin, and Col I is changed. BMP-2 activates Smad1 signaling pathway, which results in increasing of PKC and Cbfa1/Runx2 expression (critical transcription factor of osteoblastogenesis). In contrast, transcription of another molecules such as caspases 9 and 3 is associated with increased apoptosis of human osteoblasts [37]. Moreover, Spector et al. showed that recombinant human FGF-2 alters osteoblastic expression of BMP-2 and Msx-2 (osteogenic transcription factor) in vitro, to favor the cellular differentiation and osteoinduction. The ERK1/2 intracellular signaling cascade was shown to be necessary for rhFGF-2-mediated BMP-2 transcriptional changes. Furthermore, the cellular production of an intermediate transcriptional modifier was found to be necessary for the rhFGF-2 mediated gene expression changes in BMP-2 and Msx-2 [38]. These findings offer a new insight into the mechanisms, by which FGF-2 modulates osteoblasts behavior. Growth factors are not specific for one type of tissue and they may influence on the several cell types and organs in the body. Due to this fact and the high potency of BMPs (BMP2, BMP7) to form ectopic bone in different tissues, a local and controlled delivery of the growth factor is necessary. To stimulate the healing process in bone the following application methods have been used for local growth factor delivery: (I) in vivo delivery of DNA encoding BMP2, (II) ex vivo gene therapy, (III) various carrier systems for direct protein application which is more frequently used [37].

On the other hand, transcriptome assay experiments revealed that signaling pathways induced by platelet derived growth factor (PDGF), TGF- $\beta$ , and FGF are important for the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into osteogenic cell lineages. Furthermore, PDGF and FGF induce osteoblasts proliferation, whereas IGF and TGF- $\beta$  promote osteoblasts differentiation [39].

The recent study performed by Naot et al., focuses on the mechanisms mediating in the proliferative effects of lactoferrin on osteoblasts. Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein present for example in milk, and serves as an osteoblasts survival factor. Reserach conducted by Naot established that lactoferrin acts as a growth factor and has anabolic activity in bone both in vitro and in vivo. Lactoferrin induces proliferation of primary osteoblasts and osteoblastic cell lines, promotes osteoblasts differentiation in vitro and acts as a survival factor, protecting osteoblasts from apoptosis induced by serum withdrawal. Lactoferrin can also inhibit bone resorption by inhibiting osteoclasts development and activity. Local injection of lactoferrin over hemicalvaria of adult mice leads to a significant increase in bone area as well as bone formation rate and mineral apposition rate [40].

The role of osteoblasts in the regulation of osteogenesis is complex, but still partially unknown. The accurate knowledge of growth factors action for these cells or other a little known signaling molecules involved in the process of osteoblasts maturation, requires a more extensive experimental work. It also seems that the interaction and a balance between the various regulatory factors is extremely important for better understanding the overall role and behavior of human osteoblasts in osteogenesis in vitro.

## Conclusions

Despite the continuing research on the process of formation, maturation, and functioning of osteoblasts, still little is known about their interactions, relationship, and mechanisms, by which transcriptional factors, growth factors, hormones, and others molecules (in particular the adhesion proteins: e.g., N-cadherin, connexin) regulate the processes of osteogenesis and osseointegration. Understanding the mechanisms regulating bone formation in culture conditions, bone healing and its metabolism would open new opportunities for treating bone diseases and give a real insight into its pathomechanism. From the clinical point of view, especially in cases of bone tissue substitution, understanding the biological interactions between the implantation material used in bone regenerative medicine and the activity of the patient cells is very important. It would also allow controlling of bone metabolism in living cells used to regenerate human bone tissue with tissue engineering methods.

Thus, the behavior of osteoblasts as the bone-forming cells in the osteogenesis and osseointegration still needs to be experimentally elucidated. Further examination of the biological mechanisms underlying bone healing, and the role of the osteoblasts will give not only the possibility of clinical utilization of controlled bone regeneration in the future, but also may give a new hope to orthopaedic patients.

## Acknowledgments

*This work was supported in part by research grants: No. N N302157037 from the Polish funds for scientific research in 2009-2012 (for Małgorzata Witkowska-Zimny), and grant No. 3 T08A 001 30 from Polish Ministry of Science and Higher Education (for Edyta Wróbel). Special thanks to Professor Jacek Przybylski for his critical reading and helpful comments.*



## References

- [1] Kassem M., Abdallah B.M., Saeed H.: Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys* 473 (2008) 183-187.
- [2] Raggatt L.J., Partridge N.C.: Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285 (2010) 25103-25108.
- [3] Miron R.J., Hedbom E., Ruggiero S., Bosshardt D.D., Zhang Y., Mauth C., Gemperli A.C., Iizuka T., Buser D., Sculean A.: Premature osteoblast clustering by enamel matrix proteins induces osteoblast differentiation through up-regulation of connexin 43 and N-cadherin. *PLoS One* 6 (2011) e23375.
- [4] Jayakumar P., Di Silvio L.: Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 224 (2010) 1415-1440.
- [5] Singhatanadgit W., Olsen I.: Endogenous BMPR-IB signaling is required for early osteoblast differentiation of human bone cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47 (2011) 251-259.
- [6] Wozniak P., Bil M., Ryszkowska J., Wychowanski P., Wrobel E., Ratajska A., Hoser G., Przybylski J., Kurzydowski K.J., Lewandowska-Szumiel M.: Candidate bone-tissue-engineered product based on human-bone-derived cells and polyurethane scaffold. *Acta Biomater* 6 (2010) 2484-2493.
- [7] Albrektsson T., Johansson C.: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2 (2001) S96-101.
- [8] Caetano-Lopes J., Canhao H., Fonseca J.E.: Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* 32 (2007) 103-110.
- [9] Baek W.Y., Lee M.A., Jung J.W., Kim S.Y., Akiyama H., De Crombrughe B., Kim J.E.: Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res* 24 (2009) 1055-1065.
- [10] Witkowska-Zimny M., Wróbel E., Przybylski J.: The most important transcriptional factors of osteoblastogenesis. *Advances in Cell Biology* 2 (2010) 17-28.
- [11] Krane S.M.: Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. *J Exp Med* 201 (2005) 841-843.
- [12] Fu J., Zhang J., Zhang X., Sun Y.: Upregulated expression of RANKL on bone marrow stromal cells can stimulate osteoclast precursors to mature into functional osteoclasts and promote survival of myeloma cells. *Arch Med Sci* 4 (2008) 233-241.
- [13] Lombardi G., Di Somma C., Vuolo L., Guerra E., Scarano E., Colao A.: Role of IGF-I on PTH effects on bone. *J Endocrinol Invest* 33 (2010) 22-26.
- [14] Nakahama K.: Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cell Mol Life Sci* 67 (2010) 4001-4009.
- [15] Hay E., Laplantine E., Geoffroy V., Frain M., Kohler T., Muller R., Marie P.J.: N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol Cell Biol* 29 (2009) 953-964.
- [16] Kii I., Amizuka N., Shimomura J., Saga Y., Kudo A.: Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage. *J Bone Miner Res* 19 (2004) 1840-1849.
- [17] Wongdee K., Pandaranandaka J., Teerapompuntakit J., Tudpor K., Thongbunchoo J., Thongon N., Jantarajit W., Krishnamra N., Charoenphandhu N.: Osteoblasts express claudins and tight junction-associated proteins. *Histochem Cell Biol* 130 (2008) 79-90.
- [18] Civitelli R., Beyer E.C., Warlow P.M., Robertson A.J., Geist S.T., Steinberg T.H.: Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest* 91 (1993) 1888-1896.
- [19] Prele C.M., Horton M.A., Caterina P., Stenbeck G.: Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp Cell Res* 282 (2003) 24-34.
- [20] Chang M.K., Raggatt L.J., Alexander K.A., Kuliwaba J.S., Fazzalari N.L., Schroder K., Maylin E.R., Ripoll V.M., Hume D.A., Pettit A.R.: Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol* 181 (2008) 1232-1244.
- [21] Włodarski K.: Histogeneza tkanki kostnej. *Czas. Stomatol* 62 (2009) 282-292.
- [22] Kuzyk P.R., Saccone M., Sprague S., Simunovic N., Bhandari M., Schemitsch E.H.: Cross-linked versus conventional polyethylene for total hip replacement: a meta-analysis of randomised controlled trials. *J Bone Joint Surg Br* 93 (2011) 593-600.
- [23] Branemark R., Branemark P.I., Rydevik B., Myers R.R.: Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev* 38 (2001) 175-181.
- [24] Wrobel E., Witkowska-Zimny M., Przybylski J.: Biological mechanisms of implant osseointegration. *Ortop Traumatol Rehabil* 12 (2010) 401-409.
- [25] Maciejewska I., Nowakowska J., Bereznowski Z.: Osteointegration of titanium dental implants: phases of bone healing. A review article. *Protet. Stomatol* 3 (2006) 214-219.
- [26] Boyan B.D., Sylvia V.L., Liu Y., Sagun R., Cochran D.L., Lohmann C.H., Dean D.D., Schwartz Z.: Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A2. *Biomaterials* 20 (1999) 2305-2310.
- [27] Kos M., Łuczak K., Klempous R.: Contemporary views on the mechanisms of bone tissue healing. *Adv Clin Exp Med* 11 (2002).
- [28] De Villiers Tj.: Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 23 (2009) 73-85.
- [29] Mysliwiec J., Zbucki R., Nikolajuk A., Mysliwiec P., Taranta A., Kaminski K., Bondyra Z., Dadan J., Gorska M., Winnicka M.M.: Role of interleukin-6 on RANKL-RANK/osteoprotegerin system in hypothyroid ovariectomized mice. *Folia Histochem Cytobiol* 48 (2010) 549-554.
- [30] Kousteni S., Bilezikian J.P.: The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts. *Curr Osteoporosis Rep* 6 (2008) 72-76.
- [31] Maruotti N., Corrado A., Grano M., Colucci S., Cantatore F.P.: Normal and osteoporotic human osteoblast behaviour after 1,25-dihydroxy-vitamin D(3) stimulation. *Rheumatol Int* 29 (2009) 667-672.
- [32] Lamghari M., Tavares L., Camboa N., Barbosa M.A.: Leptin effect on RANKL and OPG expression in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem* 98 (2006) 1123-1129.
- [33] Wang L., Huang Y., Pan K., Jiang X., Liu C.: Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation. *Ann Biomed Eng* 38 (2010) 77-87.
- [34] Bosetti M., Boccafocchi F., Leigh M., Cannas M.F.: Effect of different growth factors on human osteoblast activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering. *Biomol Eng* 24 (2007) 613-618.
- [35] Kaewsrirachan J., Wongwitwichot P., Chandarajoti K., Chua K.H., Ruzzymah B.H.: Sequential induction of marrow stromal cells by FGF2 and BMP2 improves their growth and differentiation potential in vivo. *Arch Oral Biol* 56 (2010) 90-101.
- [36] Maegawa N., Kawamura K., Hirose M., Yajima H., Takakura Y., Ohgushi H.: Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Tissue Eng Regen Med* 1 (2007) 306-313.
- [37] Marie P.J., Debais F., Hay E.: Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. *Histol Histopathol* 17 (2002) 877-885.
- [38] Spector J.A., Mathy J.A., Warren S.M., Nacamuli R.P., Song H.M., Lenton K., Fong K.D., Fang D.T., Longaker M.T.: FGF-2 acts through an ERK1/2 intracellular pathway to affect osteoblast differentiation. *Plast Reconstr Surg* 115 (2005) 838-852.
- [39] Ng F., Boucher S., Koh S., Sastry K.S., Chase L., Lakshminpathy U., Choong C., Yang Z., Vemuri M.C., Rao M.S., Tanavde V.: PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112 (2008) 295-307.
- [40] Naot D., Chhana A., Matthews B.G., Callon K.E., Tong P.C., Lin J.M., Costa J.L., Watson M., Grey A.B., Cornish J.: Molecular mechanisms involved in the mitogenic effect of lactoferrin in osteoblasts. *Bone* 49 (2011) 217-224.

# PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF DRUG DELIVERY CARRIERS FOR LOCAL ADMINISTRATION OF SODIUM ALENDRONATE

URSZULA POSADOWSKA<sup>1</sup>, ANA MOREIRA<sup>1,2</sup>, RITA MARTINS<sup>1,2</sup>, ELZBIETA PAMULA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

<sup>2</sup> UNIVERSITY OF PORTO, FACULTY OF ENGINEERING, RUA DR. ROBERTO FRIAS, S/N, 4200-465 PORTO, PORTUGAL

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

## Abstract

Osteoporosis is often treated with the use of sodium alendronate – a drug that inhibits osteoclast-mediated bone resorption and regulates rate of bone turnover. However the disadvantage of oral administration of sodium alendronate is poor drug absorption from the gastrointestinal track and severe adverse effects. Therefore we propose local sustained drug delivery systems based on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) micro- and nanocarriers, which can be administered directly by simple injections to the required place in the body. In this study we encapsulated sodium alendronate into PLGA micro- and nanospheres via a double-emulsification technique. Emulsion formation in different shear rate conditions was used to optimize the size of the carriers. The prepared microspheres were observed under an inverted optical microscope which confirmed their micrometric size. The nanospheres were analyzed by atomic force microscopy, which allowed visualization of their shape and measurement of their size. Moreover the hydrodynamic diameter of the nanospheres, polydispersity index as well as zeta potential were examined by dynamic light scattering. The experiments show that drug release does not depend on the size of the carriers. Analyzed carriers do not cause cytotoxicity upon contact with osteoblast like-cells.

**Keywords:** nanocarriers, microcarriers, poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), osteoporosis, controlled drug delivery, sodium alendronate

[*Engineering of Biomaterials* 119 (2013) 8-12]

## Introduction

Sodium alendronate (4-amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonic acid, sodium trihydrate, SA) (FIG. 1), is a potent amino-bisphosphonate that has undergone extensive clinical development for the treatment of osteoporosis and other skeletal disorders [1]. The four-carbon amino side chain of alendronate permits effective inhibition of osteoclast-mediated bone resorption [2]. Therefore, treatment with alendronate specifically inhibits increased bone resorption and thereby normalizes the rate of bone turnover.

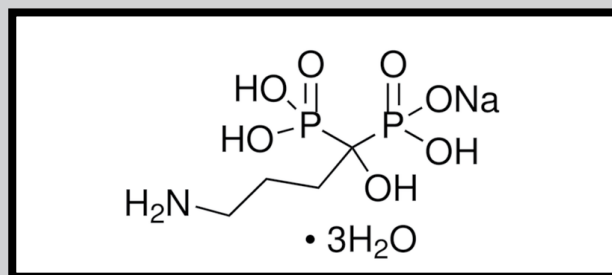


FIG. 1. Chemical formula of sodium alendronate.

Since oral administration is the most preferred for chronic drug therapy, the major disadvantage of the clinically utilized sodium alendronate is its poor absorption (less than 1% of the oral dose) from the gastrointestinal tract. In addition, the administration of sodium alendronate has been associated with severe adverse effects such as fever or stomach ulcers in humans [3]. Hence, it would be advantageous to replace systemic treatment by a local delivery system.

Drug-delivery systems are one of the most promising application fields in human health care and represent a continuously evolving field of biomedical materials science [4]. Generally, there have been two major issues in the fabrication of drug delivery systems: site specificity for the desired tissue and the duration time of the circulation of the drug carrier [5]. The challenge for novel drug delivery systems is to overcome these limitations in order to achieve optimal local absorption and bioavailability [6]. Local drug delivery systems can reduce side-effects, improve the efficacy of existing drugs and open the possibility of entire classes of new treatments. Such combined systems are able to precisely control the timing of drug release by adjusting the properties of the carriers [7].

Synthetic polymers are often used to produce drug delivery systems. For example, biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) is regarded as one of the most biocompatible materials used to prepare drug carriers. Different drug release profiles can be achieved by varying molecular weight, copolymer ratio, drug-loading, particle size and porosity and manufacturing conditions [8]. PLGA as a potent matrix for alendronate local administration has already been tested e. g. in the form of PLGA/PDLA/methoxyPEG films [9] or PLGA/hydroxyapatite blends [10].

The aim of this study was to design the method of sodium alendronate encapsulation in PLGA micro- and nanocarriers for their local delivery and sustained release. To this end a double-emulsification technique was applied and the resulting carriers were characterized from the point of view of their size, morphology, surface properties, drug loading efficiency and release. Finally, biological tests were conducted using MG63 osteoblast-like cells to evaluate cell viability, distribution and morphology in the presence of the produced particles and the solution into which drugs were released.

## Materials and Methods

### Materials

Poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA, 85:15, Mn = 80 kDa, d = 1.9), synthesized by a ring-opening polymerization in bulk at 100°C with Zr(acac)<sub>4</sub> initiator [11] was kindly provided by Prof. P. Dobrzynski from the Centre of Polymer and Carbon Materials of the Polish Academy of Sciences in Zabrze, Poland. Sodium alendronate (batch no.: 504041227) was a gift from Polpharma (Poland).



### Preparation of PLGA micro- and nanoparticles

The PLGA particles were fabricated using a double emulsification water/oil/water technique. An aqueous solution of sodium alendronate (0.88 mg/mL) was emulsified in a 10% (w/v) PLGA polymer solution in dichloromethane, forming the primary (water/oil) emulsion. The primary emulsion was then introduced into an aqueous solution with a stabilizer, 4% polyvinyl alcohol (PVA, Mowiol 4-88, Mn = 31 kDa) in UHQ-water and shear stress was applied, forming the secondary (water/oil/water) emulsion.

The shearing rate involved during the second emulsification stage controlled the size of the formed droplets and thereby the final size of the polymeric particles. Therefore, in order to produce nanoparticles, an ultrasonication via ultrasonic probe (Sonics VibraCell™, USA, condition: 40% of the cycle) was used, whereas in the case of microparticles production a mechanical stirring on electromagnetic agitator at 1000 rpm was used. Afterwards, the emulsions were kept on an electromagnetic stirrer, in order to evaporate the dichloromethane. Then sodium alendronate-loaded nano- or microparticles (depending on the shear rate applied) were submitted to centrifugation, multistep washing process in UHQ-water and vacuum-drying.

### Surface properties characterization

The dry particles were resuspended in 2 mL of UHQ-water using the ultrasonic bath (Polsonic® Sonic-3) for 15 min without heating.

The microparticles' size and topography were evaluated using an inverted optical microscope (Axiovert Zeiss) in the interference mode and with the AxioVision Software the size of the particles was measured.

Nanoparticles' shape was observed with atomic force microscopy (AFM, Thermomicroscopes, Explorer, Veeco). To achieve a better distribution of the nanoparticles during the measurements, the samples were 10 times diluted. The images were recorded in air using Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> tips with a nominal radius of curvature of 30 nm (NanoProbe™ tips) in contact mode with a spring constant of 0.1 N/m. The proportional, integral and derivative parameters of the feedback mechanism applied to adjust the tip-to-sample distance, in order to keep a constant force between the tip and the sample, were 1, 0.3 and 0, respectively. Scan areas of 2 μm × 2 μm and of three random places with a 300 resolution (300 × 300 pixels) were recorded at a scan rate of 6 μm/s. All the images were flattened and treated to remove any artifacts using the software SPMLab6.0.2 Explorer.

Size distribution, zeta potential and polydispersity of nanoparticles were analyzed using dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS - Malvern Instrument).

### Drug loading and in vitro release

In order to measure the amount of sodium alendronate in micro- and nanoparticles, a UV-spectrophotometry technique (CECIL CE2502, 2000 Series at 332 nm) with the o-phthalaldehyde (OPA) method was used.

The experiments on drug release from the carriers were carried out by diffusion through semipermeable membrane and spectrophotometric quantitative analysis of sodium alendronate with OPA. In brief, dried particles were introduced in a membrane with MWCO (molecular weight cut off) of 12 kDa (ZelluTrans/Roth T3 made of regenerated cellulose) previously washed with UHQ-water. The membranes with the samples were transferred to the flasks containing 10 mL of UHQ-water and 1 mM of nitric acid on the electromagnetic stirrer at 50 rpm. The release samples were collected for 7 days (every 3 h in the first three days, twice on the fourth day and once on days 5, 6 and 7).

### Biological tests

Cell culture studies were performed using MG63 osteoblast-like cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). These cells were seeded on 24-well plates (Tissue Culture Plate, Sarstedt, USA) at a density of 1.5·10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> and cultured in MEM with Earle's Salts (supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine) at 37°C under 5.0% CO<sub>2</sub> atmosphere. One day later, the medium was substituted by 1 mL of new medium and solution from the sodium alendronate release assay at a 8:2 v/v ratio. For cell culture studies, the release solutions were collected after 1, 3 and 7 days. After the following day of cell culture, the supernatants were collected to assess the nitric oxide (NO) level by the Griess method, the cells were stained using Hematoxylin and Eosin (H&E) and their viability was analyzed by the MTT test. Tissue culture polystyrene (TCPS, i.e. bottom of the well plates) was used as a control.

### Statistics

The results are shown as mean ± SEM (standard error of the mean). Statistical analysis was performed using a distribution t-test with SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software. Significant differences were assumed at p\* < 0.05.

## Results and Discussion

The shape and size of the microparticles were evaluated using an inverted optical microscope with AxioVision software. FIG. 2 A and 2 B display the morphology of unloaded and sodium alendronate loaded microparticles. It can be noticed that all unloaded particles (FIG. 2A) display a black color, whereas in FIG. 3 B almost all microparticles show greater transparency. These results can lead us to distinguish loaded from unloaded microparticles from their transparency. Based on the provided software it was possible to measure the size of the microparticles. Thus, the sodium alendronate unloaded microparticles' average diameter was 8.7 μm ± 1.8 μm, while the loaded particles showed a significantly higher diameter of 15.3 μm ± 6.1 μm.

Sodium alendronate loading efficiency in the microparticles (which reflects the mass of drug incorporated into the particles in relation to the mass of drug initially added to the system), was 50% ± 5%. This means that it is desirable to improve this parameter, by changing, in the future experiments for example, concentration of PVA in the external aqueous phase or providing higher ionic strength by addition of NaCl [12].

The morphology and size distribution, zeta potential and polydispersity of the nanoparticles were evaluated with the use of atomic force microscopy and dynamic light scattering, respectively. FIG. 3 A and B show the 2 μm × 2 μm three-dimensional AFM pictures of unloaded and loaded nanoparticles, which confirm their nanometric size and spherical shape. In FIG. 3 C and D the size distribution of unloaded and loaded nanoparticles as measured by DLS is also presented. The results show that particles' diameter is in the range of 100 nm to 600 nm, in both cases. TABLE 1 summarizes the results obtained by the DLS method. The average diameter of unloaded and loaded nanoparticles is very similar, 252 ± 5 nm and 241 ± 8 nm, respectively. PLGA nanoparticles produced have a polydispersity in the standard range, 0.219 ± 0.011 for unloaded and 0.194 ± 0.016 for sodium alendronate loaded nanoparticles. The results of zeta potential distribution show negative values in both cases that are due to the negative charges of the polymer [13].

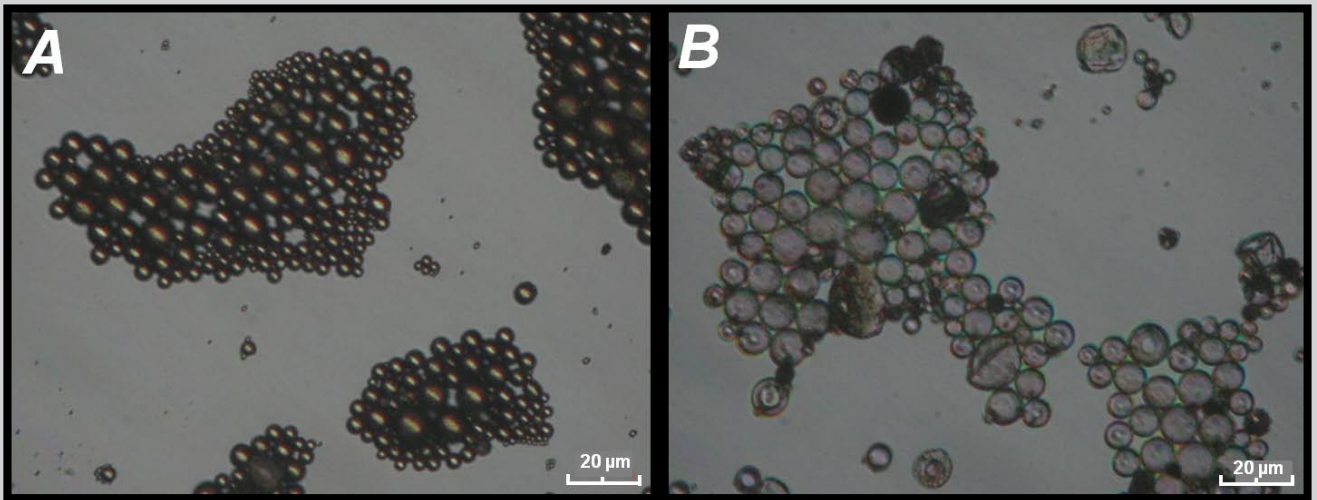


FIG. 2. Inverted optical microscopy pictures of A – unloaded microparticles and B – loaded microparticles. Magnification 40x. Scale bar 20  $\mu\text{m}$ .

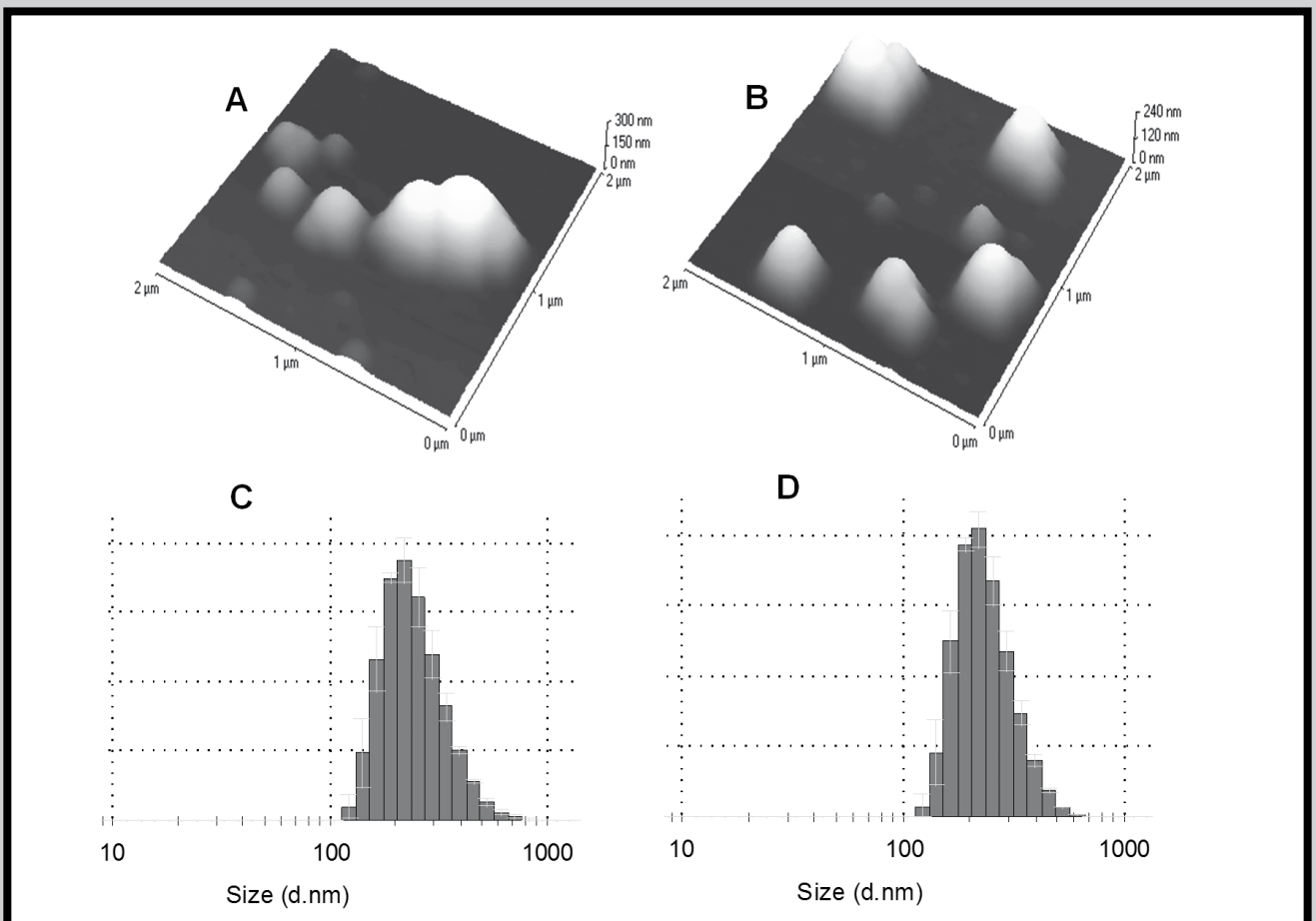


FIG. 3. Three dimensional AFM topography pictures (A, B) and size distribution (C, D) of - unloaded nanoparticles (A, C) and - loaded nanoparticles (B, D).

TABLE 1. Properties of PLGA nanoparticles unloaded and loaded with sodium alendronate.

	Diameter (nm)	Polydispersity	Zeta Potential (mV)
Unloaded	$252 \pm 5$	$0.219 \pm 0.011$	$-14.9 \pm 0.4$
Loaded	$241 \pm 8$	$0.194 \pm 0.016$	$-16.6 \pm 0.1$



Zeta potential plays an important role in the chemical properties of the interface between solid and liquid and is characterized by the result of an electric double-layer, an electric potential across the surface of the material. The magnitude of zeta potential reflects the magnitude of charges absorbed by the solid [14]. Therefore, zeta potential values are negative due to the negative charge of the PLGA [13] and confirm that the sodium alendronate is situated inside the carriers and not on their surface. If this drug was on the surface the zeta potential value should have been approximately -5 mV [15]. The absolute value of zeta potential obtained can also indicate that the particles produced have an acceptable short-term stability [16].

Spectroscopic evaluations of drug concentration in surrounding medium show sustained linear release of sodium alendronate during the three days of the experiment (FIG. 4). Afterwards the log phase was achieved. Interestingly, release kinetics was the same for both nano- and microspheres, what indicates that the size of particles does not influence release profile. Further it may be concluded that drug release from PLGA carriers seems to be Fickian diffusion controlled, not degradation controlled. In other words, the drug release is mainly governed by the rate of dissolution of the alendronate through complex porosities of the PLGA material [17].

FIG. 5 shows the absorbance values of MTT test (FIG. 5 A) and nitric oxide concentration (FIG. 5 B) for MG63 osteoblast-like cells cultured for 1, 3 and 7 days in release solution (R) of micro- (M) and nanoparticles (N), loaded (+) and unloaded (-) with sodium alendronate and also cultured for one day with loaded and unloaded nanoparticles (N+ and N-). On day 1, the viability of cells in all conditions of culture was similar or higher than on TCPS. After 3 days of culture, the cell viability increased in almost all conditions (RM+, RM-, RN+) and decreased in RN- sample but to a similar value as the control. On day 7, in conditions RM- and RN- the cell viability increased and in conditions RM+ and RM- decreased. It is worth noting that changes in cells viability measured in all conditions and for all days were always similar or higher than the viability on TCPS. Since this material is probably the most appropriate for cell culture, it is possible to verify that both release solutions from micro- and nanoparticles, loaded or unloaded, do not influence negatively cell viability. The presence of nanoparticles also does not influence viability of cells. For all materials and culture times studied the concentration of nitric oxide was similar to that of control TCPS, suggesting that the nano- and microparticles or release solution do not have cytotoxic effects on MG63 cells (FIG. 5 B).

FIG. 6 presents the pictures obtained under an inverted optical microscope which show that the MG63 cells effectively adhered in the presence of the release solution or PLGA nanoparticles, which were loaded with sodium alendronate or unloaded. Cells' morphology was the same as that on reference TCPS.

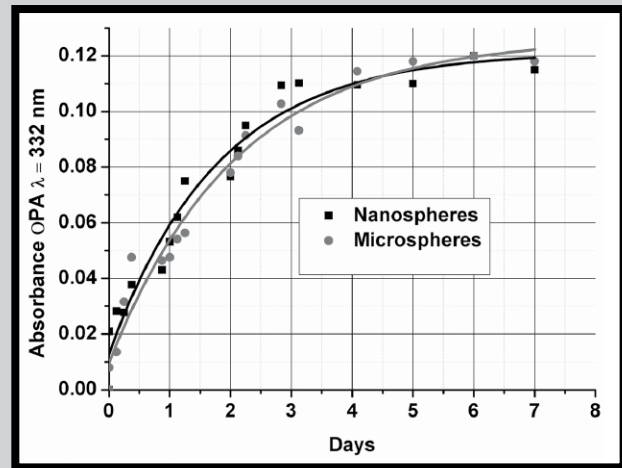


FIG. 4. Release of sodium alendronate from PLGA nano- and microspheres measured by OPA method.

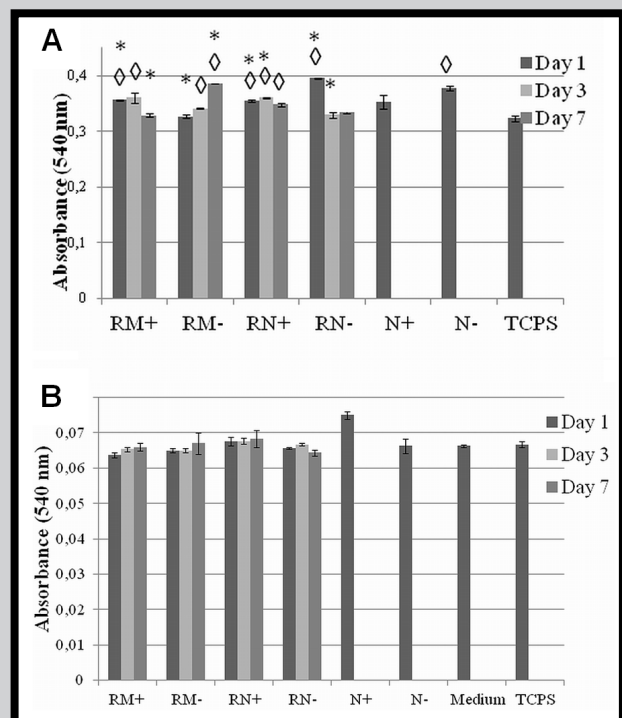
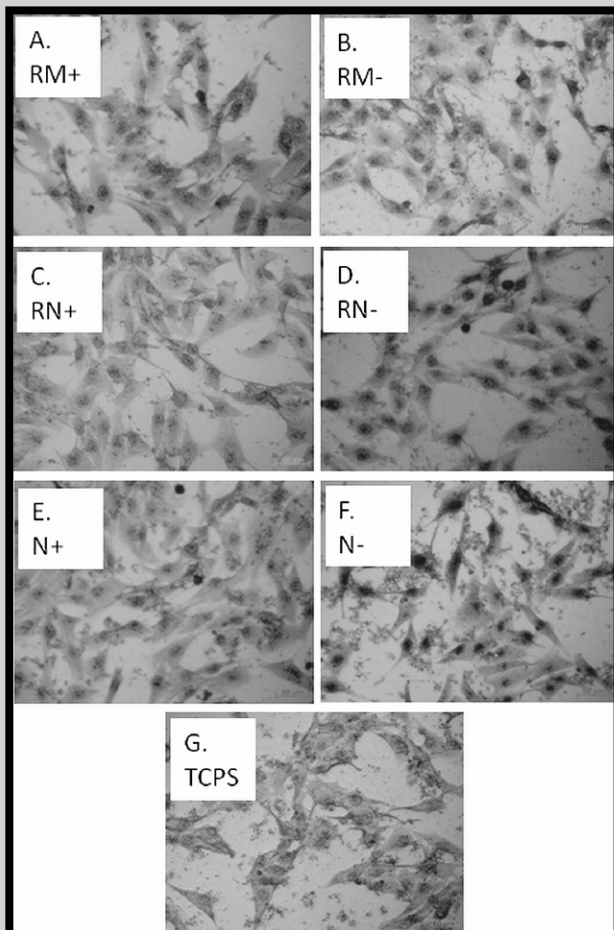


FIG. 5. Absorbance values of the MTT assay (A) and nitric oxide concentration (NO) (B) performed on MG63 osteoblast-like cells cultured for 1, 3 and 7 days in release solution (R) of micro- (M) and nanoparticles (N), loaded (+) and unloaded (-) with sodium alendronate as well as with nanoparticles loaded (N+) and unloaded (N-). TCPS was used as control. ◇ Significant differences as compared with TCPS control, \* Significant differences between release solution of nano- and microparticles loaded and unloaded ( $p < 0.05$ ).



**FIG. 6. Morphology of MG63 osteoblast-like cells cultured for 1 day in release solution (R) of micro-(M) and nanoparticles (N), loaded (+) and unloaded with sodium alendronate as well as with loaded (N+) and unloaded (N-) Nanoparticles. TCPS was used as control.**

## Conclusions

In this study the encapsulation of sodium alendronate into PLGA micro- and nanoparticles via a double-emulsification technique and analysis of the particles' physicochemical and biological properties were performed. Optical microscopy and atomic force microscopy evaluations confirmed that by changing the shear stress applied to the second emulsion of the particles' fabrication process it is possible to change the size of the produced carriers. The results of zeta potential show that sodium alendronate is incorporated inside the particles, since loaded and unloaded samples have similar values of surface charge. Moreover it was found that the micro- and nanospheres obtained show sustainable release of the drug during short-term studies. Finally, the biological tests lead us to conclude that incubation of osteoblast-like cells in nanoparticles or release solutions from both nano- and microcarriers has no negative effect on cell morphology, adhesion and proliferation.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. P. Dobrzynski (Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, Zabrze, Poland) for providing PLGA, Polpharma for providing sodium alendronate and Dr L. Zych (Department of Ceramics and Refractories, Faculty of Materials Science and Ceramics) for the access to the Zetasizer. This study was financed from the National Science Center Poland (DEC-2012/05/B/ST8/00129).

## References

- [1] Karageorgiou V., Kaplan D.: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26(27) (2005) 5474-5491.
- [2] Liberman U. A., Weiss S. R., Bröll J., Minne H. W., Quan H., Bell N. H., Rodriguez-Portales J., Downs R. W. Jr., Dequeker J., Favus M.: Effect of Oral Alendronate on Bone Mineral Density and the Incidence of Fractures in Postmenopausal Osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 333(22) (1995) 1437-1444.
- [3] Ezra A., Golomb G.: Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv. Drug Delivery Rev.* 42(3) (2000) 175-195.
- [4] Vallet-Regi M., Balas F., Arcos D.: Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46(40) (2007) 7548-7558.
- [5] Choi S. W., Kim J. H.: Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone. *J. Controlled Release* 122(1) (2007) 24-30.
- [6] Peter B., Pioletti D. P., Lad'b S., Bujoli B., Pilet P., Janvier P., Guicheux J., Zambelli P. Y., Bouler J., Gauthier O.: Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 36(1) (2005) 52-60.
- [7] Verron E., Khairoun I., Guicheux J., Bouler J. M.: Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discovery Today* 15(13-14) (2010) 547-552.
- [8] Cenni E., Granchi D., Avnet S., Fotia C., Salerno M., Micieli D., Sarpietro M. G., Pignatello R., Castelli F., Baldini N.: Biocompatibility of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials* 29(10) (2008) 1400-1411.
- [9] Long K. A., Jackson J. K., Yang C., Chehroudi B., Brunette D. M., Burt H. M.: Controlled release of alendronate from polymeric films. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 20(5-6) (2009) 653-72.
- [10] Veena H. R., Prasad D.: Evaluation of an aminobisphosphonate (alendronate) in the management of periodontal osseous defects. *J. Indian Soc Periodontol* 14 (2010) 40-45.
- [11] Dobrzynski P.: Synthesis of biodegradable copolymers with low-toxicity zirconium compounds. III. Synthesis and chain-microstructure analysis of terpolymer obtained from L-lactide, glycolide, and  $\epsilon$ -caprolactone initiated by zirconium(IV) acetylacetonate. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 40(18) (2002) 3129-3143.
- [12] Miladi K., Sfar S., Fessi H., Elaissari A.: Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications. *Int. J. Pharm.* 445(1-2) (2013) 181-195.
- [13] Taetz S., Nafee N., Beisner J., Piotrowska K., Baldes C., Mürdter T. E., Huwer H., Schneider M., Schaefer U. F., Klotz U., Lehr C. M.: The influence of chitosan content in cationic chitosan/PLGA nanoparticles on the delivery efficiency of antisense 2'-O-methyl-RNA directed against telomerase in lung cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72(2) (2009) 358-369.
- [14] Lin Y., Mao S.:  $\zeta$  Potential and its effect on compaction of biomass fuel logs. *Biomass Bioenergy* 20(3) (2001) 217-222.
- [15] Mondal T., Sunny M. C., Khastgir D., Varma H. K., Ramesh P.: Poly (l-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) microspheres laden with bioactive glass-ceramic and alendronate sodium as bone regenerative scaffolds. *Mater. Sci. Eng., C* 32(4) (2012) 697-706.
- [16] Wu L., Zhang J., Watanabe W.: Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Delivery Rev.* 63(6) (2011) 456-469.
- [17] Cruz L., Assumpção E., Staniscuaski-Guterres S., Raffin-Pohlmann A.: High encapsulation efficiency of sodium alendronate in eudragit S100/HPMC blend microparticles. *Quím. Nova* 32(5) (2009) 1170-1174.



# OCENA WPŁYWU DRGAŃ MECHANICZNYCH ORAZ BOGATOPŁYTKOWEGO OSOCZA NA GOJENIE TRZONÓW KOŚCI PISZCZELOWYCH LECZONYCH ELASTYCZNYM STABILIZATOREM WĘGLOWYM „CARBOELASTOFIX”

MACIEJ AMBROZIAK<sup>1\*</sup>, ANDRZEJ GÓRECKI<sup>1</sup>, MACIEJ LUTEREK<sup>1</sup>, PIOTR KRAKOWIAN<sup>2</sup>, TOMASZ LEKSYZYCKI<sup>2</sup>, IGOR BISSENIK<sup>3</sup>, ŁUKASZ KOPERSKI<sup>4</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>5</sup>, PAWEŁ SKOWRONEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDU RUCHU, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. LINDLEYA 4, 02-005 WARSZAWA

<sup>2</sup> INSTYTUT PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI PAN, UL. PAWIŃSKIEGO 5B, 02-106 WARSZAWA

<sup>3</sup> SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO, UL. NOWOURSYNOWSKA 159, 02-776 WARSZAWA

<sup>4</sup> ZAKŁAD ANATOMII PATOLOGICZNEJ, SP CSK, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. PAWIŃSKIEGO 7, 02-106 WARSZAWA

<sup>5</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

\* AUTOR DO KORESPONDENCJI

## Streszczenie

Analizie poddano 9 owiec z gatunku owca wrzosówka – średni wiek owiec 5 lat. Zwierzęta podzielone zostały na 3 grupy, po 3 w każdej. U wszystkich owiec dokonano przecięcia trzonu kości podudzia stabilizując odłamy stabilizatorem Carboelastofix. W grupie pierwszej, kontrolnej, nie stosowano ani stymulacji mechanicznej ani biochemicznej. W grupie drugiej zastosowano stymulację mechaniczną wzbudnikiem piezoelektrycznym mocowanym do nośnika stabilizatora zewnętrznego. W grupie trzeciej zastosowano stymulację mechaniczną oraz dodatkowo śródoperacyjnie podane zostało do szczeliny złamania autogenne osocze bogatopłytkowe. Analiza zrostu prowadzona była na podstawie zdjęć rentgenowskich wykonywanych w 2, 5 i 8 tygodniu po operacji. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone, a powstała wokół szczeliny złamania kostnina została poddana badaniu histologicznemu oraz analizie w badaniu mikrotomografii komputerowej.

We wszystkich trzech grupach uzyskano zrost kostny. Analiza gęstości tworzącej się kostniny prowadzona na podstawie badań obrazowych nie wykazała znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami, jednakże gęstości tworzącej się kostniny w grupie ze stymulacją mechaniczną była najniższa. Autorzy dowodzą tym samym, że przy zastosowaniu elastycznego stabilizatora umożliwiającego mikroruchy poosiowe w szczelinie złamania podczas naturalnego obciążania kończyny, efekt dodatkowej stymulacji mechanicznej jest nie istotny dla poprawienia jakości formującego się zrostu kostnego. Osocze bogatopłytkowe w przypadku prawidłowo postępującego zrostu złamania nie wpływa na jakość tworzącej się kostniny.

**Słowa kluczowe:** gojenie złamania, czynniki wzrostu, stabilizator zewnętrzny

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 13-20]

# ASSESSMENT OF THE EFFECT OF MECHANICAL VIBRATIONS AND PLATELET-RICH PLASMA ON THE HEALING OF TIBIAL STEMS TREATED WITH THE ELASTIC CARBON STABILIZER „CARBOELASTOFIX”

MACIEJ AMBROZIAK<sup>1\*</sup>, ANDRZEJ GÓRECKI<sup>1</sup>, MACIEJ LUTEREK<sup>1</sup>, PIOTR KRAKOWIAN<sup>2</sup>, TOMASZ LEKSYZYCKI<sup>2</sup>, IGOR BISSENIK<sup>3</sup>, ŁUKASZ KOPERSKI<sup>4</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>5</sup>, PAWEŁ SKOWRONEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CHAIR AND DEPARTMENT OF ORTHOPEDICS AND TRAUMATOLOGY OF LOCOMOTOR SYSTEM, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, UL. LINDLEYA 4, 02-005 WARSZAWA, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF FUNDAMENTAL TECHNOLOGICAL RESEARCH POLISH ACADEMY OF SCIENCES, UL. PAWIŃSKIEGO 5B, 02-106 WARSZAWA, POLAND

<sup>3</sup> WARSAW UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES, UL. NOWOURSYNOWSKA 159, 02-776 WARSZAWA, POLAND

<sup>4</sup> PATHOLOGICAL ANATOMY PLANT OF THE AUTONOMOUS PUBLIC CENTRAL CLINICAL HOSPITAL OF MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, UL. PAWIŃSKIEGO 7, 02-106 WARSZAWA, POLAND

<sup>5</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

\* CORRESPONDING AUTHOR

## Abstract

9 Wrzosowka sheep were analyzed – average age: 5 years. The animals were divided into three groups, each with 3 sheep. All the sheep underwent the cutting of the shin stem and the fractions were stabilized with the Carboelastofix stabilizer. In the first, control group, no mechanical or biochemical stimulation was performed. In the second group, mechanical stimulation was applied, with the use of a piezoelectric inductor, mounted in the carrier of the external stabilizer. The third group involved the application of mechanical stimulation and, additionally, autogenic platelet-rich plasma was mid-surgically applied in the fracture gap. The growth analysis was performed on the basis of the X-ray pictures taken in the 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week after the surgery. After the experiment had been finalized, the animals were put to death, and the callus formed around the fracture was histologically examined and analyzed in a computer microtomography test.

All the three groups involved bone growth. The analysis of the density of the forming callus performed on the basis of the imaging examinations did not exhibit significant differences between the tested groups; however, the density of the forming callus in the group involving mechanical stimulation was the lowest. In this way, the authors prove that, with the application of an elastic stabilizer enabling axial micromovements in the fracture during the natural limb load, the effect of the additional mechanical stimulation is insignificant for the improvement of the quality of the forming bone growth. The platelet-rich plasma, in the case of the proper fracture growth, does not affect the quality of the forming limb.

**Keywords:** fracture healing, growth factors, external stabilizer

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 13-20]

Celem projektu było zbadanie efektów stymulacji gojenia kości długich drganiami mechanicznymi o małej amplitudzie i częstotliwościach poniżej 100 Hz oraz kliniczne zbadanie synergicznego efektu równocześnie stosowanych stymulacji mechanicznej i biochemicznej czynnikami wzrostu. Osteogeny efekt różnych oddziaływań mechanicznych, jak i biochemicznych jest poparty dowodami zarówno eksperymentalnymi, jak i klinicznymi [1-3]. Praktyka kliniczna pokazuje, że długotrwałe odciążenie i brak stymulacji mechanicznej może prowadzić do opóźnienia gojenia złamania kości lub nawet do braku zrostu [4]. Do eksperymentu wykorzystano nowatorski, zewnętrzny stabilizator węglowy Carboelastofix, który znalazł już zastosowanie w badaniach klinicznych [5]. Zaletą stabilizatora jest możliwość mechanicznego oddziaływania na postępujący zrost kostny przez dostosowanie sztywności konstrukcji w zależności od obciążania oraz postępu tworzącej się kostniny. Konstrukcja umożliwiła łatwy montaż wzbudnika piezoelektrycznego generującego deformacje elastycznej płytki węglowej i w ten kontrolowany sposób dodatkowo obciążenie strefy gojenia. Przezierność dla promieni rentgenowskich węglowych płytek umożliwiła ponadto dokładną ocenę postępującego zrostu.

Celem pracy poza ekspercką analizą zrostu w radiogramach jest również ocena jakości kostniny w preparatach histologicznych i w badaniu mikrotomografii komputerowej.

## Materiały i metody

Analizie poddano 9 owiec z gatunku owca wrzosówka. Wszystkie osobniki były samicami o ukończonym wzroście kostnym – średni wiek badanych osobników 5 lat. Badanie przeprowadzono w Katedrze Nauk Klinicznych SGGW w Warszawie.

Po podaniu środków uspokajających i wprowadzeniu owiec w znieczulenie ogólne wziewne przy użyciu par izofluranu wykonywano zabieg stabilizacji kości podudzia stabilizatorem Carboelastofix, a następnie przecięciu poprzecznym w połowie długości trzonu. Cały zabieg wykonany był z zachowaniem zasad aseptyki chirurgicznej. Zwierzęta po zabiegu przebywały w boksach bez wiązania, pod stałą kontrolą lekarską, aż do całkowitego powrotu świadomości. Owce otrzymywały osłonę antybiotykową, oraz przez 4 do 6 dni po zabiegu środki przeciwbólowe. Zwierzęta podzielone zostały na 3 grupy, po 3 owce w każdej grupie. W grupie pierwszej - kontrolnej, nie stosowano ani stymulacji mechanicznej ani biochemicznej. W grupie drugiej zastosowano stymulację mechaniczną wzbudnikiem piezoelektrycznym mocowanym do nośnika stabilizatora zewnętrznego. Wzбудnik, po zamontowaniu na stabilizator, wywoływał przemieszczenia osiowe o amplitudzie około 70  $\mu\text{m}$  i częstotliwości 30 Hz. Stymulacja mechaniczna rozpoczęła się w dwa tygodnie po zabiegu i trwała do ósmego tygodnia. W grupie trzeciej zastosowano stymulację mechaniczną oraz dodatkowo śródoperacyjnie podane zostało do szczeliny złamania autogenne osocze bogatopłytkowe (PRP).

Stabilizator Carboelastofix jest zbudowany ze stosu płytek. Zdejmowanie kolejnych płytek umożliwia kontrolowane zmniejszanie sztywności konstrukcji. W przedstawionym badaniu, przez cały okres trwania eksperymentu wykorzystywano stabilizator składający się z dwóch płytek, z których górną zdejmowano jedynie na czas stymulacji mechanicznej (RYS. 1).

## Introduction

The aim of the project was the examination of the effect of bone healing stimulation with long mechanical vibrations of a low amplitude as well as with frequencies below 100 Hz, and also a clinical examination of the synergic effect of the simultaneously applied mechanical and biochemical (with growth factor) stimulation. The osteogenic result of various mechanical and biochemical effects is supported by both experimental and clinical evidence [1-3]. The clinical practice shows that a long-term unloading and the lack of mechanical stimulation can lead to a prolonged healing of the fractured bone or even to the lack of its growth [4]. The experiment included the use of an innovative external carbon stabilizer, Carboelastofix, which has found its application in clinical tests [5]. The advantage of the stabilizer is the possibility of mechanically affecting the proceeding bone adhesion through the adaptation of the structure rigidity to the load and to the progress of the forming callus. The construction enables an easy assembly of the piezoelectric inductor which generates the deformation of the elastic carbon plate and, in this control manner, it also enables an additional load of the healing area. The X-ray transparency of carbon plates also facilitates a detailed assessment of the progressing growth.

The aim of the work, beside the expert adhesion analysis in radiograms, is also an evaluation of the callus quality in histological formulations and in the computer tomography tests.

## Materials and Methods

9 Wrzosowka sheep underwent the analysis. All the individuals were male, with the completed bone growth. The average age of the tested individuals was 5 years. The examination was conducted at the Clinical Sciences Department of Warsaw University of Life Sciences.

After the application of sedatives and general inhalation anesthesia with the use of isoflurane vapours, the procedure of shin bone stabilization with the use of the Carboelastofix stabilizer was performed and next the stem was cross-cut in mid-height. All the procedure was performed under aseptic surgical conditions. After the surgery, the animals were kept loose in boxes, under constant medical observation, until they fully regained consciousness. The sheep were given antibiotic cover and, for the period of 4 to 6 days after the procedure, also pain-relieving agents. The animals were divided into 3 groups, 3 sheep per group. In the first, control, group, no mechanical or biochemical stimulation was applied. In the second group, mechanical stimulation was performed with the use of a piezoelectric inductor in the carrier of the external stabilizer. The inductor, after being mounted on the stabilizer, caused axial displacements of the amplitude of about 70  $\mu\text{m}$  and the frequency of 30 Hz. The mechanical stimulation began two weeks after the procedure and lasted till week 8. The third group involved the application of mechanical stimulation and, additionally, autogenic platelet-rich plasma (PRP) was mid-surgically introduced into the bone fracture.

The Carboelastofix stabilizer is constructed of a pile of plates. Removing successive plates makes it possible to control the reduction of the structure rigidity. In the presented test, throughout the time of the experiment, a stabilizer consisting of two plates was used, the upper one of which was removed only at the time of mechanical stimulation (FIG. 1).



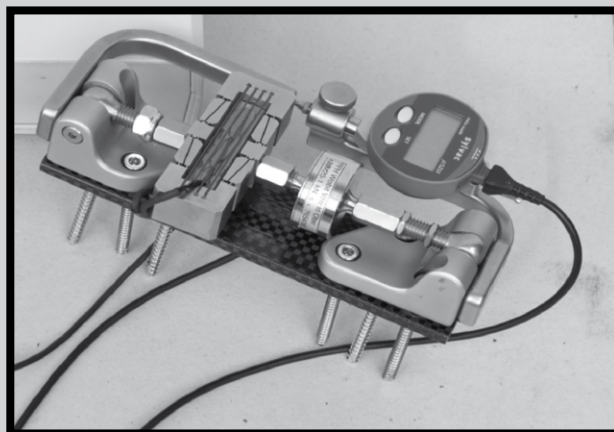


**RYS. 1. Stabilizacja złamania trzonu kości piszczelowej owcy systemem Carboelastofix zbudowanym z dwóch płytek węglowych.**

**FIG. 1. Stabilization of a sheep's tibial stem fracture with the use of the Carboelastofix system made of two carbon plates.**

Zwierzęta z grupy stymulowanej mechanicznie oraz z grupy ze stymulacją mechaniczną i biochemiczną poddawane były takiej samej stymulacji mechanicznej przez czas trwania eksperymentu. Stymulacja mechaniczna rozpoczęła się w dwa tygodnie po zabiegu i trwała do ósmego tygodnia. Stymulacja odbywała się 6 dni w tygodniu i trwała 6 tygodni. Częstotliwość wymuszeń wynosiła 30 Hz, a czas stymulacji 340 sekund, aby uzyskać 10.000 cykli w każdorazowej stymulacji. Amplituda przemieszczeń wynosiła ok. 70  $\mu\text{m}$ . Urządzenie do stymulacji mechanicznej zostało specjalnie zaprojektowane do współpracy ze stabilizatorem Carboelastofix w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki PAN (RYS. 2). Części mocujące urządzenie do stabilizatora wykonane zostały na wymiar ze stopów aluminium i stali przez firmę Medgal. Mocowanie urządzenia zostało zaprojektowane w ten sposób, aby mogło współpracować ze stabilizatorami Carboelastofix różnej długości. Elementem wymuszającym drgania był wzbudnik piezoelektryczny. Wzbudnik pochodzi z firmy Dynamic Structure and Materials (USA), model FPA-0500C-P-1054-150-SS-1M. Wzbudnik ten zapewniał możliwość uzyskania przemieszczenia rzędu 500  $\mu\text{m}$ , natomiast po zamontowaniu na stabilizator amplituda przemieszczenia spadła do około 300  $\mu\text{m}$  (wraz z przyłożeniem napięcia wzbudnik zmniejsza swoją długość). Wzbudnik umożliwił wymuszanie przemieszczeń statycznych oraz dynamicznych w szerokim zakresie częstotliwości. Do sterowania wzbudnikiem zastosowano wzmacniacz E-505 firmy Physik Instrumente, który umożliwił wysteroowanie wzbudnika w zakresie -20 do +120 V, dzięki czemu uzyskano odpowiednią amplitudę wymuszanych drgań. Do pomiaru sił działających w trakcie stymulacji mechanicznej zastosowano czujnik umożliwiający pomiar siły rozciągającej firmy Wobit, model KMM20, o zakresie pomiarowym 1 kN. Do pomiaru przemieszczeń wykorzystano urządzenie firmy Sylvac, model S223, które umożliwia pomiary przemieszczenia z dokładnością do 4  $\mu\text{m}$ . Czujnik przemieszczenia połączony był bezpośrednio z komputerem, co umożliwiło zapisywanie otrzymanych danych.

Urządzeniem sterującym oraz rejestrującym uzyskiwane dane była karta cyfrowo-analogowa połączona z komputerem osobistym. Karta pochodzi z firmy Advantech, model USB-4716 z serii PC-LabCard. Umożliwiła ona pełne wysteroowanie wzmacniacza (zakres -2 do +12 V), dzięki czemu można było w pełni wykorzystać potencjał wzbudnika piezoelektrycznego.



**RYS. 2. Urządzenie do stymulacji mechanicznej szczeliny złamania zamontowane na płytce węglową stabilizatora Carboelastofix.**

**FIG. 2. Device used for the mechanical stimulation of the bone fracture mounted on the carbon plate of the Carboelastofix stabilizer.**

The animals from the mechanically stimulated group and those from the group with both mechanical and biochemical stimulation were exposed to the same mechanical stimulation for the time of the experiment. The mechanical stimulation began two weeks after the procedure and lasted till week 8. The stimulation was performed 6 days a week and lasted 6 weeks. The forcing frequency was 30 Hz, and the stimulation time was 340 seconds, which made it possible to achieve 10.000 cycles in each stimulation. The displacement amplitude was about 70  $\mu\text{m}$ . The mechanical stimulation device was especially designed to cooperate with the Carboelastofix stabilizer at Institute of Fundamental Technological Research Polish Academy of Sciences (FIG. 2). The elements fixing the device to the stabilizer were manufactured to size from aluminum and steel alloys, by Medgal. The element forcing the vibrations was a piezoelectric inductor. The inductor was produced by Dynamic Structure and Materials (USA), model FPA-0500C-P-1054-150-SS-1M. The inductor provided the possibility to obtain a displacement of the order of 500  $\mu\text{m}$ , whereas, after the assembly on the stabilizer, the displacement amplitude dropped to about 300  $\mu\text{m}$  (with the application of voltage, the inductor reduced its length). The inductor enabled forcing of static and dynamic displacements in a wide frequency range. For the inductor control, an E-505 amplifier by Physik Instrumente was used, which made it possible to adjust the inductor to the range of -20 to +120 V. Thus the proper amplitude of the forced vibrations could be obtained. For the measurement of the forces operating during the mechanical stimulation, a detector measuring the tensile force was applied, produced by Wobit, model KMM20, with the measuring range of 1 kN. The displacement measurement involved the application of a device by Sylvac, model S223, which makes it possible to measure displacements with the accuracy of 4  $\mu\text{m}$ . The displacement detector was directly connected to the computer, which enabled the recording of the obtained data.

The controlling and data-recording device was a digital-analogue card connected to a PC. The card, produced by Advantech, model USB-4716, series PC-LabCard, enables a full control of the amplifier (adjustment to the range of -2 to +12 V), and thus it was possible to fully utilize the piezoelectric inductor's potential.



Do prostej obsługi urządzenia napisany został specjalny program komputerowy umożliwiający ustawienie odpowiednich parametrów pracy wzbudnika (czas, częstotliwość, amplituda), rejestrację danych (siła oraz przemieszczenie) oraz przeglądanie i modyfikację danych.

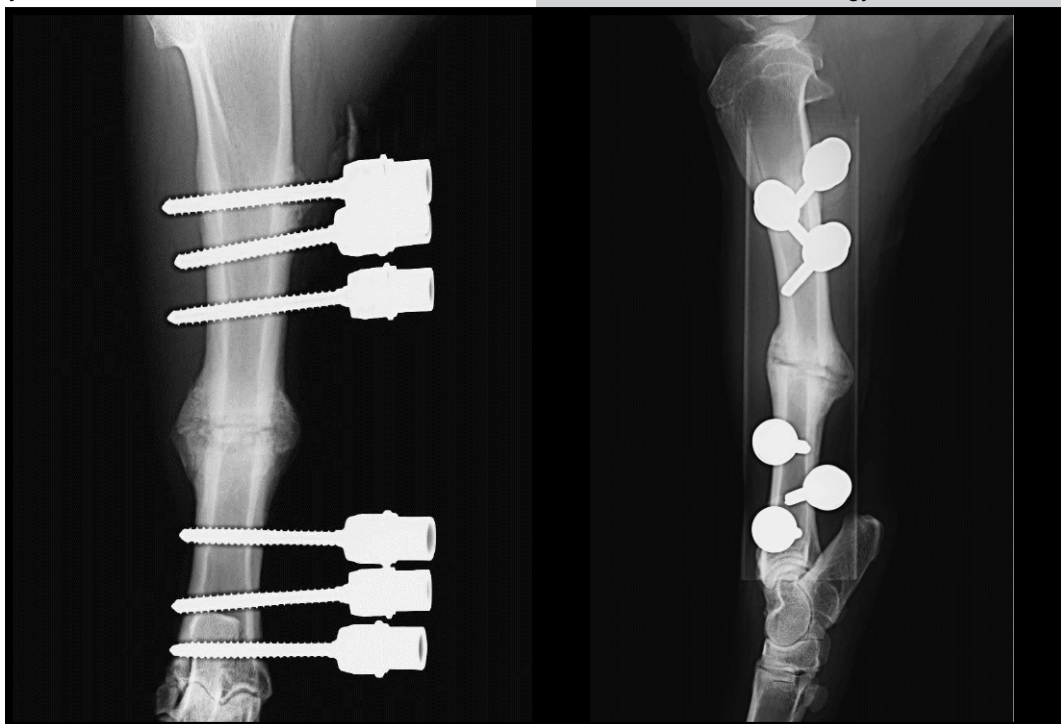
Źródłem autologicznych czynników wzrostu zastosowanych w grupie trzeciej były płytki krwi. Zawierają one między innymi: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu beta (TGF beta), do którego rodziny należą białka morfogenetyczne kości, insulinopodobne czynniki wzrostu I i II, czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), oraz naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). Liczba płytek w koncentracji jest ok. 3 do 8 razy większa niż we krwi obwodowej. To zagęszczenie płytek powoduje zwiększenie stężenia czynników wzrostu i nasilenie procesów naprawczych. Osocze bogatopłytkowe zawiera także leukocyty, dzięki czemu ma ono działanie bakteriostatyczne lub bakterio-bójcze. Osocze bogatopłytkowe przygotowywane było z krwi obwodowej owiec za pomocą gotowego zestawu firmy Regeneris. Po opracowaniu otrzymywany był plastyczny materiał o konsystencji żelu gotowy do podania w szczelinę złamania. Osocze przygotowywane było zgodnie z procedurą zalecaną przez firmę.

Zdjęcia RTG badanych części kośćca owiec wykonywane były w 2, 5 i 8 tygodniu po operacji w dwóch projekcjach (RYS. 3). Zwierzęta podczas wykonywania radiogramów były pod wpływem środków uspokajających (medetomidyna, 0,4 mg/kg). Zdjęcia podobnie jak zabiegi operacyjne wykonywane były w Katedrze Nauk Klinicznych SGGW w Warszawie. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone przez przedawkowanie środków anestetycznych (medetomidyna, 0,4 mg/kg, podana domięśniowo; thiopental, 150 mg/kg, podany dożylnie). Zrost kostny oceniany był w sposób ekspercki na zdjęciach rentgenowskich oraz w pośmiertnym badaniu mikrotomografii komputerowej. Ponadto analizowano zrost na podstawie wyników badań histologicznych.

For the basic operation of the inductor, a special computer program was created, which enabled the setting of the appropriate parameters of the inductor's work (time, frequency, amplitude), the registration of data (force and displacement), as well as data browsing and modification.

The source of the autologous growth factors applied in the third group were the blood cells. Among others, they contain the following: a platelet-derived growth factor (PDGF), a beta transforming growth factor (TGF beta), whose family includes bone morphogenetic proteins, insulin-like growth factors I and II, a fibroblast growth factor (FGF), a vascular endothelial growth factor (VEGF), and an epidermal growth factor (EGF). The number of plates in the concentrate is about 3 to 8 times larger than in the circulatory blood. This plate consolidation causes an increase of the growth factor concentration and an intensification of the repair processes. The platelet-rich plasma also contains leukocytes and thus it has a bacteriostatic and bactericidal effect. The platelet-rich plasma was prepared from the sheep's circulatory blood with the use of a ready-made set by Regeneris. A plastic gel-consistenced material, ready for the application into the bone fracture, was obtained after this preparation. The plasma was prepared according to the procedure recommended by the producer.

The X-ray pictures of the examined sheep's skeleton were taken in the 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week after the surgery, in two projections (FIG. 3). During the radiogram procedure, the animals were under the effect of sedatives (medetomidine, 0.4 mg/kg). The pictures, as well as the surgical procedures, were performed at the Clinical Sciences Department of Warsaw University of Life Sciences. After the completion of the experiment, the animals were put to death by overdosage of anesthetics (medetomidine, 0.4 mg/kg, applied intramuscularly; thiopental, 150 mg/kg, applied intravenously). The bone adhesion was expert-assessed on the basis of the X-ray pictures and in the post-mortem computer microtomography test. Additionally, the bone adhesion was analyzed on the basis of the histology test results.



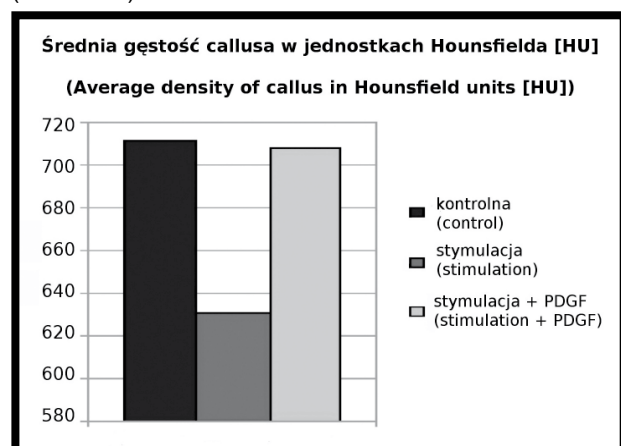
**RYS. 3.** Obraz radiologiczny zespolenia złamania trzonu kości piszczelowej u owcy w 8 tyg. po operacji - widoczny postępujący zrost kostny (projekcja przednio-tylna i boczna).  
**FIG. 3.** Radiological picture: osteosynthesis of the sheep's tibial stem fracture in the 8<sup>th</sup> week after the surgery. Significant bone adhesion visible (front-back and side projection).

## Wyniki

Ze względu na małą liczbę owiec, przeprowadzone badania nie pozwalają na wyciągnięcie kluczowych wniosków. U wszystkich owiec po osteotomii, które wzięły udział w badaniu doszło do zrostu kostnego. Analiza gęstości tworzącej się kostniny prowadzona na podstawie badań obrazowych (mikrotomografi komputerowej), nie wykazała znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami, jednakże gęstości tworzącej się kostniny w grupie ze stymulacją mechaniczną była najniższa. Autorzy pracy dowodzą tym samym, że w przypadku zastosowania elastycznego stabilizatora umożliwiającego mikroruchy poosiowe w szczelinie złamania podczas naturalnego obciążania kończyny, efekt dodatkowej stymulacji mechanicznej jest nie istotny dla poprawienia jakości formującego się zrostu kostnego.

Sam elastyczny stabilizator, (zgodnie z założeniami konstruktorów) umożliwiał korzystne mikroruchy poosiowe, co prowadziło do gojenia złamania z towarzyszącą masywną kostniną wokół szczeliny.

Ocena zdjęć rentgenowskich jak również badania mikrotomograficznego pokazuje, że zastosowanie bogatopłytkowego osocza nie przyspiesza prawidłowo postępującego zrostu kostnego i nie zwiększa gęstości formowanej kostniny (RYS. 4 i 5).



**RYS. 4.** Analiza gęstości kostniny przeprowadzona na podstawie badania mikrotomografii komputerowej.

**FIG. 4.** Analysis of the callus density performed on the basis of the computer microtomography test.

## Dyskusja

Druga połowa XX wieku przyniosła znaczny rozwój technik osteosyntezy. Chociaż pierwsze zespolenie płytkowe opisane zostało już w 1886 roku przez Hansmanna, to największą popularność metoda ta zyskała w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych ubiegłego wieku [6,7]. Wzrost zainteresowania nakostną osteosyntezą metalową związany był z powstaniem pod koniec lat pięćdziesiątych w Szwajcarii grupy AO, która prowadziła szeroko zakrojone badania biomechaniczne i stworzyła bardzo popularne w owych czasach pojęcie „osteosyntezy stabilnej”. Główne założenia metody polegają na anatomicznym nastawieniu odłamów i zespoleniu ich w taki sposób by uniemożliwić jakikolwiek ruch względem siebie [8]. Od początku propagowania tej metody obserwowano wiele zjawisk niekorzystnych wynikających ze:

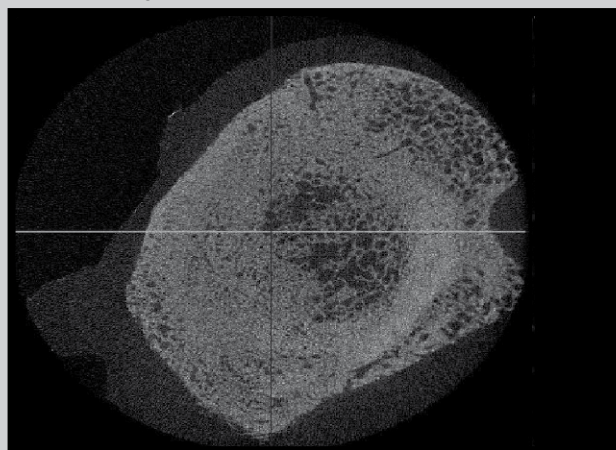
- stosowania rozległego dostępu operacyjnego z odszkieletowaniem odłamów, które łączyło się z koniecznością ułożenia płytki bezpośrednio na powierzchni kości, co powodowało uszkodzenie ukrwienia odokostnowego;

## Results

Due to the small number of sheep, the performed tests do not allow to draw the key conclusions. By all of the tested sheep, after the osteotomy, bone adhesion was observed. The analysis of the thickness of the forming callus, performed on the basis of the imaging examinations (computer microtomography), did not exhibit significant differences between the tested groups; however, the thicknesses of the forming callus in the group involving mechanical stimulation was the lowest. In this way, the authors prove that, in the case of the application of an elastic stabilizer, which enables axial micromovements in the bone fracture during the natural bone load, the effect of an additional mechanical stimulation is insignificant for the improvement of the quality of the forming bone adhesion.

The elastic stabilizer itself (in accordance with the designer's recommendations) enabled advantageous axial micromovements, which led to the healing of the fracture, with the accompanying massive callus around the gap.

The assessment of the X-ray pictures, as well as of the microtomography test, shows that the application of the platelet-rich plasma does not properly accelerate the progressing bone adhesion and does not increase the density of the forming callus (FIG. 4 and 5).



**RYS. 5.** Zdjęcia z pośmiertnej mikrotomografii komputerowej szczeliny złamania.

**FIG. 5.** Post-mortem computer microtomography picture of the fracture gap.

## Discussion

The second half of the 20<sup>th</sup> century brought a significant progress in the osteosynthesis technologies. Although the first plate synthesis was described already in 1886 by Hansmann, this method gained its biggest popularity in the 60s and 70s of the previous century [6,7]. The increase of the interest in metal bone osteosynthesis was connected with the creation of the AO group, at the end of the 50s, in Switzerland, which conducted wide-range biomechanical research and created the, very popular at that time, concept of “stable osteosynthesis”. The main assumptions of this method consist in an anatomical adjustment of the bone fractions and such their synthesis so as to prevent them from any movement in relation to each other [8]. From the beginning of this method's propagation, many disadvantageous phenomena have been observed, which result from the following:

- The application of extensive surgical access with the deskeletonizing of the fractions, connected with the necessity of placing the plate directly on the bone surface, which caused damage in the periosteal blood flow;



- wprowadzania masywnych metalowych wszczepów wewnętrznych, które zwiększały ryzyko powstania infekcji i odczynów kostnych pod postacią metalozu;

- pojawienia się niefizjologicznych sił skierowanych głównie poprzecznie do długiej osi kości, powodujących dezorientację kierunkową komórek kostnych, osteolizę wokół wkrętów kostnych i atrofię kości pod płytą;

Podstawową jednak wadą płytkowej osteosyntezy na kostnej wydaje się być uzyskana w trakcie zabiegu „cisza mechaniczna” w strefie gojenia złamania, hamująca naturalne procesy biologiczne uruchamiane przez organizm po przerwaniu ciągłości tkanki kostnej.

Badania doświadczalne przeprowadzone przez Kotwickiego w 1990 roku na owcach pozwoliły na porównanie zrostu kości piszczelowej (po uprzednio wykonanej poprzecznej osteotomii), powstającego w wyniku zespolenia dociskowego stabilizatora ZESPOL i płytką ACP (Autokompressionplatte) [9]. Mimo, iż uzyskano zrost kostny w obu typach zespolenia w tym samym czasie, to różnił się on obrazem radiologicznym, wyglądem mikro i makroskopowym, oraz co najważniejsze wytrzymałością mechaniczną powstałej blizny kostnej. Sztywne zespolenie dociskowe ACP prowadziło do powstania słabego mechanicznie zrostu kostnego, bez towarzyszącego zwykle zespoleniom elastycznym wykształcenia kostniny mankietowej. Ponadto stwierdzono tworzące się pod płytą obszary martwicy kostnej i niepokojące zwężenie jamy szpikowej. Badania wytrzymałościowe na zginanie zrostu kostnego powstałego w omawianych przypadkach pokazały, że kość leczona płytą ACP ulegała przełamaniu linijnemu w miejscu uprzedniej osteotomii, a kość leczona elastycznym stabilizatorem płytkowym łamała się poza strefą zrostu [10].

Powszechnie wiadomo, że znacznie korzystniejsze od połączeń „sztywnych”, zapewniających tzw. „ciszę mechaniczną”, są zespolenia umożliwiające powstanie naprężeniemiennych działających sił dociskowych na szparę złamania - zespolenia „elastyczne”.

W piśmiennictwie polskim powikłania osteosyntezy płytkowej wahają się od 7-43%, w zagranicznym od 4-15% [11-13]. Niekorzystne zjawiska związane z wewnętrznym sztywnym zespoleniem kości zwiększyło zainteresowanie chirurgów stabilizatorami zewnętrznymi, zapewniającymi elastyczność zespolenia.

Od czasu kiedy Malgaigne w 1847 roku pierwszy użył elementarnej budowy stabilizatora zewnętrznego, urządzenia te przeszły wiele przemian. Zbudowano wiele modeli aparatów do stabilizacji zewnętrznej, od najprostszych kłamrowych, poprzez ramowe, do złożonych aparatów wielopłaszczyznowych. Większość aparatów do stabilizacji zewnętrznej, zapewnia elastyczność zespolenia i pozwala na przeniesienie obciążeń zarówno przez kość jak i przez elementy urządzenia. Wysoką skuteczność w ortopedii i traumatologii narządu ruchu wykazują stabilizatory ramowe, które dzięki swojej wielopłaszczyznowej konstrukcji eliminują powstanie między odłamami niekorzystnych z punktu widzenia patofizjologii zrostu, sił zginających [14]. Wadą konstrukcji ramowych jest jednak ich duża waga i rozmiar, co prowadzi do braku akceptacji ze strony pacjenta. Przy stosowanych powszechnie, kłamrowych metalowych stabilizatorach zewnętrznym, myślą przewodnią jest zbliżenie elastyczności stabilizatora do elastyczności kości, tak aby konstrukcja pozwalała na korzystne z punktu widzenia zrostu odkształcenia kości. Elastyczność stabilizatora zależy od właściwości jego elementów: nośnika w postaci np.: płytki oraz wkrętów. Zwiększenie elastyczności obecnie stosowanych konstrukcji płytkowych można wstępnie uzyskać przez zwiększenie odległości nośnika od kości, zwiększenie rozstawu nośnika lub zmniejszenie liczby wprowadzonych wkrętów.

- The introduction of massive metal implants, which increased the risk of infection and bone reactions in the form of metallosis;

- The occurrence of non-physiological forces directed mainly crosswise to the long axis of the bone, causing directional disorientation of the bone cells, osteolysis around the bone screws and atrophy of the bone underneath the plate.

However, the basic flaw of the plate bone osteosynthesis seems to be the, observed during the procedure, „mechanical silence” in the fracture healing area, which hinders the natural biological processes activated by the body after the fracture of the bone tissue.

The experimental tests performed on sheep by Kotwicki in 1990 provided a possibility to compare the tibial bone adhesion (after the preceding transverse osteotomy), formed as a result of the clamp synthesis with the ZESPOL stabilizer and an ACP plate (Autokompressionplatte) [9]. Although the bone adhesion was obtained in both types of synthesis at the same time, it differed in the radiological image, the micro- and macroscopic appearance and, most importantly, the mechanical strength of the formed bone scar. The rigid ACP clamp synthesis led to the formation of mechanically weak bone adhesion, without the, usually accompanying the elastic syntheses, formation of cuff callus. What is more, areas of bone necrosis were identified underneath the plate, as well as an alarming narrowing of the marrow cavity. The bending strength tests of the bone adhesion formed in the discussed cases showed that the bone healed with the use of an ACP plate underwent a linear fracture in the area of the preceding osteotomy and the bone healed with an elastic plate stabilizer fractured beyond the adhesion area [10].

It is commonly known that much more advantageous than the “rigid” connections, providing the, so called, “mechanical silence”, are those syntheses which enable the occurrence of alternately operating feed forces on the fracture gap, that is the “elastic” syntheses.

In the Polish literature, the complications of plate osteosynthesis vary from 7% to 43%, and in the foreign sources – from 4% to 15% [11-13]. The disadvantageous phenomena connected with the internal rigid bone synthesis has increased the surgeons’ interest in external stabilizers providing the synthesis with elasticity.

Since the time when Malgaigne was the first to use the elemental structure of an external stabilizer in 1847, those devices have undergone many transformations. Numerous models of external stabilization apparatus have been constructed, from the simplest, clamp toe ones, through the frame ones, to the multilayer ones. The majority of the external stabilization apparatus provide an elastic synthesis and allows for a transfer of loads from the bone to the elements of the device. A high effectiveness in orthopedics and motor organ traumatology are exhibited by the frame stabilizers, whose multilayer construction eliminate the occurrence of patophysiological disadvantageous bending forces between the fractions [14]. The flaw of the frame constructions is, however, their heavy weight and the large size, which leads to the lack of acceptance from the part of the patient. In the case of the commonly used metal external clamp stabilizers, the keynote is to make the stabilizer’s elasticity close to that of the bone, in such a way so as the construction allows for a bone deformation, advantageous from the point of view of the adhesion. The elasticity of the stabilizer depends on the properties of its elements: the carrier, e.g. in the form of a plate, and the screws. An increase in the elasticity of the currently applied plate constructions can be preliminarily obtained through an increase of the distance between the carrier and the bone, an increase of the carrier’s spacing or a decrease in the number of the introduced screws.



Obecnie stosowane stabilizatory płytkowe nie pozwalają jednak na kontrolowany dobór sztywności zespolenia w chwili rozpoczęcia leczenia oraz uniemożliwiają regulację sztywności konstrukcji w miarę postępu gojenia.

Osiągnięcie izoelastycznego zespolenia jest bardzo trudne. Podstawowym problemem jest określenie właściwości biomechanicznych tkanki kostnej oraz parametrów powstającej w trakcie leczenia kostniny. W miarę postępu gojenia się kości budowa stabilizatora powinna umożliwić przejmowanie przez kość różnokierunkowych obciążeń, dlatego jego elastyczność powinna się zmniejszać.

Poszukiwania nowego systemu stabilizującego złamanie doprowadziły do opracowania w Klinice Ortopedii i Traumatologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie stabilizatora wykorzystującego płytki zbudowane z kompozytu węgiel-węglowica epoksydowa. Wybór kompozytowych materiałów węglowych do budowy nośnika w nowatorskim stabilizatorze Carboelastofix jest wynikiem wieloletnich badań mechanicznych, prowadzonych nad wykorzystaniem kompozytowych materiałów węglowych w chirurgii narządu ruchu [15].

Metalowe implanty powszechnie używane w ortopedii i traumatologii, oprócz zalet, jak wysoka wytrzymałość i twardość, posiadają jednak podstawową wadę w postaci nadmiernej sztywności wynikającej ze zbyt dużej różnicy między modułem Young'a metalu a kości [16]. Najważniejsze właściwości włókien węglowych w porównaniu z innymi materiałami to bardzo niski ciężar przy zachowanej wytrzymałości mechanicznej, wysoka wytrzymałość na zmęczenie i kruche pękanie oraz duża giętkość.

Dobór charakterystyki nowatorskiego stabilizatora węglowego, określonej na podstawie badań eksperymentalnych, wartościami sztywności wzdłużnej i skrętnej, uwzględnił rozkład sił przenoszonych przez układ stabilizatora i dopuszczalnych obciążeń kształtującego się zrostu kostnego. Opracowano tabele umożliwiające indywidualny dobór sztywności zespolenia w zależności od kąta szczeliny złamania i wagi pacjenta.

Odrębnym problemem jest zmniejszanie sztywności zespolenia w miarę zwiększania przejmowanych obciążeń przez tworzącą się bliźną kostną. Konstrukcja zaprojektowanego stabilizatora Carboelastofix umożliwia dynamizację zespolenia, przez odjęcie jednej z płytek.

Przeprowadzone próby kliniczne, wykazały przydatność kliniczną systemu Carboelastofix w gojeniu trzonów kości piszczelowej, a uzyskane wyniki leczenia są porównywalne z wynikami uzyskiwanymi przy użyciu innych, powszechnie stosowanych w praktyce klinicznej stabilizatorów płytkowych [17].

W przedstawionym badaniu na owcach kontrolowanie obciążania operowanej kończyny przez owce z przyczyn oczywistych jest trudne, stąd podczas eksperymentu nie zdecydowano się na dynamizację zespolenia w trakcie gojenia miejsca po osteotomii.

Oddzielnego komentarza wymaga próba wprowadzenia do analizy zrostu kostnego metod ilościowych. Rutynowo w praktyce klinicznej przebieg zrostu kostnego ocenia się wykorzystując metody eksperckie, takie jak badanie kliniczne i ocena badań obrazowych. Żadna z wymienionych metod badania nie pozwala na zobiektywizowanie oceny i przedstawienie wyniku w formie parametrycznej, przydatnej do analiz statystycznych oraz do ustalenia wiarygodnej prognozy, co do wyników leczenia. Podjęta próba analizy gęstości tworzącej się kostniny wokół złamania w mikrotomografii komputerowej jest jedynie próbą ilościowego pomiaru jakości zrostu wspomagającego badania eksperckie.

The currently applied plate stabilizers do not, however, allow for a controlled selection of the synthesis's rigidity at the beginning of the healing procedure and hinder the control of the construction's rigidity as the healing proceeds.

The achievement of an isoelastic synthesis is very difficult. The basic problem is the determination of the biomechanical properties of the bone tissue and the parameters of the callus formed during the healing process. As the bone recovery proceeds, the structure of the stabilizer should make it possible for the bone to take over multidirectional loads and thus the elasticity should decrease.

The search for a new fracture stabilization system has led the Chair and Department of Orthopedics and Traumatology of Locomotor System of Medical University of Warsaw to elaborate a stabilizer utilizing plates constructed of a carbon-epoxy resin alloy. The selection of carbon composite materials for the construction of the carrier in the innovative Carboelastofix stabilizer is a result of many years of mechanical studies performed on the application of carbon composite materials in the motor organ surgery [15].

The metal implants commonly used in orthopedics and traumatology, beside their merits, such as high strength and hardness, exhibit also a basic flaw, which is the excessive rigidity resulting from a too big difference between the metal's and bone's Young modulus [16]. The most important properties of carbon fibres, as compared to other materials, is their very light weight, with the maintained mechanical strength, the high fatigue and brittle fracture strength, as well as the high flexibility.

The selection of the characteristics of the innovative carbon stabilizer, described on the basis of the experimental tests with the longitudinal and torsional rigidity, included the distribution of the forces transferred by the stabilizer's system and the acceptable loads of the forming bone adhesion. Tables providing for an individual selection of the synthesis's rigidity have been elaborated, depending on the angle of the fracture gap and the patient's weight.

A separate problem is the reduction of the synthesis's rigidity as the loads accepted by the forming bone scar increase. The construction design of the Carboelastofix stabilizer enables a dynamization of the synthesis through cutting off one of the plates.

The performed clinical tests showed a clinical usefulness of the Carboelastofix system in the healing of tibial stems, and the obtained treatment results are comparable to those obtained with the use of other, commonly applied in clinical practice, plate stabilizers [17].

In the presented experiments on sheep, the control of the load of the operated limb by the sheep is, for the obvious reasons, difficult, and so, the experiment did not involve dynamic syntheses during the healing of the area after osteotomy.

A separate comment must be made on the attempt at introducing quantitative methods to the bone adhesion analyses. The clinical practice routine includes the assessment of the bone adhesion with the use of expertise methods, such as the clinical test and the evaluation of the imaging examinations. Neither of the mentioned test methods allows for an objectification of the assessment and the presentation of the result in the parametrical form, which is useful in the statistical analyses and in the establishment of a reliable prognosis on the effect of the treatment. The attempt at an analysis of the thickness of the callus forming around the fracture in computer microtomography is merely an attempt at a quantitative measurement of the adhesion quality, supporting the expertise tests.

## Wnioski

1. Stabilizator elastyczny Carboelastofix nadaje się do leczenia złamań trzonów kości piszczelowych u owiec.

2. Dodatkowa stymulacja mechaniczna zrostu kostnego nie poprawia warunków gojenia w przypadku zastosowania elastycznego stabilizatora Carboelastofix.

3. Zastosowanie bogatopłytkowego osocza nie zmienia w sposób znaczący prawidłowo postępującego procesu zrostu kostnego.

## Podziękowania

*Projekt finansowany z funduszy KBN numer grantu N40303332/1996.*

*Zgoda Komisji Bioetycznej IKE nr 23/2010 z dnia 25.02.2010.*

## Conclusions

1. The elastic stabilizer Carboelastofix is appropriate for the treatment of the sheep's tibial stem fractures.

2. An additional mechanical stimulation of the bone adhesion does not improve the healing conditions in the case of applying the elastic Carboelastofix stabilizer.

3. The use of a platelet-rich plasma does not significantly change the properly proceeding bone adhesion.

## Acknowledgements

*The project was funded by KBN (State Committee for Scientific Research) – grant number: N40303332/1996.*

*Approved by the Bioethics Committee IKE - number 23/2010, dated 25.02.2010.*

## Piśmiennictwo

[1] Goodship A., Lawes T., Rubin C.: Low magnitude high frequency mechanical signals accelerate and augment endochondral bone repair. *J Orth Res* 27 (2009) 922-930.

[2] Wolf S., Augat P., Eckert-Hubner K., Laule A., Krischak G., Claes L.E.: Effects of high-frequency, low magnitude mechanical stimulus on bone healing. *Clinical Orthopaedic & Related Research* 385 (2001) 192-198.

[3] Augat P., Merk J., Wolf S., Claes L.: Mechanical stimulation by external application of cyclic tensile strains does not effectively enhances bone healing. *Journal of Orthopaedic Trauma* 15,1 (2001) 54-60.

[4] Granowski R.: Postępy osteosyntezy. *Chir. Narz. Ruchu i Ortop. Polska* 59, supl. 1. (1994) 51-54.

[5] Ambroziak M.: Leczenie złamań trzonów kości piszczelowych stabilizatorem węglowym Carboelastofix. Praca doktorska/PhD thesis, AM, Warszawa 2004.

[6] Olerud S., Karlstrom G.: Tibial fractures treated by AO compression Osteosynthesis. Experience from a five-years material. *Acta Orthop. Scand.* 140 (1972) 1-9.

[7] Granowski R.: Analiza sił płytkowego dociskowego zespolenia odłamów kości długiej w badaniu modelowym. Praca doktorska/PhD thesis, AM, Warszawa, 1980.

[8] Rommens P., Schmit-Neuerburg K. P.: Ten years of experience with the operative management of tibial shaft fractures. *Journal of Traum.* 27, 8 (1987) 917-927.

[9] Kotwicki A.: Morfologia zrostu kostnego w osteosyntezie kompresyjnej metodą AO i Zespol (badania doświadczalne). Rozprawa doktorska/PhD thesis, Wrocław, 1991.

## References

[10] Bielawski J.: Wpływ sposobu stabilizacji na morfologię zrostu kości. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska* 59, 1 (1994).

[11] Bielawski J.: Refleksje nad operacyjnym leczeniem złamań zamkniętych. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska* 68, 5 (2003) 341-345.

[12] Skoog A., Soderqvist A., Tornkvist H., Ponzer S.: One-year outcome after tibial shaft fractures: results of a prospective fracture registry. *J Orthop Trauma* 15, 3 (2001) 210-215.

[13] Coles C.P., Gross M.: Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. *Can J Surg* Aug 43, 4 (2000) 256-262.

[14] Macias J.: Ocena kliniczna zastosowania aparatu Ilizarowa w leczeniu nierówności kończyn. Praca doktorska, A.M., Warszawa (1994).

[15] Kuś W.: Badania doświadczalne nad zastosowaniem włókien węglowych w operacjach odtwórczych narządu ruchu. Wydawnictwo A.M. w Warszawie, Warszawa (1986).

[16] Marczyński W.: Leczenie zaburzeń zrostu i ubytków tkanki kostnej. Warszawa Belna (1995).

[17] Ambroziak M., Górecki A., Purski K., Zgoda M., Kawalec K.: Stabilizator węglowy Carboelastofix w leczeniu złamań trzonów kości piszczelowych. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska* 72, 2 (2007) 99-104.

# BADANIA BIOAKTYWNOŚCI I CYTOTOKSYCZNOŚCI IN VITRO BIOSZKIEŁ Z UKŁADU $\text{SiO}_2$ -CaO WYTWORZONYCH METODĄ ZOL-ŻEL Z ZASTOSOWANIEM SILANÓW

LIDIA CIOŁEK<sup>1\*</sup>, JOANNA KARAS<sup>1</sup>, ANDRZEJ OLSZYNA<sup>1</sup>,  
EWA ZACZYŃSKA<sup>2</sup>, ANNA CZARNY<sup>2</sup>, BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH,  
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA

<sup>2</sup> INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ,  
POLSKA AKADEMIA NAUK,  
UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCŁAW

<sup>3</sup> AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU,  
UL. PASTEURA 1, 50-361 WROCŁAW

\* E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

## Streszczenie

Celem badań była ocena bioaktywności i cytotoxiczności in vitro bioszkieł o składzie chemicznym  $\text{SiO}_2$  70% mas. i CaO 30% mas., wytworzonych metodą zol-żel. Podczas syntezy do wprowadzenia  $\text{SiO}_2$  zastosowano TEOS lub jego mieszaniny z winylo(trimetoksy)silanem (VS) lub trimetoksy-silometakrylanem propylowym (MPS). Bioaktywność oceniono z zastosowaniem SEM przez analizę obrazów morfologii powierzchni bioszkieł po kontakcie z roztworem symulującym osocze (SBF). Natomiast ocenę działania cytotoxicznego wykonano metodą bezpośrednią i pośrednią zgodnie z PN-EN 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoxiczności: metody in vitro” po kontakcie z komórkami fibroblastopodobnymi L929. Wyniki przeprowadzonych badań bioaktywności pozwalają stwierdzić, że otrzymane bioszkieła są bioaktywne w kontakcie z roztworem SBF, na co wskazuje obecność na powierzchni bioszkieł sferycznych struktur typowych dla morfologii apatytu. Natomiast wyniki cytotoxiczności in vitro wykonane metodą pośrednią dla wszystkich wytworzonych bioszkieł wskazują na brak efektu toksycznego na komórki L929.

**Słowa kluczowe:** bioszkieło, metoda zol-żel, bioaktywność, cytotoxiczność

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 21-26]

## Wprowadzenie

Bioaktywne szkła i materiały szkło-ceramiczne stosowane są w chirurgii do wypełniania ubytków kostnych [1,2]. Dzięki reakcjom fizykochemicznym zachodzącym na powierzchni bioaktywnego materiału [3], powstaje warstwa hydroksyapatytu węglanowego o składzie chemicznym bliskim naturalnej kości. Warstwa tego hydroksyapatytu zapewnia silne wiązanie z żywymi tkankami, zarówno z tkanką kostną jak i tkankami miękkimi, co zapobiega powstawaniu warstwy tkanki włóknistej i izolacji wszczepionego materiału. Uważa się, że zastosowanie niektórych silanów jako reagentów do syntezy bioszkieł metodą zol-żel, może zwiększać bioaktywność otrzymanego biomateriału [4].

# STUDY ON BIOACTIVITY AND IN VITRO CYTOTOXICITY OF BIOGLASSES FROM THE $\text{SiO}_2$ -CaO SYSTEM OBTAINED BY THE SOL-GEL METHOD USING SILANES

LIDIA CIOŁEK<sup>1\*</sup>, JOANNA KARAS<sup>1</sup>, ANDRZEJ OLSZYNA<sup>1</sup>,  
EWA ZACZYŃSKA<sup>2</sup>, ANNA CZARNY<sup>2</sup>, BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS,  
9 POSTĘPU STR., 02-676 WARSZAWA, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
12 RUDOLFA WEIGLA STR., 53-114 WROCŁAW, POLAND

<sup>3</sup> WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY,  
1 PASTEUR STR., 50-361 WROCŁAW, POLAND

\* E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the bioactivity and in vitro cytotoxicity of bioglass with chemical composition 70 wt%  $\text{SiO}_2$  and 30 wt% CaO obtained by the sol-gel method. During the synthesis TEOS or mixture thereof with vinyltriethoxysilane (VS) or (trimetoxysilyl)propyl methacrylate (MPS) were used to introduce  $\text{SiO}_2$  content. Bioactivity was assessed by SEM observations of bioglass surface morphology after contact with a simulated body fluid (SBF). The evaluation of cytotoxicity was performed according to PN-EN 10993-5 “Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods” after contact with fibroblast like cells L929. Results of the study of bioactivity allow to conclude that the obtained bioglasses are bioactive in contact with SBF solution, as indicated by the presence on the surface of spherical structures typical for morphology of the apatite. Moreover the results of indirect method in vitro cytotoxicity tests involving all produced bioglasses revealed no toxic effect on L929 cells.

**Keywords:** bioglass, sol-gel method, bioactivity, cytotoxicity

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 21-26]

## Introduction

Bioactive glasses and glass-ceramic materials are used in surgery for filling bone defects [1,2]. Due to physical and chemical reactions occurring on the surface of bioactive material [3], a carbonate hydroxyapatite layer is formed, having chemical composition similar to natural bone. The layer of this hydroxyapatite provides a strong bond with living tissues, bone as well as soft tissue. This bonding prevents the formation of fibrous tissue and isolation of the implanted material. It is believed that the use of certain silanes as reagents for the synthesis of bioglasses according to the sol-gel method, can increase the bioactivity of the resulting biomaterial [4].



Celem przeprowadzonych badań było określenie bioaktywności i cytotoksyczności bioszkieł z układu  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ . Bioaktywność oceniono z zastosowaniem SEM, przez analizę obrazów morfologii powierzchni po kontakcie z roztworem symulującym osocze (SBF). Natomiast ocenę działania cytotoksycznego wykonano zgodnie z PN-EN 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności: metody in vitro” po kontakcie z komórkami fibroblastopodobnymi L929.

## Materiały i metody badań

Bioszko o symbolu P-0 zawierające 70% mas.  $\text{SiO}_2$  i 30% mas.  $\text{CaO}$ , stanowiące materiał odniesienia wytworzono używając jako zasadniczych substratów tetraetoksylan (TEOS) i azotan wapnia czterowodny. Natomiast w bioszkiełach P0-VS i P0-MPS, posiadających analogiczny skład jak P-0, wprowadzono 5% mas.  $\text{SiO}_2$  innymi silanami. W przypadku bioszkieła P0-VS zastosowano winylo(trimetoksy)silan (VS), a przypadku P0-MPS inny silan, a mianowicie trimetoksy-sililometakrylan propylowy (MPS). Proces wytworzenia bioszkieł metodą zol-żel przeprowadzono uwzględniając metodykę [5].

Po obróbce termicznej żelu w  $600^\circ\text{C}$  przez 6 h uzyskano gruboziarniste proszki, które rozdrobniono następnie w młynku mechanicznym do drobnoziarnistych proszków.

Dla określenia bioaktywności in vitro wytworzonych bioszkieł przeprowadzono ocenę oddziaływania z roztworem symulującym płyn fizjologiczny (SBF). Z otrzymanych proszków uformowano pastylki o wymiarach  $\phi = 7$  mm i  $h = 2$  mm przy użyciu prasy hydraulicznej PYTE, stosując prasowanie osiowe o nacisku 5 kN. Następnie w szczelnie zamkniętych naczyniach zawierających 65 ml roztworu SBF umieszczono po 5 pastylek każdego rodzaju bioszkieła. Inkubację bioszkieł w SBF prowadzono przez 28 dni w  $37^\circ\text{C}$ . Próbkę do badań pobierano po 7 i 28 dniach, przemywano wodą destylowaną i suszono. Morfologię powierzchni tak otrzymanych bioszkieł przed i po kontakcie z SBF badano z użyciem wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego Nova NanoSEM 200 firmy FEI. Pomiarów ramanowskie zostały wykonane za pomocą spektrometru Nicolet 6700 z modułem NXR FT - Raman Module.

Badanie działania cytotoksycznego wykonano metodą bezpośredniego kontaktu przy stężeniu bioszkieł w postaci proszków 0,25 mg/ml oraz metodą pośrednią czyli poprzez badanie eluatów tych materiałów z jednowarstwową hodowlą komórek fibroblastopodobnych L929. Parametrami do oceny stopnia cytotoksyczności była morfologia komórek oraz ich żywotność. W teście na wyciągach oceniano zmiany morfologiczne komórek wywołane przez wyekstrahowane substancje z badanych biomateriałów.

Komórki otrzymano z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy, a hodowlę prowadzono w płynie Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej przez 30 min w  $56^\circ\text{C}$  surowicy cielęcej oraz 100 U/ml penicyliny, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy, w  $37^\circ\text{C}$  w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Komórki przeszczepiano stosując roztwór 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

W badaniu z bezpośrednim kontaktem komórek z bioszkiełami na płytce 24-dółkowej firmy Costar zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości  $1 \times 10^5/\text{ml}$  i inkubowano 24 h w  $37^\circ\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Po tym czasie płyn nad komórkę usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek zalano płynem hodowlanym w ilości 1 ml z dodatkiem 2% surowicy cielęcej. Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów i inkubowano przez 24 h oraz 48 h w  $37^\circ\text{C}$  i atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ .

The aim of this study was to determine the bioactivity and cytotoxicity of bioglasses from the  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$  system. Bioactivity was assessed using SEM, through analysis of surface morphology after contact with a simulated body fluid (SBF). On the other hand the assessment of cytotoxicity was performed according to PN-EN 10993-5 “Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods” after contact with fibroblast like cells L929.

## Materials and Methods

Bioglass P-0 containing 70 wt%  $\text{SiO}_2$  and 30 wt%  $\text{CaO}$  being a reference material was produced using as basic substrates tetraethoxysilane (TEOS) and calcium nitrate tetrahydrate. Bioglasses P0-VS and P0-MPS with the same composition as P-0 were obtained introducing 5 wt% of  $\text{SiO}_2$  content by other silanes. In the case of bioglass P0-VS vinyltriethoxysilane was used, and in the case of P0-MPS different silane, namely (trimetoxysilyl)propyl methacrylate. The process of preparing bioglasses by sol-gel method was carried out respecting the earlier reports [5].

After heat treatment of gels at  $600^\circ\text{C}$  for 6 h coarse powders were obtained, which were ground in a mechanical mortar, in order to obtain fine powders.

To determine in vitro bioactivity of produced bioglasses, an impact assessment was carried out with a solution of simulated body fluid (SBF). From the obtained powders,  $\phi = 7$  mm and  $h = 2$  mm pellets were formed using a hydraulic press PYTE, applying axial pressure 5 kN. Then, in a tightly closed vessel containing 65 ml of SBF solution was placed, five pellets of each type bioglass. Immersion of bioglasses in SBF was carried out for 28 days at  $37^\circ\text{C}$ . Test specimens were taken after 7 and 28 days, washed with distilled water and dried. The surface morphology of bioglasses obtained in such a way before and after contact with SBF were tested in scanning electron microscope NanoSEM 200 made by FEI. Raman measurements were performed using a Nicolet 6700 spectrometer with NXR FT - Raman Module.

The cytotoxicity test was performed by direct contact with concentration of bioglass powders of 0.25 mg/ml and by indirect method testing of extracts of these materials with monolayer growing of fibroblast like cells L929. Parameters to assess the degree of cytotoxicity were morphology and cell viability. In the indirect test method, cell morphological changes induced by extracted substances from tested biomaterials were evaluated.

Cells were obtained from subcutaneous fat of a mouse, and breeding was carried out in Eagle's liquid supplemented with 10% inactivated for 30 min at  $56^\circ\text{C}$  calf serum and 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin and 2 mM/ml L-glutamine, at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were transplanted using a solution of 0.05% trypsin with 0.02 % EDTA in PBS, pH 7.2.

In the test utilising direct contact of cells with bioglasses on the 24-well Costar plate, an L929 cell culture was established, with density of  $1 \times 10^5/\text{ml}$ , which was incubated for 24 h at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . After this time, the fluid above the cells was removed, and the cell monolayer was covered with 1 ml of liquid culture with 2% calf serum. On the cell culture prepared in this manner, samples of the tested materials were placed and incubated for 24 h and 48 h at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ .

Żywotność komórek oceniano metodą barwienia błękitem trypanu. W tym celu zawieszinę komórek L929 i badanego materiału pobierano w ilości 100  $\mu\text{l}$  do probówki Eppendorf, następnie dodawano 100  $\mu\text{l}$  0,4% błękitu trypanu i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie kroplę płynu наносzono na kamerę Burkera i pod mikroskopem świetlnym zliczano liczbę żywych komórek. Komórki martwe wybarwiły się na granatowo, co jest spowodowane wnikiem barwnika do wnętrza komórki poprzez uszkodzoną błonę komórkową. Żywe komórki L929 pozostały niezabarwione.

W metodzie pośredniej do przygotowania wyciągów użyto bioszkieł w postaci proszku, które zalano płynem hodowlanym Eagle'a bez surowicy cielęcej (0%), a z dodatkiem 100 U/ml penicyliny, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy. Tak przygotowane próby o stężeniu 1,0 mg badanych bioszkieł na 1,0 ml płynu inkubowano przez 24 godziny w 37°C w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Po tym czasie wyciągi zebrano do jałowych probówek i wykonano badanie cytotoksyczności.

Na płytce 24-dobkowej zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości  $1 \times 10^5/\text{ml}$  i inkubowano 24 h w 37°C, w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Po tym czasie płyn nad komórek usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek L929 zalano po 1000  $\mu\text{l}$  płynem nad zawiesziny proszków i inkubowano przez 24 h w 37°C i atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Dalsze postępowanie jak wyżej opisano przy ocenie żywotności komórek.

Ocenę każdego biomateriału wykonano w trzech powtórzeniach i przedstawiono reprezentatywne wyniki badań.

## Wyniki i dyskusja

Na powierzchni wszystkich badanych bioszkieł po zanurzeniu w SBF po 7 dniach (RYS. 1) jak i po 28 dniach obserwowano sferyczne struktury, które według doniesień literaturowych [5] są typowe dla morfologii apatytu uzyskiwanego w sposób biomimetyczny, a których obecności nie stwierdza się na powierzchni bioszkieł przed inkubacją w SBF.

Wyniki analizy FTIR powierzchni bioszkieł przed kontaktem z SBF oraz po 28 dniach inkubacji (RYS. 2 i 3) potwierdzają obecność hydroksyapatytu na powierzchni bioszkieł inkubowanych w SBF. W widmach próbek P0-MPS-SBF oraz P0-VS-SBF widoczne jest pasmo przy 960  $\text{cm}^{-1}$  charakterystyczne dla hydroksyapatytu (HA), które przypisuje się symetrycznym drganiom rozciągającym grupy  $\text{PO}_4^{3-}$  [6,7]. W widmach tych próbek występują także słabe pasma przy 430  $\text{cm}^{-1}$  pochodzące od drgań zginających  $\text{PO}_4^{3-}$ . To świadczy o tym, że na próbkach P0-VS-SBF i P0-MPS-SBF pojawiły się struktury hydroksyapatytu po kontakcie z roztworem SBF. Pasm charakterystycznych dla hydroksyapatytu nie ma w widmach próbek P0-VS i P0-MPS. Intensywność drgań charakterystycznych jest większa w przypadku próbki P0-MPS-SBF co wskazuje na większą ilość hydroksyapatytu na powierzchni próbki z dodatkiem MPS.

Wyniki badań in vitro cytotoksyczności wg kryteriów normy ISO 10993-5 wykonanych metodą bezpośrednią dla stężenia 0,25 mg/ml po 24 h i 48 h inkubacji (TABELA 1) wskazują na nieznaczną cytotoksyczność bioszkieł P0-MPS i P0-VS oraz łagodną bioszkieła P-0. Natomiast wyniki uzyskane z badań metodą pośrednią (TABELA 2) wskazują na brak efektu cytotoksycznego. Bioszkieło P0-MPS, w którym zastosowano trimetoksysiilometakrylan propyloowy wykazało niższy udział martwych komórek w hodowli w porównaniu do bioszkieła P0-VS, do którego wytworzenia użyto winylotriethoxysilanu. Najwyższy udział martwych komórek po 24 h i 48 h kontaktu zanotowano dla bioszkieła P-0, odpowiednio 2% i 5%.

Cell viability was assessed by trypan blue staining. For this purpose, suspension of L929 cells and the tested material was collected in quantity of 100  $\mu\text{l}$  to Eppendorf tubes, then 100  $\mu\text{l}$  of 0.4% trypan blue was added and incubated for 15 min. at room temperature. After this time, a drop of the liquid was applied on Burkera camera under a light microscope and the number of living cells was counted. Dead cells changed colour to navy, which is caused by the penetration of the dye into the cell through the damaged cell membrane. Viable L929 cells remained not colouring.

In the case of the indirect method obtained bioglasses in powder form were covered with Eagle culture medium without calf serum (0%), with the addition of 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin and 2 mM/ml L-glutamine. The samples prepared in this manner, with concentration of 1 mg of the tested bioglasses per 1 ml of fluid were incubated for 24 hours at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . After this time the extracts were collected into sterile tubes and cytotoxicity was tested.

Using a 24-well plate an L929 cell culture was established, with density of  $1 \times 10^5/\text{ml}$ , and was incubated for 24 h at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . After this time the fluid was removed from above the cells, and the L929 cell monolayer was covered with 1000  $\mu\text{l}$  liquid from above the powder suspension and incubated for 24 h at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . Further treatment as described above in the assessment of cell viability.

The assessment of each biomaterial was performed using three replicates and representative results were demonstrated.

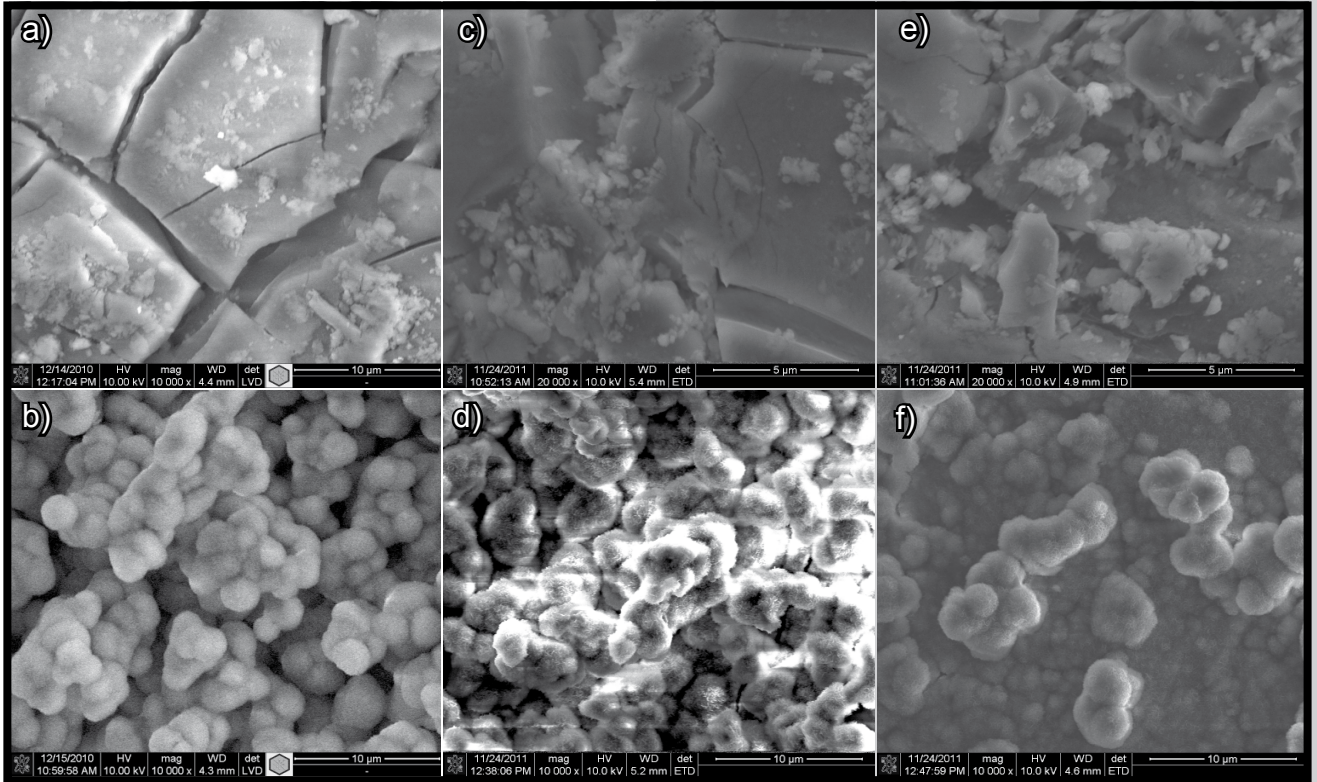
## Results and Discussions

On the surface of all tested bioglasses after immersion in SBF for 7 days (FIG. 1) and 28 days spherical structures were observed, which according to information presented in the literature [5] are typical of the morphology of the apatite obtained in a biomimetic manner, and whose presence was not found on the surface of bioglasses before contact with SBF.

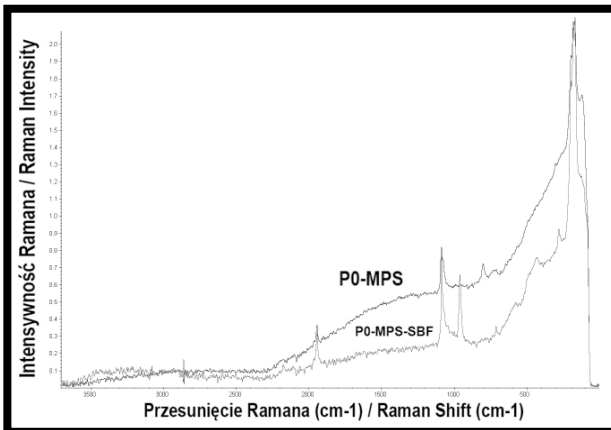
Results of FTIR analysis of the surface of bioglasses before contact with SBF and after 28 days of incubation (FIG. 2 and 3) confirm the presence of hydroxyapatite on the surfaces of bioglasses incubated in SBF. In the spectra of samples P0-MPS-SBF and P0-VS-SBF the band at 960  $\text{cm}^{-1}$  characteristic for hydroxyapatite (HA) is visible, which is attributed to the symmetric stretching vibrations of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group [6,7]. In the spectra of these samples also weak bands at 430  $\text{cm}^{-1}$  originating from the bending vibration of  $\text{PO}_4^{3-}$  could be visible. This indicates that structure of hydroxyapatite appeared after contact of samples P0-VS-SBF and P0-MPS-SBF with SBF solution. Bands characteristic of hydroxyapatite are not in the spectra of samples P0-VS and P0-MPS. The intensity of the characteristic oscillation is higher in the case of sample P0-MPS-SBF indicating a greater amount of hydroxyapatite on the surface of sample with MPS addition.

The results of the in vitro cytotoxicity tests according to the criteria of ISO 10993-5 performed according to the direct method with concentration of 0.25 mg/ml after 24 h and 48 h of incubation (TABLE 1) indicate a slight cytotoxicity of P0-MPS and P0-VS bioglasses and mild cytotoxicity of P-0. However, the results obtained from tests utilising the indirect method (TABLE 2) indicate no cytotoxic effect. Bioglass P0-MPS in which (trimetoxysilyl)propyl methacrylate was introduced demonstrated a lower share of dead cells in the culture, compared to bioglass P0-VS, which was produced using vinyltriethoxysilane. The highest share of dead cells after 24 h and 48 h of contact was recorded for bioglass P0 - 2% and 5%, respectively.

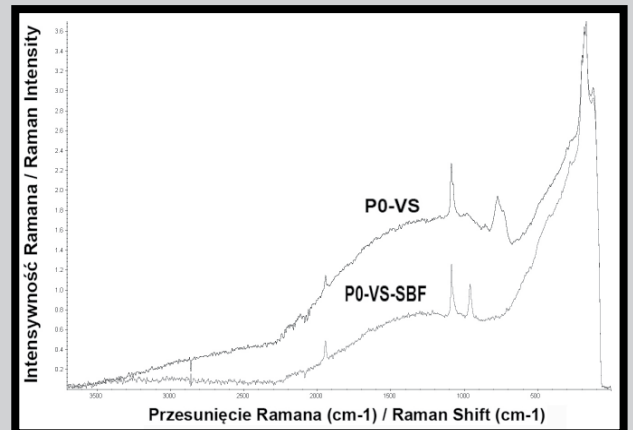




**RYS. 1.** Bioszklę przed zanurzeniem w roztworze SBF i po 7 dniach inkubacji: a) P-0 przed kontaktem z SBF, b) P-0 po 7 dniach zanurzenia w SBF, c) P0-MPS przed kontaktem z SBF, d) P0-MPS po 7 dniach zanurzenia w SBF, e) P0-VS przed kontaktem z SBF, f) P0-VS po 7 dniach zanurzenia w SBF.  
**FIG. 1.** Bioglasses before immersion in SBF solution, and after 7 days of immersion: a) P-0 before contact with SBF, b) P-0 after 7 days of immersion in SBF, c) P0-MPS before contact with SBF, d) P0-MPS after 7 days of immersion in SBF, e) P0-VS before contact with SBF, f) P0-VS after 7 days of immersion in SBF.



**RYS. 2.** Wyniki FTIR próbki P0-MPS przed zanurzeniem w SBF i próbki P0-MPS-SBF po kontakcie z SBF przez 28 dni.  
**FIG. 2.** FTIR results of P0-MPS sample before immersion in SBF and P0-MPS-SBF sample after contact with SBF during 28 days.



**RYS. 3.** Wyniki FTIR próbki P0-VS przed zanurzeniem w SBF i próbki P0-VS-SBF po kontakcie z SBF przez 28 dni.  
**FIG. 3.** FTIR results of P0-VS sample before immersion in SBF and P0-VS-SBF sample after contact with SBF during 28 days.



**TABELA 1. Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w bezpośrednim kontakcie z bioszklami.**

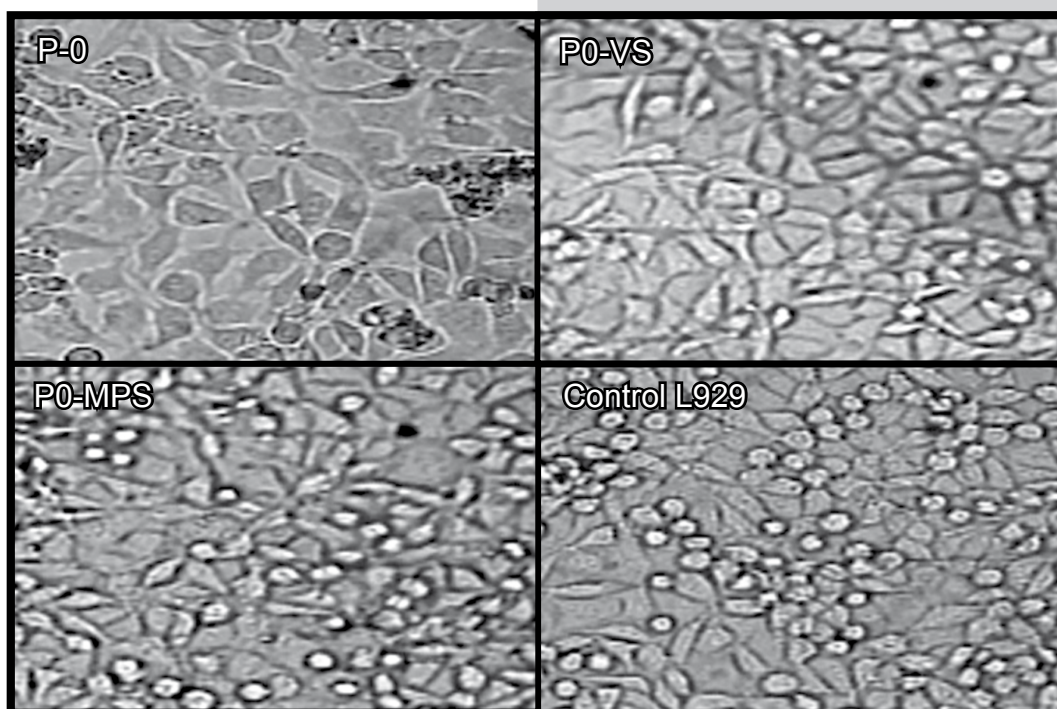
**TABLE 1. Cytotoxic changes in culture of L929 fibroblast cells in direct contact with bioglasses.**

Czas zanurzenia Immersion time [h]	Symbol materiału Symbol of material	Liczba lub udział procentowy komórek Number or percentage share of cells			Stopień toksyczności Extent of toxicity
		Martwe / Dead [%]	Żywe / Viable [%]	Ogółem / Total [CFU/ml]	
24	P-0	50	50	$7.6 \times 10^4$	2
	P0-VS	14	86	$2.3 \times 10^5$	1
	P0-MPS	20	80	$1.2 \times 10^5$	1
	Kontrola L929 Control culture L929	2	98	$5.5 \times 10^5$	0
48	P-0	46	54	$1.2 \times 10^5$	2
	P0-VS	18	82	$3.6 \times 10^5$	1
	P0-MPS	18	82	$1.4 \times 10^5$	1
	Kontrola L929 Control culture L929	1	99	$7.5 \times 10^5$	0

**TABELA 2. Zmiany cytotoksyczne w hodowli komórek fibroblastopodobnych L929 w kontakcie z wyciągami badanych bioszkieł.**

**TABLE 2. Cytotoxic changes in culture of L929 fibroblast cells in contact with extracts of the tested bioglasses.**

Czas zanurzenia Immersion time [h]	Symbol materiału Symbol of material	Liczba lub udział procentowy komórek Number or percentage share of cells			Stopień toksyczności Extent of toxicity
		Martwe / Dead [%]	Żywe / Viable [%]	Ogółem / Total [CFU/ml]	
24	P-0	2	98	$5.6 \times 10^5$	0
	P0-VS	1	99	$7.5 \times 10^5$	0
	P0-MPS	0	100	$6.9 \times 10^5$	0
	Kontrola L929 Control culture L929	0	100	$7.9 \times 10^5$	0
48	P-0	5	95	$5.9 \times 10^5$	0
	P0-VS	1	99	$8.3 \times 10^5$	0
	P0-MPS	0	100	$7.8 \times 10^5$	0
	Kontrola L929 Control culture L929	0	100	$8.7 \times 10^5$	0



**RYS. 4. Obrazy hodowli komórek L929 w kontakcie z wyciągami badanych bioszkieł po 48 h inkubacji.**

**FIG. 4. Images of cultures of L929 cells in contact with extracts of the tested bioglasses after 48 h of incubation.**

Obrazy hodowli w kontakcie z wyciągami badanych bioszkieł po 48 h inkubacji (RYS. 4) przedstawiają komórki L929 o wrzecionowatym kształcie, przylegające do podłoża w równomiernej, jednolitej warstwie. Komórki są rozplaszczone, co świadczy o korzystnym oddziaływaniu badanych bioszkieł.

## Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań bioaktywności i cytotoxyczności in vitro bioszkieł z układu  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$  pozwalają stwierdzić, że:

1. Otrzymane bioszkieła są bioaktywne w kontakcie z roztworem SBF, na co wskazuje obecność na powierzchni bioszkieł sferycznych struktur typowych dla morfologii apatytu.

2. Wyniki FTIR potwierdzają obecność hydroksyapatytu na powierzchni bioszkieł po kontakcie z SBF i wskazują na wyższy udział HA w próbce z dodatkiem MPS.

3. Wyniki badań in vitro cytotoxyczności metodą bezpośrednią, mimo nieznacznej cytotoxyczności P0-MPS i P0-VS oraz łagodnej P-0, potwierdzają zdolność komórek L929 do proliferacji w kontakcie z wytworzonymi bioszkiełami.

4. Badania in vitro cytotoxyczności metodą pośrednią wszystkich wytworzonych bioszkieł pozwoliły stwierdzić brak efektu toksycznego wyekstrahowanych substancji na komórki L929.

## Podziękowania

Praca nr 02/I/007/11 realizowana w roku 2011 i finansowana ze środków statutowych ICiMB.

Images of cultures in contact with extracts of the obtained bioglasses after 48 h of incubation (FIG. 4) show L929 cells being spindle-shaped, adhering to the substrate in an even and uniform layer. The cells are flattened, which indicates favourable impact of the tested bioglasses.

## Conclusions

Results of the study of bioactivity and cytotoxicity in vitro of  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$  system bioglasses allow to conclude that:

1. The obtained bioglasses are bioactive in contact with SBF solution, as indicated by the presence on the surface of spherical structures typical for morphology of the apatite.

2. FTIR results confirm the presence of hydroxyapatite on the surface of bioglasses after contact with SBF and show a higher content of HA in the sample with MPS addition.

3. Test results of in vitro cytotoxicity by the direct method, although showing slight cytotoxicity P0-MPS and P0-VS and mild P-0, confirm the ability of cells L929 to proliferate in contact with produced bioglasses.

4. Indirect method in vitro cytotoxicity tests involving all produced bioglasses revealed no toxic effect of extracted substances on L929 cells.

## Acknowledgements

The work no. 02/I/007/11 was carried out in 2011 and financed by statutory funds of ICiMB.

## Piśmiennictwo

- [1] Ravarian R., Moztaarzadeh F., Hashjin M., Solati Rabiee S.M., Khoshakhlagh P., Tahiri M.: Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International* 36 (2010) 291-297.
- [2] Fathi M. H., Mortazavi V., Doostmohammadi A.: Bioactive glass nanopowder for the treatment of oral bone defects. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Science* 4 (2007) 115-122.
- [3] Juhasz J. A., Best S. M.: bioactive ceramics: processing, structures and properties. *Journal of Materials Science* 47 (2012) 610-624.
- [4] Kim Y., Ohtsuki Ch., Kawachi G., Kamitakahara M., Cho S. B.: Preparation of bioactive microspheres of organic modified calcium silicates through sol-gel processing. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 45 (2008) 43-49.

## References

- [5] Vallet-Regi M., Romero A. M., Ragel C.V., LeGeros R. Z.: XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* 44 (1999) 416-421.
- [6] Koutsopoulos S.: Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research* 62 (2002) 600-612.
- [7] Pasteris J.D., Wopenka B., Freeman J.J., Rogers K., Valsami-Jones E., Van Der Houwen J.A.M., Silva M.J.: Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25 (2004) 229-238.

# WPLÝW RÓŻNEJ NANOTOPOGRAFII WARSTW AZOTOWANYCH NA ADHEZJĘ PŁYTEK KRWI

AGNIESZKA SOWIŃSKA<sup>1\*</sup>, MICHAŁ TARNOWSKI<sup>2</sup>,  
WITOLD JAKUBOWSKI<sup>3</sup>, JUSTYNA OLEKSIĄK<sup>1</sup>,  
TADEUSZ WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, ELŻBIETA CZARNOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT „POMNIK - CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”,  
ZAKŁAD PATOLOGII,

AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSZAWA

<sup>2</sup> POLITECHNIKA WARSZAWSKA,

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,

UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

<sup>3</sup> POLITECHNIKA ŁÓDZKA, ZAKŁAD BIOFIZYKI,

UL. B. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

\* E-MAIL: A.SOWINSKA@CZD.PL

## Streszczenie

Oddziaływanie nanotopografii biomateriałów na biogodność z krwią jest nadal słabo poznane. Wiadomo, że azotowane warstwy powierzchniowe z zewnętrzną strefą azotku tytanu (TiN) charakteryzują się dobrymi właściwościami i biogodnością zarówno w kontakcie z krwią, jak i kością. Dlatego też modyfikacje właściwości powierzchni dla zastosowań w kardiologii są nadal przedmiotem zainteresowania i były celem naszych badań. W pracy przedstawiono wyniki badań właściwości warstw azotowanych wytwarzanych w warunkach wyładowania jarzeniowego na stopie tytanu Ti6Al4V w niskotemperaturowym procesie, na potencjale katody i na potencjale plazmy. Uzyskane warstwy miały różną topografię i chropowatość powierzchni w skali nano. Zewnętrzna strefa warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) wytworzonej na potencjale katody (TiN-K) charakteryzowała się wyższą chropowatością w porównaniu z warstwą wytworzoną na potencjale plazmy (TiN-P) (Ra = 0,177 μm dla TiN-K vs. Ra = 0,019 μm dla TiN-P). Ponadto przeprowadzone badania zwilżalności wykazały wysoką zwilżalność powierzchni TiN-K (38° dla TiN-K vs 89° dla TiN-P). Badania biologiczne składu biofilmu wykazały niższą adsorpcję fibrynogenu oraz adhezję, agregację i aktywację płytek krwi na TiN-K w porównaniu do TiN-P. Uzyskane wyniki wskazują, że adhezja płytek krwi, jak i ilość zaadsorbowanego fibrynogenu koreluje z topografią powierzchni warstwy TiN. Zatem poprzez zmianę topografii powierzchni można wpływać na oddziaływanie płytek krwi z biomateriałem.

**Słowa kluczowe:** powierzchniowe warstwy azotowane, chropowatość, zwilżalność, hemozgodność

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 27-32]

## Wprowadzenie

Warstwy azotowane produkowane w warunkach wyładowania jarzeniowego mają charakter dyfuzyjny i wykazują dobrą biogodność z różnymi ludzkimi komórkami [1,2]. Modyfikacje topografii powierzchni, które mogą odpowiednio do specyficznych zastosowań (w tym dla sztucznego serca, stentów) zwiększać biogodność biomateriałów nie są nadal dobrze poznane [3].

# EFFECT OF NITRIDED SURFACE LAYERS WITH DIFFERENT NANOTOPOGRAPHY ON PLATELETS ADHESION

AGNIESZKA SOWIŃSKA<sup>1\*</sup>, MICHAŁ TARNOWSKI<sup>2</sup>,  
WITOLD JAKUBOWSKI<sup>3</sup>, JUSTYNA OLEKSIĄK<sup>1</sup>,  
TADEUSZ WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, ELŻBIETA CZARNOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,  
PATHOLOGY DEPARTMENT.,

AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING,

UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSAW, POLAND

<sup>3</sup> TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

UL. B. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 LODZ, POLAND

\* E-MAIL: A.SOWINSKA@CZD.PL

## Abstract

The effect of different topographies of biomaterials at the nanoscale on biocompatibility is still poorly known. It is known that nitrided surface layers with external titanium nitride (TiN) zone exhibit good properties and biocompatibility with blood and bone. However, the surface properties of biomaterials destined for cardiological applications are still a subject of interest for further improvement. Thus, the aim of our investigations was modification of the external zone of the nitrided surface layers produced under glow discharge conditions for cardiological applications. The layers were produced at low temperature using cathode potential and plasma region. These layers exhibited different surface topography and roughness. The external zone of the layer produced on cathode potential (TiN-K) is characterized by higher roughness compared to the layer produced in plasma region (TiN-P) (Ra = 0.177 μm vs. Ra = 0.019 μm) and higher surface wettability (contact angle 38° vs. 89°). Fibrinogen showed its lower adsorption followed also by lower subsequent platelets adhesion, aggregation and activation on TiN-K compared to TiN-P. These suggest that the amount of adsorbed fibrinogen and platelets adhesion correlate with topographical characteristics of TiN surface. Thus, altering surface topography the platelets-biomaterial interactions can be reduced.

**Keywords:** nitrided surface layers, roughness, wettability, haemocompatibility

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 27-32]

## Introduction

Nitrided surface layer produced under glow discharge conditions form diffusion layers with good biocompatibilities with various human cells [1,2]. Modification of surface topography is a strategy which can be applied to increase the biocompatibility of materials destined for specific applications (among others for artificial hearts and stents) [3].



Wiadomo, że warunki procesu mają znaczący wpływ na strukturę i topografię zewnętrznej strefy wytwarzanej warstwy, od której zależy oddziaływanie biomateriał - komórka/tkanka. Badania wskazują, że chropowatość powierzchni wpływa na jej zwilżalność, a to z kolei na skład białek adsorbowanych na powierzchni biomateriału w pierwszych sekundach kontaktu ze środowiskiem biologicznym [4]. Białka te decydują o adhezji i agregacji lub proliferacji komórek, w tym zaadsorbowany fibrynogen jest czynnikiem zwiększającym trombogennosć powierzchni biomateriału [5]. Wyniki badań prezentowane w literaturze wskazują, że obecność znacznych ilości fibrynogenu na powierzchni warstw wytworzonych w warunkach wyładowania jarzeniowego prowadzi do adhezji płytek krwi [6].

Modyfikując proces azotowania jarzeniowego można wytworzyć warstwy typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  o różnych właściwościach powierzchni, w tym strukturze, topografii powierzchni i zwilżalności, które będą zmniejszały adhezję komórek krwi. Dlatego celem naszych badań była weryfikacja właściwości powierzchni warstw azotowanych wytworzonych na stopie tytanu Ti6Al4V w niskotemperaturowym procesie azotowania jarzeniowego w celu poprawy ich hemozgodności.

## Materiały i metody

Próbki stopu tytanu Ti6Al4V o średnicy 8 mm z powierzchniową warstwą azotowaną typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  wytwarzano w warunkach wyładowania jarzeniowego w temperaturze 680°C na potencjale katody lub plazmy. Materiały sterylizowano plazmowo (Sterrad 100, atmosfera  $H_2O_2$ , temp. 54°C, ciśnienie 7 mbar).

Mikrostrukturę warstw badano z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (Hitachi S-3500N) z EDS. Właściwości zewnętrznej powierzchni materiału oceniano w zakresie morfologii (SEM Hitachi S-3500N), chropowatości (optyczny profilometr skanujący WYKO NT9300), mikrostruktury (mikroskop sil atomowych, AFM, Veeco) oraz zwilżalności wodą dejonizowaną (aparaturę fotograficzną Nikon Coolpix 4500, analiza zdjęć z zastosowaniem programu DROP3).

Dla oceny adsorpcji fibrynogenu próbki materiałów inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C z osoczem krwi zdrowych dawców. Biofilm wytworzony na tych powierzchniach utrwalano w 4% paraformaldehydzie i 70% metanolu. Fibrynogen oznaczano przy użyciu przeciwciała anty-ludzki fibrynogen znakowanego FITC (1:100, Millipore) i badano w mikroskopie konfokalnym (Olympus, Japonia). W badaniach adhezji i aktywacji płytek krwi zastosowano bogatopłytkowe osocze (PRP) otrzymywane z krwi zdrowych dawców, które nanoszono na próbki biomateriałów (150  $\mu$ l/próbkę) i inkubowano przez 5 i 30 minut. Po zakończonej inkubacji próbki płukano w celu usunięcia niezadherowanych płytek. Zadherowane komórki utrwalano w 4% buforowanym glutaraldehydzie i odwadniano w wodnych roztworach etanolu o rosnącym jego stężeniu, a następnie napyłano cienką warstwą złota (Fine coater JFC-1200 Jeol) i wizualizowano w mikroskopie skaningowym (Jeol JSM – 7600F). Adsorpcję fibrynogenu i adhezję płytek krwi mierzono morfometrycznie z zastosowaniem programu Cell<sup>sense</sup> (Olympus, Japonia). Wyniki pomiarów przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe.

## Wyniki i dyskusja

### Właściwości powierzchni

Badania składu chemicznego i rozmieszczenia pierwiastków wykazały, że obie wytworzone warstwy azotowane miały charakter dyfuzyjny i były typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ .

It is known, that conditions of the process influence the surface structure and topography which further modulate interactions between biomaterials and cells/tissues. Observations show that surface roughness affect surface wettability, which influences protein adsorption occurring during the first seconds upon exposure of biomaterial to biological environment [4]. These proteins influence cell adhesion, aggregation and proliferation, whereas fibrinogen increases the thrombogenicity of biomaterial surface [5]. Data presented in literature reveal platelet adhesion due to fibrinogen adsorption on surface layers produced under glow discharge conditions [6].

Modifying the glow discharge nitriding process, different surface structures, topography and wettability of the  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  layer can be produced and these surface properties might regulate platelet adhesion. Therefore, the aim of our investigations was to analyze nitrated surface layers with different nanoscale topographies of the TiN external zone produced at low temperature plasma process and its effects on haemocompatibility.

## Materials and Methods

Samples of Ti6Al4V alloy with nitrated  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  type surface layers of 8 mm diameter were produced under glow discharge conditions at temperature of 680°C on cathode potential or in plasma region. Samples produced were sterilized in plasma (Sterrad 100, atmospheric  $H_2O_2$ , temp. 54°C, pressure 7 mbar).

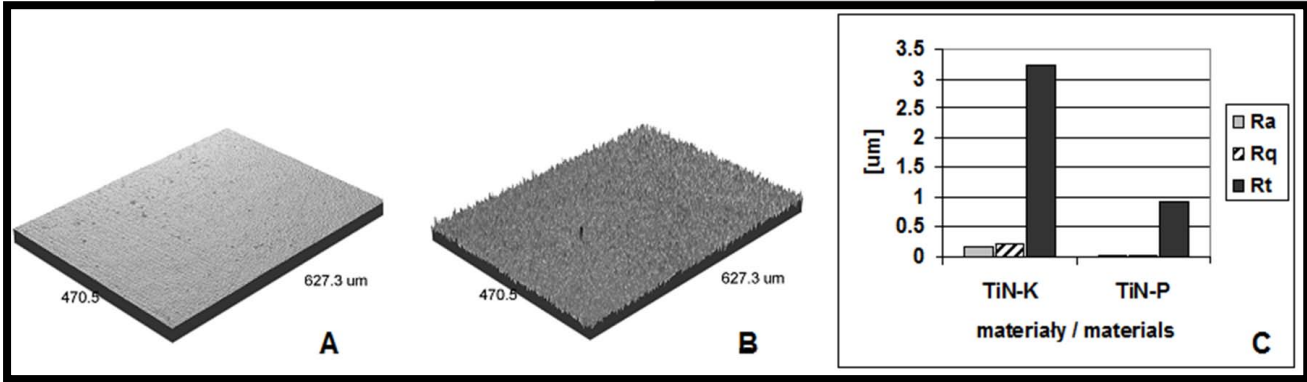
Microstructure of the layers was analysed using scanning electron microscope (Hitachi S-3500N) with EDS. Characteristics of the external surface were investigated for morphology (SEM Hitachi S-3500N), roughness (profilometer WYKO NT9300), microstructure (atomic force microscopy, AFM, Veeco) and wettability by deionised water (imaging by Nikon Coolpix 4500 and measurement with the use of DROP3 program).

For fibrinogen adsorption samples were incubated with fresh human plasma for 2 hours at 37°C. Biofilm produced on the surface was fixed in 4% paraformaldehyde and 70% methanol. Fibrinogen was stained with specific anti-human FITC-conjugated antibody (1:100, Millipore) and investigated using confocal microscope (Olympus, Japan). For determination of platelets adhesion and activation platelets rich plasma (PRP) generated from fresh human blood was applied on biomaterial samples (150  $\mu$ l/sample) and incubated by 5 and 30 min followed by rinsing of the non-adherent platelets. Adhered platelets were fixed in 4% buffered glutaraldehyde and dehydrated in ethanol series, then fine coated with gold (Fine coater JFC-1200 Jeol) and visualized using scanning microscope (Jeol JSM – 7600F). Percent of material surface area occupied by fibrinogen and platelets adhesion were quantified on images with morphometric program Cell<sup>sense</sup> (Olympus, Japan). Results of all measurements were expressed as mean  $\pm$  SD.

## Results and Discussions

### Surface characteristics

Investigations of the chemical composition and distribution demonstrated that nitrated surface layers produced on cathode potential and in plasma region were both diffusion and  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  type. Investigations of the sample surface using optical profilometer revealed higher roughness of TiN in the external zone of the layers produced on cathode potential (TiN-K) compared to those produced in plasma region (TiN-P) ( $R_a = 0.177 \mu m$ ,  $R_q = 0.229 \mu m$ ,  $R_t = 3.244 \mu m$  vs.  $R_a = 0.019 \mu m$ ,  $R_q = 0.025 \mu m$ ,  $R_t = 0.913 \mu m$ ) (FIG. 1).



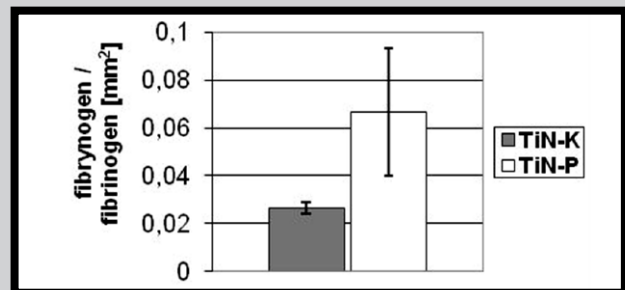
**RYS. 1.** Topografia powierzchni warstw azotowanych wytworzonych w procesie azotowania jarzeniowego na potencjale plazmy (A) i katody (B). Parametry chropowatości powierzchni próbek uzyskane przy pomocy profilometru optycznego; Ra - średnie odchylenie profilu od linii średniej, Rq - średnie kwadratowe odchylenie profilu od linii średniej wzdłuż odcinka pomiarowego lub elementarnego, Rt - odległość najwyższego punktu profilu do najniższego na odcinku elementarnym  $Rt = Rp + Rv$ .

**FIG. 1.** Surface topography of nitrided layers produced under glow discharge conditions on plasma (A) and cathode (B) potential. Roughness parameters of surface layers (optical profilometer); Ra - average arithmetic deviation of the roughness profile, Rq - average square deviation of the roughness profile, Rt - distance between the highest and lowest point of the profile  $Rt = Rp + Rv$ .

Wyniki badań powierzchni próbek przy pomocy profilometru optycznego pokazały, że zewnętrzna strefa TiN warstwy wytworzonej na potencjale katody (TiN-K) charakteryzowała się wyższą chropowatością ( $Ra = 0,177 \mu\text{m}$ ,  $Rq = 0,229 \mu\text{m}$ ,  $Rt = 3,244 \mu\text{m}$ ) w porównaniu do warstwy wytworzonej na potencjale plazmy (TiN-P) ( $Ra = 0,019 \mu\text{m}$ ,  $Rq = 0,025 \mu\text{m}$ ,  $Rt = 0,913 \mu\text{m}$ ) (RYS. 1). Jak wskazywały wyniki badań morfologii powierzchni uzyskane za pomocą AFM, warstwę wytworzoną na potencjale katody charakteryzowała bardziej rozwinięta powierzchnia w skali nano niż warstwę wytworzoną na potencjale plazmy. Warstwa TiN-K miała także większą zwilżalność (kąt zwilżalności wodą dejonizowaną =  $38^\circ$ ) niż warstwa TiN-P (kąt zwilżalności wodą =  $89^\circ$ ). A zatem, powierzchnia TiN warstwy wytworzonej na potencjale katody wykazywała właściwości hydrofilowe, a na potencjale plazmy hydrofobowe. Wiele badań prezentowanych w literaturze wskazuje, że hydrofobowość powierzchni zwiększa interakcję biomateriału ze środowiskiem, co może prowadzić do większej adhezji komórek, podczas gdy hydrofilowość powierzchni jest korzystna dla materiałów kontaktujących się z krwią [7].

### Adsorpcja fibrynogeny

Wizualizacja fibrynogeny w mikroskopie konfokalnym pokazała, że białko to tworzy drobne agregaty jednorodnie rozmieszczone na TiN-K i większe agregaty nieregularnie rozmieszczone na powierzchni TiN-P. Pomiarów obszarów zajętych przez fibrynogen wykazały mniej białka na powierzchni TiN-K w porównaniu z TiN-P (RYS. 2). Z badań prezentowanych w literaturze wynika, że ze wzrostem stopnia rozwinięcia powierzchni oraz jej hydrofobowości rośnie adsorpcja fibrynogeny [8]. Innymi czynnikami charakteryzującymi biomateriał, które odgrywają ważną rolę w zwiększonej adsorpcji białek są wysoka energia powierzchniowa materiału, elektrostatyczne oddziaływanie między cząsteczkami białek i powierzchnią [8]. Biorąc pod uwagę wszystkie badane przez nas właściwości TiN – strefy zewnętrznej wytworzonych warstw, to warstwa wytworzona na potencjale katody prezentowała duży potencjał biokompatybilności z krwią.



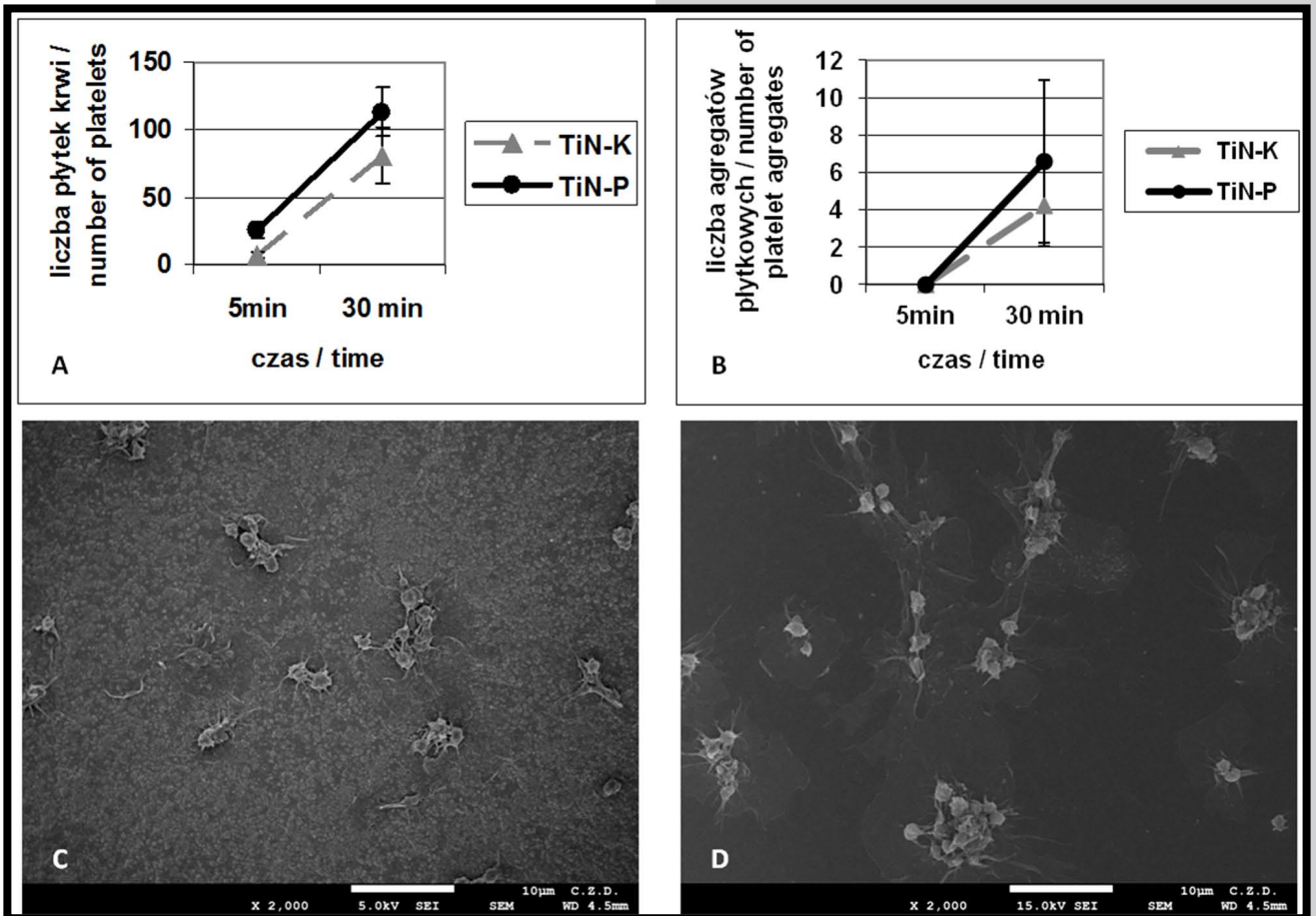
**RYS. 2.** Adsorpcja fibrynogeny na powierzchni  $1 \text{ mm}^2$  próbek z warstwą azotowaną na potencjale katody (TiN-K) i plazmy (TiN-P).

**FIG. 2.** Fibrinogen adsorption on  $1 \text{ mm}^2$  of surface layers nitrided on cathode (TiN-K; C) and plasma (TiN-P; D) potential.

The AFM surface analyses showed more developed nano-scale TiN layer produced on cathode potential than in plasma region. The TiN-K exhibited higher wettability (contact angle with deionized water =  $38^\circ$ ) compared to TiN-P layer (contact angle =  $89^\circ$ ). Thus, the TiN surface produced on cathode potential was hydrophilic, while the TiN surface produced in plasma region was hydrophobic. Numerous papers have presented that surface hydrophobicity increases interactions at biomaterial - environment interface leading to increased cell adhesion, while surface hydrophilic feature was advantageous for biomaterials in contact with blood [7].

### Fibrinogen adsorption

Fibrinogen visualization demonstrated that this protein forms fine aggregates homogeneously spread on TiN-K and significant aggregates irregularly spread on TiN-P. Measurements of areas occupied by fibrinogen revealed lower covered surface area on TiN-K than on TiN-P (FIG. 2). Some of literature data have documented increased fibrinogen adsorption with surface development and hydrophobicity [8]. Other factors which play a significant role in protein adsorption are high surface energy and electrostatic interaction between proteins and biomaterial surface [8]. All properties of the TiN layers analysed in our study suggest that the layer produced on cathode potential might exhibit increased potential as blood biocompatible surface.



**RYS. 3.** Liczba płytek krwi (A) i agregatów płytkowych (B) w mikroobszarach 1,42 mm<sup>2</sup> warstw azotowanych na potencjale katody (TiN-K) i plazmy (TiN-P).  
**Morfologia płytek krwi zadherowanych na warstwach azotowanych na potencjale katody (C) i plazmy (D).**  
**FIG. 3.** Number of blood platelets (A) and platelet aggregates (B) in microregions 1.42 mm<sup>2</sup> of layers nitrided on cathode (TiN-K) and plasma (TiN-P) potential.  
**Morphology of blood platelets adhered on surface layers nitrided on cathode (TiN-K; C) and plasma (TiN-P; D) potential.**

#### Adhezja płytek krwi

Analizy morfometryczne wskazywały na mniejszą adhezję i agregację płytek krwi na powierzchni TiN-K w porównaniu z TiN-P (RYS. 3A, B). Wynik ten pozostaje w zgodzie z mniejszą adsorpcją fibrynogenu na warstwie TiN-K oraz jej właściwościami hydrofilowymi. Wiadomo, że fibrynogen jest jednym z głównych białek pośredniczących w adhezji i aktywacji płytek krwi [6]. Nie można jednak wykluczyć znaczenia dla adhezji komórek krwi obecności innych rodzajów białek na powierzchni biomateriału, m.in. albuminy, która hamuje adhezję płytek [9]. Jednak na tym etapie prowadzonych przez nas badań nie analizowaliśmy adsorpcji albuminy. Ponadto, badania innych autorów wskazują, że wzrost chropowatości powierzchni w skali nano może przyczyniać się do zmian konformacyjnych w strukturze białek, co także może modyfikować stopień adhezji komórek [10,11]. Takiego zjawiska nie można wykluczyć w odniesieniu do prezentowanych przez nas warstw azotowanych.

Populacje płytek zadherowanych na warstwie TiN-K charakteryzował kształt dendrytyczny (RYS. 3C), podczas gdy na TiN-P większość komórek była silnie rozplaszczona i zaokrąglona (RYS. 3D). Jednocześnie, liczba agregatów płytkowych, składających się z 2-4 komórek, była większa na TiN-P (RYS. 3B). Na podstawie wielu badań porównawczych wyróżnia się 5 kategorii morfologicznych płytek krwi od dysko-podobnych przez dendrytyczne do rozplaszczonych, odzwierciedlających rosnący stopień ich aktywacji [12].

#### Platelets adhesion

Morphometric analyses showed significantly lower platelet adhesion and aggregation on TiN-K compared with TiN-P (FIG. 3A, B). Since it is known that fibrinogen is one of the major proteins mediating platelet adhesion and activation [6], these results are in agreements with lower fibrinogen adsorption and wettability of TiN-K. It cannot be excluded that other proteins present on biomaterial surface, e.g. albumin, might also inhibits platelet adhesion [9]. However, the relative adsorption of albumin and fibrinogen has not been analysed in this stage of our investigations. Further, increased surface nano-roughness can lead to conformational changes of proteins, which can modify cell adhesion [10,11].

In our study platelets adherent on TiN-K displayed spread-dendritic morphology as shown in FIG. 3C, while spread or fully spread on TiN-P (FIG. 3D). Simultaneously, platelets aggregates consisting of 2-4 cells were more numerous on TiN-P (FIG. 3B). Morphology of activated platelets is classified into 5 categories from disc-like via dendritic to spread platelets, reflecting increasing cell activation [12]. The morphology of platelets on TiN-K suggests low activation state, while platelets on TiN-P were highly activated. These results are in agreement with lower expression of fibrinogen on TiN-K surface [6]. It is suggested that platelets are fully spread only when fibrinogen concentration reaches a proper threshold value [13].



Prezentowane w naszych badaniach komórki na warstwach TiN-K odpowiadały kategorii morfologicznej płytek słabo aktywowanych, a na TiN-P silnie aktywowanych. Wynik ten pozostaje w zgodzie z mniejszą ekspresją fibrynogenu na powierzchni TiN-K, który jak wiadomo również pośredniczy w aktywacji płytek [6]. Sugeruje się, że do silnego rozplaszczania płytek na powierzchni implantu dochodzi gdy stężenie fibrynogenu osiąga odpowiednią wartość [13]. Nasze badania wykazały, że warstwa azotowana TiN o większej chropowatości wytworzona na potencjale katody jest bardziej hemozgodna niż warstwa o mniejszej chropowatości wytworzona na potencjale plazmy, bowiem adsorbuje mniej fibrynogenu, a towarzyszy temu mniejsza adhezja i aktywacja płytek krwi. Efekt biologiczny kontaktu powierzchni TiN-K z osoczem i płytkami krwi jest zgodny ze zwilżalnością tej powierzchni. Chociaż nie można wykluczyć, że wysoka chropowatość powierzchni TiN-K może zmieniać konformację zaadsorbowanych białek, przez co receptory komórek krwi nie mogą połączyć się z odpowiednimi elementami składników macierzy biofilmu.

Zjawisko mniejszej adhezji i aktywacji płytek na powierzchni TiN-K o większej chropowatości niż na gładziej stwierdzony w naszych doświadczeniach pozostaje w zgodzie z obserwacjami hemozgodności azotku tytanu przez innych badaczy [14-16]. Podkreślali oni znaczenie rozwinięcia powierzchni warstwy w skali nano dla hamowania odpowiedzi płytek krwi. Występuje zgodność wyników badań uzyskanych przez Karagkiozaki i wsp. dla nad-stechiometrycznego TiN z naszymi wynikami dla TiN-K, który jest niestechiometryczny [14]. Należy ponadto podkreślić, że badania innych badaczy dotyczyły warstw wytwarzanych metodami PVD i CVD, podczas gdy nasze warstwy zostały wytworzone w warunkach wyładowania jarzeniowego. Warstwy prezentowane przez naszą grupę są dyfuzyjne, a więc o mniejszych naprężeniach własnych niż warstwy adhezyjne. Skoro kliniczne obserwacje wskazują, że stenty z gładszą powierzchnią mogą sprzyjać tworzeniu skrzepów krwi [17, 18], to tym samym warstwy wytworzone w warunkach wyładowania jarzeniowego mogą być bardziej perspektywiczne dla protez naczyniowych.

## Wnioski

W prezentowanych badaniach wykazano, że adhezja i aktywacja płytek krwi zależy od właściwości powierzchni, w skali nanometrycznej, warstwy azotku tytanu wytworzonego w niskotemperaturowym procesie azotowania jarzeniowego. Chociaż nasze poprzednie badania wykazały, że dyfuzyjne warstwy azotku tytanu charakteryzuje małe wykrzepianie krwi, mniejsze niż na stopie tytanu Ti6Al4V [2], to odpowiednio modyfikując proces azotowania jarzeniowego można w większym stopniu zmniejszyć adhezję i agregację płytek krwi. Wytworzona warstwa typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) w procesie niskotemperaturowego azotowania jarzeniowego stopu tytanu na potencjale katody ma duży potencjał zastosowania praktycznego dla modyfikacji biomateriałów stosowanych w kardiologii. Właściwości powierzchni tak otrzymanych warstw są przedmiotem dalszych badań.

## Podziękowania

*Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC – 2011/01/D/ST8/02931.*

Our investigations showed that nitride surface layer with higher roughness produced on cathode potential is more haemocompatible because its expressed less fibrinogen and therefore less platelet adhesion and activation. These biological effects are consistent with the surface wettability. However, it cannot be excluded, that the roughness of TiN-K can cause protein conformational changes so that the receptors of blood cells cannot adhere to such biofilm matrix.

Decreased platelets adhesion and activation on TiN-K surfaces with higher nanoroughness in our experiments are in agreement with observations of other investigators of titanium nitride haemocompatibility [14-16]. Those investigators have underlined significance of surface roughness in nano-scale on inhibition of platelets response. There is convergence of Karagkiozaki et al. data obtained for overstoichiometric TiN with our data for TiN-K, which is non-stoichiometric [14]. It should be pointed however that investigations presented in literature by others authors have related to surface layers produced with PVD and CVD methods while our to the layers produced in the process under glow discharge conditions. Thus nitride surface layers presented by our group are diffusion layers with lower residual stresses than adhesive layers. Since clinical observations suggest that stents with smoother surfaces may promote thrombosis [17, 18] thus the layers produced under glow discharge conditions seem to be more perspective for application in medical vascular prosthesis.

## Conclusions

In this study it is shown that platelets adhesion and activation are influenced by nano - properties of titanium nitrided surface layer of TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) type. Our previous investigations have shown that nitrided surface layers produced under glow discharge conditions are less thrombogenic than Ti6Al4V titanium alloy surfaces [2], but proper modification of the process conditions allows production of surface layers with properties which decrease platelet adhesion and activation. Thus, topographical manipulation is a significant approach for reduction of thrombogenicity of nitride surface layers. The layer of TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) produced under glow discharge conditions at low temperature on cathode potential might have significance for practical application in cardiology. The surface properties of nitrided surface layers produced on cathode potential or in plasma region are a subject of further research.

## Acknowledgments

*This study was supported by the National Science Centre [DEC - 2011/01/D/ST8/02931].*

- [1] Czarnowska E., Wierzchon T., Maranda-Niedbała A., Karczmarzewicz E.: Improvement of titanium alloy for biomedical application by nitriding and carbonitriding processes under glow discharge conditions. *J Mat Sci Mater Med* 11 (2000) 73-81.
- [2] Czarnowska E., Morgiel J., Ossowski M., Major R., Sowińska A., Wierzchoń T.: Microstructure and biocompatibility of titanium oxides produced on nitrided surface layer under glow discharge conditions. *J Nanosci Nanotech* 11, 10 (2011) 8917-8923.
- [3] Mitragotri S., Lahann J.: Physical approach to biomaterial design. *Nat Mater* 8 (2009) 15-23.
- [4] Park J.Y., Gemmel C.H., Davies J.E.: Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 22 (2001) 2671-2682.
- [5] Nonckreman C.J., Fleith S., Rouxhet P.G., Dupont-Gillain C.C.: Competitive adsorption of fibrinogen and albumin and blood platelet adhesion on surfaces modified with nanoparticles and/or PEO. *Coll Surf B: Biointerface* 77 (2010) 139-149.
- [6] Cook B.C.: Reactivity of human platelets with immobilized fibrinogen is dedicated by the chemical character of the surface. *Thromb Res* 104 (2001) 39-48.
- [7] MacDonald D.E., Deo N., Markowic B., Stranick M., Somasundaran P.: Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 23 (2002) 1269-1279.
- [8] Lavenus S., Ricquier J.C., Louarn G., Layrolle P.: Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nanomedicine* 5 (2010) 937-994.
- [9] Jones M.I., McColl I.R., Grant D.M., Parker K.G., Parker T.L.: Protein adsorption and platelet attachment and activation on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res* 52 (2000) 413-421.

- [10] Dolatshahi-Pirouz A., Skeldal S., Hovgaard M.B., Jensen T., Foss M., Chevalier J. et al.: Influence of nanoroughness and detailed surface morphology on structural properties and water-coupling compatibilities of surface-bound fibrinogen films. *J Phys Chem* 113 (2009) 4406-4412.
- [11] Roach P., Farrar D., Perry C.C.: Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J Am Chem Soc* 128 (2006) 3939-3945.
- [12] Goodman S.L., Grasel T.G., Cooper S.L., Albrecht R.M.: Platelet shape and cytoskeletal reorganization of polyurethaneureas. *J Biomed Mater Res* 23 (1989) 105-124.
- [13] Park K., Mao F.W., Park H.: Morphological characterization of surface-induced platelets activation. *Biomaterials* 11 (1990) 24-31.
- [14] Karagkiozaki V., Logothetidis S., Kalfagiannis N., Lousinian S., Giannoglou G.: Atomic force microscopy probing platelet activation behavior on titanium nitride nanocoatings for biomedical applications. *Nanomed Nanotech Biol Med* 5 (2009) 64-72.
- [15] Subramanian B., Ananthakumar R., Kobayashi A., Jayachandran M.: Surface modification of 316L stainless steel with magnetron sputtered TiN/VN nanoscale multilayers for bio implant applications. *J Mater Sci: Mater Med* 23 (2012) 329-338.
- [16] Dion I., Rouais F., Trut L., Baquey C., Monties J.R., Havlic P.: TiN coating: surface characterization and haemocompatibility. *Biomaterials* 14 (1993) 169-176.
- [17] Palmaz J.C., Benson A., Sprague E.A.: Influence of surface topography on endothelialization of intravascular metallic material. *J Vasc Interv Radiol* 10 (1999) 439-444.
- [18] Hasebe T., Ishimaru T., Kamijo A., Yoshimoto Y., Yoshimura T., Yohena S., Kodama H., Hotta A., Tkahashi K., Suzuki T.: Effects of surface roughness on anti-thrombogenicity of diamond-like carbon films. *Diam Relat Mater* 16 (2007) 1343-1348.

# POWIERZCHNIA IMPLANTU TYTANOWEGO PIASKOWANEGO HYDROKSYAPATYTEM

JEREMIASZ KRZYSZTOF KOPER<sup>1\*</sup>, RADOMIR MAJCHROWSKI<sup>2</sup>,  
JAROSŁAW JAKUBOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA POZNAŃSKA,  
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
UL. JANA PAWŁA II 24, 60-965 POZNAŃ

<sup>2</sup> POLITECHNIKA POZNAŃSKA,  
INSTYTUT TECHNOLOGII MECHANICZNEJ,  
UL. PIOTROWO 3, 60-965 POZNAŃ

\* E-MAIL: JEREMIASZ.A.KOPER@DOCTORATE.PUT.POZNAŃ.PL

## Streszczenie

Praca podejmuje tematykę modyfikacji powierzchni tytanu, stosowanego jako biomateriał w implantach tkanek twardych. Tytan pomimo doskonałych właściwości użytkowych, w zastosowaniach implantacyjnych wymaga przygotowania powierzchni o określonej morfologii, parametrach oraz biogodności. Celem niniejszej pracy było porównanie komercyjnie stosowanych powierzchni tytanu, poddanych procesowi piaskowania proszkiem HA/TCP (HA – hydroksyapatyt, TCP – fosforan trójwapniowy), w zastosowaniach implantacyjnych. Proces piaskowania miał na celu zwiększenie chropowatości powierzchni i jednocześnie zmianę jej składu chemicznego tak, aby sprzyjała wzrostowi i proliferacji komórek kostnych oraz była bardziej biogodna. W badaniach wykorzystano polerowaną powierzchnię Ti 99,6% piaskowaną nieużywanym (świeżym) proszkiem oraz proszkiem używanym (po zakończonym cyklu produkcyjnym, tzn. wypięskowaniu 300 elementów/implantów dentystrycznych). Uzyskane w ten sposób próbki zbadano z wykorzystaniem mikroskopii SEM oraz profilometru optycznego, w celu określenia morfologii i geometrii powierzchni. Wyznaczono 11 parametrów 2D/3D, charakteryzujących powierzchnię i jej przydatność w implantach. Odporność korozyjną zbadano w płynie Ringera. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że na powierzchni piaskowanej nieużywanym proszkiem HA występuje większa liczba trwale umocowanych w niej cząstek HA, w porównaniu do powierzchni piaskowanej proszkiem używanym. Powierzchnia taka charakteryzuje się korzystniejszymi parametrami geometrycznymi przy niewielkim spadku odporności korozyjnej, w porównaniu do niepiaskowanej powierzchni Ti 99,6%. Implant piaskowany nieużywanym proszkiem HA, w którym proszki HA są wbite w powierzchnię, posiada potencjalnie lepszą powierzchnię do zajęcia procesów osteointegracji i trwałego połączenia z tkanką kostną.

**Słowa kluczowe:** tytan, hydroksyapatyt, piaskowanie, implant

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 33-39]

# TITANIUM IMPLANT SURFACE AFTER HYDROXYAPATITE SANDBLASTING

JEREMIASZ KRZYSZTOF KOPER<sup>1\*</sup>, RADOMIR MAJCHROWSKI<sup>2</sup>,  
JAROSŁAW JAKUBOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,  
JANA PAWŁA II 24 STR., 60-965 POZNAŃ, POLAND

<sup>2</sup> POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF MECHANICAL TECHNOLOGY,  
PIOTROWO 3 STR., 60-965 POZNAŃ, POLAND

\* E-MAIL: JEREMIASZ.A.KOPER@DOCTORATE.PUT.POZNAŃ.PL

## Abstract

In this work we describe surface modification process of titanium, which is used in hard tissue implant applications. Titanium, although has excellent and useful properties, in the implant applications requires preparation a respective surface morphology. The aim of this work was to compare Ti 99.6% surfaces, used in implant applications, after HA/TCP (HA – hydroxyapatite, TCP – tricalcium phosphate) powder sandblasting. The aim of sandblasting is to increase the surface roughness, together with changing its chemical composition. So, after the treatment the sandblasted surface should enhance cells growth and proliferation and should be more biocompatible, respective for medical applications. For the sandblasting of the polished Ti surfaces we have used one fresh/new hydroxyapatite powder (first time used) and the second one used before in the implant production (after 300 sandblasting series of dental implants). The morphology and geometrical properties of surface were investigated using SEM and optical profiler, respectively. Taking into account surface topography and usefulness in implants, the 11 2D/3D surface geometrical and hybrid parameters were determined. The corrosion potentiodynamic tests were done in Ringer solution. We have found that in the surface, sandblasted with fresh HA particles, were embedded more HA inclusions, and the surface is very rough in comparison to surface sandblasted with old HA particles. The corrosion resistance was slightly worse for sandblasted surfaces in comparison to mechanically polished one. Implants sandblasted with using of fresh HA (with embedded and strongly bonded with titanium HA particles) give potentially better surface for osseointegration process and stable bonding with the bone tissue.

**Keywords:** titanium, hydroxyapatite, sandblasting, implant

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 33-39]



Implanty wykonane z biomateriałów są coraz powszechniej stosowane przez współczesne społeczeństwo. Możemy wyróżnić grupy implantów ortopedycznych, dentystrycznych, kosmetycznych, okulistycznych, kardiologicznych, laryngologicznych itp. Każda z grup charakteryzuje się specyficznymi wymaganiami mechanicznymi, fizycznymi i chemicznymi, które stawia się biomateriałom w danym zastosowaniu. Ponadto, z uwagi na szkodliwość wielu pierwiastków i związków, grupa możliwych do zastosowania materiałów jest znacznie ograniczona i tylko nieliczne mogą przebywać przez długi czas w organizmie [1,2].

W przypadku implantów zastępujących tkanki kostne, stosowane są biomateriały metalowe takie jak: stale austenityczne, stopy kobaltu, tytanu, oraz spieki ceramiczne. Tytan z uwagi na swoją wyjątkową zdolność do osteointegracji oraz biozgodność jest jednym z najczęściej stosowanych biomateriałów metalowych. Pomimo dobrych właściwości CP Ti (tytanu technicznego), wciąż są prowadzone badania nad jego udoskonaleniem. Z uwagi na właściwości mechaniczne oraz biozgodność tworzy się liczne stopy z pierwiastkami takimi jak Al, V, Nb, Zr, Ta, Mo, Ni, Pd. Z uwagi na zdolność i szybkość osteointegracji implantu w organizmie prowadzi się liczne procesy modyfikacji konstrukcji oraz jakości powierzchni takie jak: modyfikacja kształtu implantu, zwiększanie chropowatości powierzchni, modyfikowanie składu chemicznego poprzez osadzanie cząstek innych materiałów bądź implantacji jonów [3-7].

Zastosowanie procesu piaskowania biomateriałów hydroksyapatytem (HA) przynosi podwójną korzyść. Powierzchni implantu zostaje w ten sposób nadana właściwa topografia, która sprzyja rozwojowi i utrzymaniu komórek osteoblastów w początkowym okresie po implantacji oraz mechanicznej stabilizacji implantu [8]. Dodatkowo na powierzchni implantu zostają mechanicznie osadzone cząstki HA, który jako minerał stanowi ponad 90% budulca kości. HA w znaczącym stopniu przyspiesza proces osteointegracji i jest szeroko stosowany w praktyce na pokrycia implantów [9]. Piaskowanie z uwagi na prostotę procesu jest najczęściej stosowaną w praktyce metodą uzyskiwania HA na powierzchni implantów. Do innych metod można zaliczyć osadzanie biomimetyczne, rozpylanie termiczne, rozpylanie jonowe, laserową ablację, elektroforetyczne osadzanie oraz metodę zol-żel [10]. Powierzchnie modyfikowane hydroksyapatytem są szeroko stosowane i zapewniają blisko 100% skuteczność prawidłowego przyjęcia implantu oraz jego osteointegracji w ciele ludzkim.

Aby móc prawidłowo ocenić wpływ zastosowanej metody modyfikacji powierzchni biomateriału na jego potencjalne zachowanie w organizmie, konieczne jest przeprowadzenie cyklu badań pozwalających na wyznaczenie składu chemicznego i fazowego powierzchni, morfologii powierzchni, odporności korozyjnej oraz biozgodności [11].

W poniższej pracy przedstawiono wyniki badań piaskowania hydroksyapatytem tytanu zrealizowane we współpracy z Fundacją Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, produkującego system implantów dentystrycznych Osteoplant.

## Materialy i metody

Piaskowanie przeprowadzono na podłożu tytanu o czystości 99,6% wyciętym z pręta  $\varnothing 10$  (Goodfellow). Powierzchnię czołową spolerowano do uzyskania chropowatości  $R_a = 3$  nm, a następnie piaskowano HA w wytwórni implantów Fundacji Uniwersytetu Medycznego, z wykorzystaniem parametrów procesu systemu Osteoplant. Ziarno użyte podczas piaskowania było mieszaniną HA/TCP o wymiarach  $300 \pm 600$   $\mu\text{m}$ . Ciśnienie robocze piaskarki wynosiło 6 atm.

## Introduction

In the last time, implants made with proper biomaterials are more commonly used by the modern people. We can divide implants into few groups, i.e.: orthopedic, dental, cosmetic, optical, cardiologic and laryngological implants. Each of this group is characterized of specific mechanical, physical and chemical properties, respective for given applications. Taking into accounts negative effect of many elements and compounds, a (bio)materials number, which can be long time used in living body, is very limited [1,2].

In the case of hard tissue implants usually metallic biomaterials are used, i.e. stainless steels, cobalt and titanium alloys as well as ceramic materials. Among all metallic materials titanium has the best biocompatibility and provides best osseointegration of the implant within the human body. Although the commercially pure titanium (CP Ti) has very good properties, alloys with additives of Al, V, Nb, Zr, Ta, Mo, Ni, Pd are composed, which provide highest strength, good corrosion resistance and biocompatibility. Taking into account implant osseointegration ability, their few modifications are required, related to construction as well as surface state (roughness, chemical composition – particles deposition or ions implantation) [3-7].

Application of sandblasting with using of hydroxyapatite (HA) particles results in double benefit. The implant after the treatment has required topography, which results in better bone cells adhesion, proliferation as well as better mechanical fixation in the bone [8]. Additionally on the implant surface are mechanically deposited HA particles, which states more than 90% of substance of the natural bone. Hydroxyapatite (as well as TCP) accelerate osseointegration process and hence it is commonly used as the surface layer (coating) material in hard tissue implant applications [9], providing almost 100% efficiency of implant acceptance by human body.

The sandblasting, due to its simplicity, is the most promising in HA deposition on the implant surface. The other methods of HA deposition are: biomimetic, thermal and ion spraying, laser ablation, electrophoretic and sol-gel [10].

Many research methods must be applied before proper biomaterials applications in the human body. So, the chemical and phase composition, surface morphology, corrosion resistance and biocompatibility tests are required before introduction new biomaterials into production [11].

In this work we present results of HA particles sandblasting of the mechanically polished Ti surface. The research was done with cooperation with Foundation of the Poznan University of Medical Sciences, producer of the Osteoplant dental system.

## Materials and Methods

Sandblasting was done on the Ti surface with 99.6% purity (Goodfellow,  $\varnothing 10$  mm rod). The samples were polished up to roughness  $R_a = 3$  nm and then sandblasting was done using HA powder. The sandblasting process was realized in Foundation of the Poznan University of Medical Sciences. The particles used for the surface roughening were a mixture of HA/TCP with size in the range  $300 \pm 600$   $\mu\text{m}$ . The applied sandblasting pressure was equal to 6 atm. We have prepared surfaces with fresh/new (unused) as well as used (after blasting of 300 implants) HA/TCP particles.

The surfaces after sandblasting were investigated using stereoscopic microscope and morphology with VegaTescan SEM. Veeco Wyko<sup>®</sup> NT1100 optical profiler was applied for the surface geometry characterization at 3 different magnifications. The following 2D standard roughness parameters were estimated:

Piaskowanie przeprowadzono stosując nieużywany (świeży) oraz używany (po wypiękowaniu 300 elementów) HA.

Powierzchnię piaskowaną zbadano makroskopowo mikroskopem stereoskopowym, natomiast morfologię powierzchni mikroskopem SEM VegaTescan. Stosując profilometr optyczny Veeco Wyko® NT1100 przy trzech powiększeniach, wyznaczono następujące parametry powierzchni 2D:

- $R_a$  - średnie arytmetyczne odchylenie profilu od linii średniej,
- $R_q$  - średnie kwadratowe odchylenie profilu (RMS),
- $R_p$  - wysokość najwyższego wzniesienia profilu,
- $R_v$  - głębokość najniższego wgłębienia profilu,
- $R_z$  - największa wysokość profilu,
- $R_t$  - całkowita wysokość profilu,
- $R_{sk}$  - współczynnik asymetrii profilu,
- $R_{ku}$  - współczynnik spłaszczenia profilu.

oraz parametry hybrydowe powierzchni 3D:

- $S_{dr}$  - współczynnik rozwiniętego pola międzyfazowego,
- $S_{dq}$  - parametr nachylenia średniokwadratowego,
- $S_{sc}$  - średnie arytmetyczne krzywizny wierzchołka.

Badania korozyjne przeprowadzono metodą potencjodynamiczną w płynie Ringera w temperaturze 21°C z szybkością skanowania 0,5 mV/s w zakresie potencjałów od -1 do 3 V, względem potencjału obwodu otwartego (OCP).

## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzona obserwacja makroskopowa z użyciem mikroskopu stereoskopowego, uwioczniała bardziej rozbudowaną powierzchnię próbki piaskowanej nieużywanym HA. Zaobserwowano również większą liczbę silnie umocowanych wtrąceń cząstek HA na powierzchni piaskowanej nieużywanym HA w stosunku do piaskowanej używanym HA.

Topografia powierzchni zaobserwowana przy użyciu mikroskopu SEM świadczy o różnym zachowaniu się cząstek podczas piaskowania nieużywanym i używanym HA. Nieużywane cząstki HA podczas procesu wbijały się w tytan a następnie kruszyły pozostawiając odłamki na piaskowanej powierzchni (RYS. 1a,b). Piaskowanie przeprowadzone z użyciem używanego HA nie naruszyło powierzchni tytanu w takim samym stopniu, zaobserwowano dużo mniej rozwiniętą morfologię, brak również wyraźnie widocznych wtrąceń na powierzchni (RYS. 1c,d). Powodem tego zjawiska jest fakt, iż cząstki po wypiękowaniu odpowiedniej liczby elementów (300) zmniejszają swoją wielkość na skutek kruszenia, w wyniku czego siła oddziaływania mechanicznego na powierzchnię jest mniejsza. W praktyce problem ten częściowo rozwiązano poprzez wydłużenie czasu piaskowania.

Powierzchnia Ti piaskowana nieużywanym HA jest bardziej rozwinięta i korzystna w zastosowaniach biomedycznych, o czym świadczą parametry powierzchni zamieszczone w TABELI 1. Powierzchnia taka ma wyższą wartość chropowatości ( $R_a$ ) i jest bardziej symetryczna ( $R_{sk}$ ), co świadczy o dużej liczbie regularnie występujących zagłębień. Wyższe wartości parametru  $R_t$  dla powierzchni piaskowanej używanym HA przy powiększeniu 5x i 20x wynika z faktu, iż podczas procesu wbijały się w tytan całe ziarna nie ulegając dalszemu wykruszaniu. Ilość wbitych ziaren jest jednak za mała aby efekt ten był korzystny. Efekt opisanego zjawiska widać na RYS. 2c. Na zdjęciach SEM (RYS. 1) oraz na obrazach topografii powierzchni 3D z profilometru optycznego (RYS. 2), również widać bardziej rozwiniętą morfologię powierzchni piaskowanych nieużywanym HA. Wykonanie profili obydwu powierzchni piaskowanych potwierdziło uzyskane dane (RYS. 3, 4) – w powierzchni piaskowanej nieużywanym HA widać wyraźniejsze i większe wzniesienia oraz zagłębienia. Profil powierzchni piaskowanej używanym HA posiada również dostatecznie rozwiniętą morfologię powierzchni dla prawidłowego przebiegu osteointegracji.

- $R_a$  - arithmetical mean roughness,
- $R_q$  - root mean squared (RMS),
- $R_p$  - maximum peak height,
- $R_v$  - maximum valley depth,
- $R_z$  - ten point mean roughness,
- $R_t$  - maximum height of the profile,
- $R_{sk}$  - skewness,
- $R_{ku}$  - kurtosis,

and hybrid 3D parameters were estimated, too:

- $S_{dr}$  - RMS surface slope,
- $S_{dq}$  - developed interfacial area ratio,
- $S_{sc}$  - mean summit curvature.

The corrosion resistance of the samples was investigated in Ringer's solution (21°C) using Solartron 1285 potentiostat working in potentiodynamic mode with scan speed 0.5 mV/s in the potential range from -1 to +3 V vs. open circuit potential (OCP).

## Results and Discussions

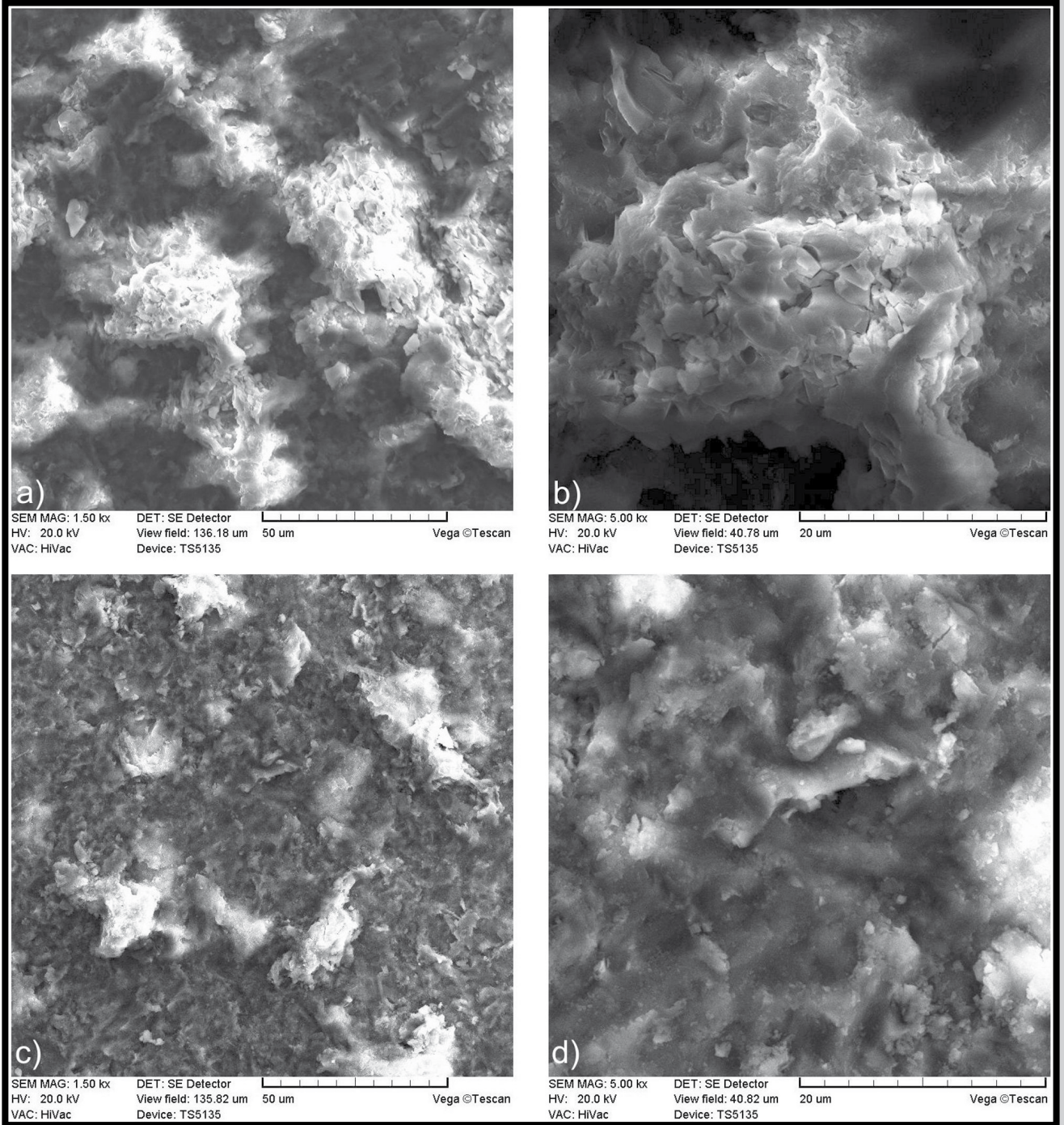
Stereoscopic microscope observations (not shown here) gave us information, that surface blasted with unused fresh HA is more modified in comparison to surface blasted with used HA. Additionally in the surface blasted with fresh HA, the particles (HA/TCP) were more strongly embedded in the surface in comparison to surface blasted with used many times HA.

The surface morphology observed by SEM clearly shows differences after blasting with different HA particles. Unused fresh HA particles during the blasting process stick into the Ti surface. The HA particles crushed into smaller ones leaving a small pieces on the surface (FIG. 1a,b). The blasting with 300 times used HA particles did not affect the surface in the same way and surface has significantly much less developed morphology, without clearly visible HA inclusions on the surface (FIG. 1c,d). The reason for this phenomenon is the fact, that during sandblasting of 300 implants, the particles reduce their size as a result of crushing. So, the force exerted through particles on the surface is significantly lower in comparison to new unused particles. In the practice the problem can be solved by sandblasting in extra time.

Surface sandblasted with using fresh HA is more modified and more accurate for biomedical applications, which is clearly shown in TABLE 1. The surface after using fresh HA has higher roughness parameters (for example  $R_a$ ) and is more symmetric ( $R_{sk}$ ), which means that the surface is composed from the large number regularly distributed pits and valleys. The higher  $R_t$  parameter for the surface sandblasted with 300 times used HA (see 5x and 20x magnifications) is a consequence of a whole grains hitting onto the surface without crushing. The number of included particles is too small for significant surface improving. In FIG. 1 and FIG. 2 there is clearly visible, that surface sandblasted with fresh HA powder results in more modified morphology in comparison to sandblasted one with many times used HA. The results are confirmed on the surfaces profiles (FIGs. 3 and 4) – in the surface sandblasted using fresh HA we can see more visible and bigger hillocks and valleys. For this surface, we believe that the evaluated morphology is quite accurate for proper osseointegration process.

The polarization curves recorded during corrosion tests in Ringer solution are shown in FIG. 5. The corrosion current density  $I_{corr}$  and corrosion potential  $E_{corr}$  values of the sandblasted and polished surfaces are shown in TABLE 2. Both sandblasted surfaces have comparable corrosion resistance – the recorded differences are within the standard deviation and are the consequence of increase (evaluation) of the true surface area after the process.





**RYS. 1.** Zdjęcia SEM powierzchni piaskowanej nieużywanym HA (a, b – różne powiększenia) oraz używanym HA (c, d – różne powiększenia).

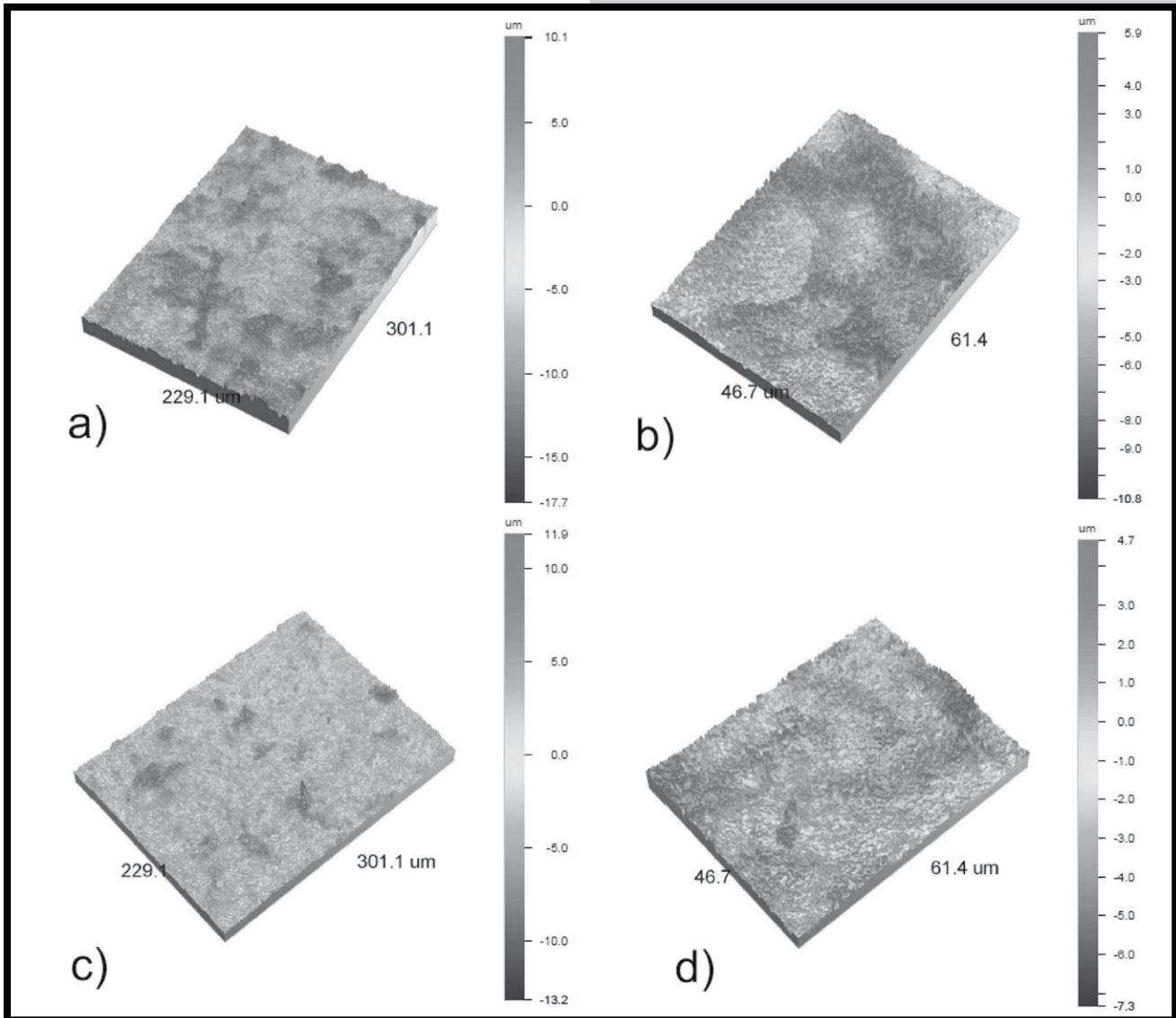
**FIG. 1.** SEM pictures of the sandblasted surface after using fresh unused HA (a, b – different magnifications) and after using old 300 times used HA (c, d – different magnifications).

**TABELA 1.** Parametry powierzchni piaskowanej nieużywanym (a) oraz używanym (b) HA; wartości średnie z 3 pomiarów.

**TABLE 1.** Roughness and topography surface parameters for surface sandblasted of fresh (a) and used (b) HA; the average values of 3 measurements.

Powiększenie Magnification	$R_a$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_q$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_p$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_v$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_z$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_t$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_{sk}$	$R_{ku}$	$S_{dr}$ (%)	$S_{dq}$ (deg)	$S_{sc}$ ( $\text{mm}^{-1}$ )
a: 5x	1.53	2.10	18.13	-15.40	28.27	33.52	0.26	6.94	47.37	46.76	722.01
a: 20x	1.43	1.96	10.90	-13.01	21.19	23.91	0.56	5.51	277.64	70.38	6.28
a: 100x	1.44	1.90	8.54	-10.49	16.28	19.03	0.13	3.98	2085.16	82.84	82.16
b: 5x	1.17	1.69	27.52	-5.88	45.84	58.15	-0.88	23.18	29.60	38.59	455.52
b: 20x	1.17	1.61	13.09	-11.74	19.79	24.83	0.53	6.94	186.51	66.18	5.55
b: 100x	0.91	1.20	4.68	-6.99	10.66	11.68	-0.35	4.54	959.02	79.13	58.63





**RYS. 2. Topografia 3D powierzchni piaskowanej nieużywanym HA – pow. 20x (a), nieużywanym HA – pow. 100x (b), używanym HA – pow. 20x (c) oraz używanym HA – pow. 100x (d).**

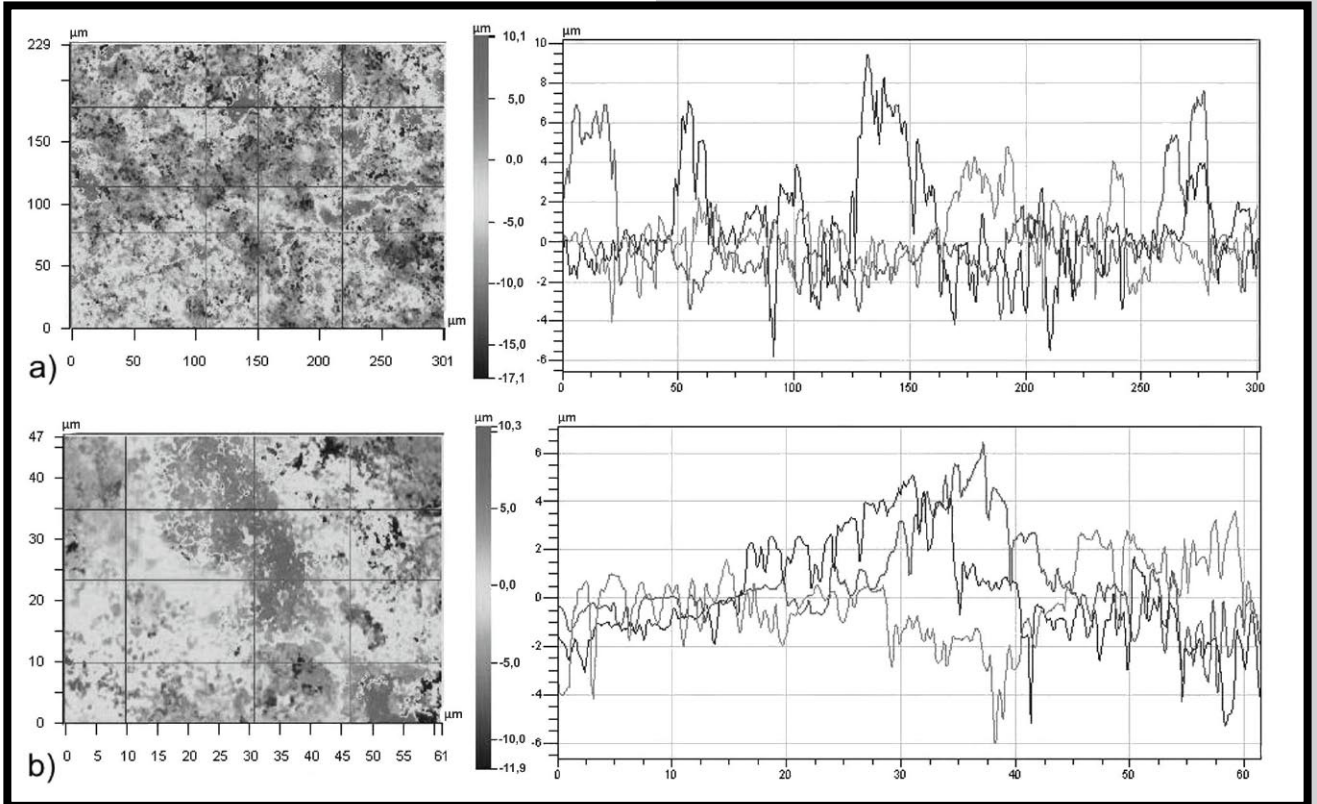
**FIG. 2. Optical profiler 3D topography of the surface sandblasted with using fresh HA – magn. 20x (a), magn. 100x (b), and with using 300 times used HA – magn. 20x (c), magn. 100x (d).**

Krzywe polaryzacji uzyskane podczas badania odporności korozyjnej w płynie Ringera zostały zamieszczone na RYS. 5. Wyniki pomiaru gęstości prądu korozyjnego oraz potencjału korozyjnego powierzchni piaskowanych oraz polerowanej zamieszczono w TABELI 2. Powierzchnie piaskowane mają zbliżoną do siebie odporność korozyjną – zmierzone różnice są na poziomie błędów wynikających ze zwiększenia powierzchni próbek na skutek zastosowanej obróbki. Odporność korozyjna próbek piaskowanych HA jest nieznacznie gorsza od odporności korozyjnej Ti 99,6% – charakteryzują się one wyższym prądem oraz niższym potencjałem korozyjnym, jednakże powierzchnia czystego tytanu po polerowaniu mechanicznym charakteryzuje się mniejszą chropowatością, co ma wpływ na uzyskane wyniki.

The corrosion resistance of the both HA sandblasted surfaces is slightly worse in comparison to the initial polished surface – the both have higher corrosion current density and more negative corrosion potential. On the other hand, the surface of polished titanium is more smooth with significantly lower roughness, which can affect better corrosion results.

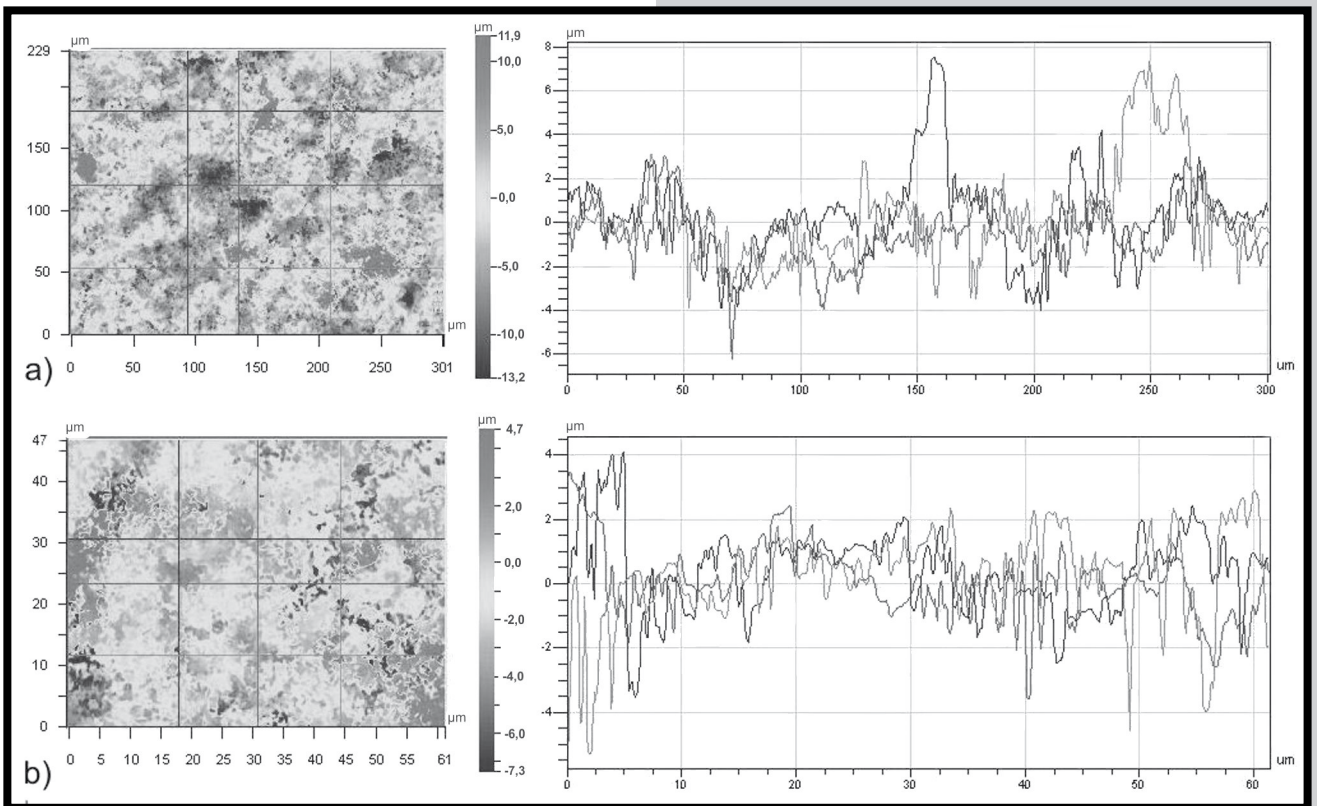
## Conclusions

Sandblasting of the Ti surface with using of fresh HA particles gives better results (in comparison to 300 times used HA) with respect to biomedical applications in different hard tissue implants (for example dental). In the sandblasted (fresh HA) surface we observed more embedded HA particles and surface morphology is more modified. Surface after sandblasting with using HA particles should support bone cells to growth and give a better implant integration with bone. Sandblasting with different HA particles does not significantly affect the corrosion resistance. The slight deterioration of the corrosion resistance of the sandblasted surfaces in comparison to polished one can be related to increase in surface area and presence of HA particles which have different electrochemical potential.



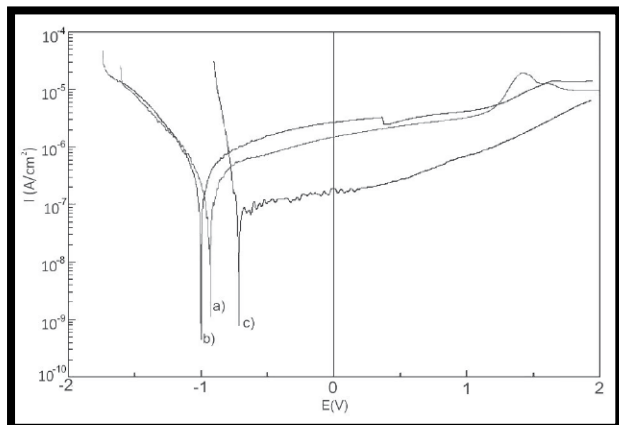
**RYS. 3.** Topografia powierzchni piaskowanej nieużywanym HA wraz z trzema profilami przy powiększeniu 20x (a) oraz 100x (b).

**FIG. 3.** Optical profiler 3D topography of the surface sandblasted with fresh HA with respective 3 profile lines at 20x (a) and 100x (b) magnification.



**RYS. 4.** Topografia powierzchni piaskowanej używanym HA wraz z trzema profilami przy powiększeniu 20x (a) oraz 100x (b).

**FIG. 4.** Optical profiler 3D topography of the surface sandblasted of 300 times used HA with respective 3 profile lines at 20x (a) and 100x (b) magnification.



**RYS. 5.** Krzywe polaryzacji dla Ti 99,6% piaskowanego świeżym HA (a), piaskowanego używanym HA (b) oraz niepiaskowanego (c).

**FIG. 5.** Corrosion polarization curves for the Ti 99.6% sandblasted with using fresh HA (a), sandblasted with using old 300 times used HA (b) and for comparison for polished one (c).

## Wnioski

Piaskowanie powierzchni Ti nieużywanym proszkiem HA daje lepsze efekty, biorąc pod uwagę zastosowania biomedyczne w systemach implantacyjnych, w porównaniu do powierzchni piaskowanej proszkiem używanym. Na takiej powierzchni znajduje się więcej cząstek HA, a morfologia powierzchni jest bardziej rozwinięta. Powierzchnie takie stanowią lepsze podłoże dla rozwoju i utrzymania komórek kostnych – osteoblastów, oraz późniejszej integracji z kością. Różnice w materiale użytym do piaskowania nie wpływają znacząco na odporność korozyjną. Spadek odporności korozyjnej w porównaniu do czystego Ti jest niewielki i wynika głównie z powodu zwiększenia powierzchni właściwej oraz obecności cząstek HA o odmiennym potencjale elektrochemicznym.

## Podziękowania

*Badania wykonano przy współpracy z Fundacją Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – producentem systemu implantacyjnego Osteoplant. Prace wykonano w ramach Działalności Statutowej Instytutu Inżynierii Materiałowej PP.*

## Piśmiennictwo

- [1] Navarro M., Michiardi A., Castaño O., Planell J.A.: Biomaterials in Orthopedics. Journal of the Royal Society Interface 5, 27 (2008) 1137-1158.
- [2] Richards R.G., Moriarty T.F., Miclau T., McClellan R.T., Grainger D.W.: Advances in biomaterials and surface technologies. Journal of Orthopedic Trauma 26, 12 (2012) 703-707.
- [3] Harvey A.G., Hill E.W., Bayat A.: Designing implant surface topography for improved biocompatibility. Expert Review of Medical Devices 10, 2 (2013) 257-267.
- [4] Chunxiang C., BaoMin H., Lichen Z., Shuangjin L.: Titanium alloy production technology, market prospects and industry development. Materials and Design 32 (2011) 1684-1691.
- [5] Textor M.: Titanium in Medicine. Berlin: Springer 2001, 171-230.
- [6] Niinomi M., Nakai M., Hieda J.: Development of new metallic alloys for biomedical applications. Acta Biomaterialia 8, 11 (2012) 3888-3903.

**TABELA 2.** Wartości gęstości prądu korozyjnego  $I_{corr}$  i potencjału korozyjnego  $E_{corr}$  dla tytanu przed i po piaskowaniu.

**TABLE 2.** Corrosion current density  $I_{corr}$  and corrosion potential  $E_{corr}$  Ti before and after HA sandblasting.

Parametr Parameter	Piaskowanie świeżym HA Sandblasted fresh HA	Piaskowanie używanym HA Sandblasted used HA	Bez piaskowania Without sandblasting
$I_{corr}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$8.97 \cdot 10^{-8}$	$6.63 \cdot 10^{-8}$	$1.87 \cdot 10^{-8}$
$E_{corr}$ (V)	- 0.932	- 1.00	- 0.716

## Acknowledgments

*The research was done with cooperation with Foundation of the Poznan University of Medical Sciences, producer of the Osteoplant dental system. Work was done within the statutory activity of the Institute of Materials Science and Engineering Poznan University of Technology.*

## References

- [7] Puleo D.A., Thomas M.V.: Implant Surfaces. Dental Clinics of North America 50, 3 (2006) 323-336.
- [8] Puleo D.A., Nanci A.: Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 20, 23-24 (1999) 2311-2321.
- [9] Yamada M., Ueno T., Tsukimura N., Ikeda T., Nakagawa K., Hori N., Suzuki T., Ogawa T.: Bone integration capability of nanopolymorphic crystalline hydroxyapatite coated on titanium implants. International Journal of Nanomedicine 7 (2012) 859-873.
- [10] Yang Y., Kim K., Onga J.: A review on calcium phosphate coatings produce using a sputtering process-an alternative to plasma spraying. Biomaterials 26 (2005) 327-337.
- [11] Jakubowicz J., Adamek G., Jurczyk M.U., Jurczyk M.: 3D surface topography study of the biofunctionalized nanocrystalline Ti-6Zr-4Nb/Ca-P. Materials Characterization 70 (2012) 50-62.



# SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI WARSTW WĘGLOAZOTKU KRZEMU NA POLIETERO- ETEROKETONIE

ANNA MAŁEK<sup>1\*</sup>, JADWIGA KONEFAŁ-GÓRAL<sup>1</sup>,  
STANISŁAWA KLUSKA<sup>1</sup>, KATARZYNA TKACZ-ŚMIECH<sup>1</sup>,  
STANISŁAWA JONAS<sup>1</sup>, TADEUSZ WIERZCHOŃ<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> POLITECHNIKA WARSZAWSKA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

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

## Streszczenie

Warstwy węglazotku krzemu posiadają szereg interesujących właściwości, w tym mechanicznych i biologicznych. Jednak synteza tego typu warstw na podłożach polimerowych jest bardzo trudnym zadaniem, ze względu na niską energię powierzchniową polimerów oraz ich wrażliwość na działanie podwyższonych temperatur. W tej pracy pokazujemy, że jest to możliwe poprzez zastosowanie metody chemicznego osadzania z fazy gazowej ze wspomaganie plazmy generowanej falami o częstotliwości radiowej (RF PACVD, 13,56 MHz, 400 W). Strukturę otrzymanych warstw analizowano przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Wykazano obecność ugrupowań typu Si-C, Si-N, C-N, C=N, C=C, C≡N, Si-H i C-H. Badania tribologiczne i biologiczne pokazały, że warstwa  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  ma dobre właściwości ślizgowe, a otrzymany materiał kompozytowy, podłoże PEEK-warstwa  $\text{a-C:N:H/SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ , charakteryzuje się niższym współczynnikiem tarcia, wyższą odpornością na zużycie oraz lepszą biogodnością w porównaniu do niemodyfikowanego polieteroeteroketonu. Wysoką adhezję warstwy do podłoża uzyskano poprzez odpowiednie przygotowanie osadzonej powierzchni na drodze trawienia w plazmie argonowej. Trawienie jonowe powoduje bowiem wzrost chropowatości oraz energii powierzchniowej modyfikowanych podłoży. Również wytworzenie warstwy pośredniej, nie zawierającej krzemu ( $\text{a-C:N:H}$ ), przyczyniło się do osiągnięcia wysokiej adhezji pomiędzy warstwą  $\text{a-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  a polimerowym podłożem.

**Słowa kluczowe:** warstwy  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ , polieteroeteroketon, PACVD, biomateriały

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 40-44]

## Wprowadzenie

Odpowiedź organizmu na zaimplantowany biomateriał stanowi podstawowe kryterium decydujące o możliwych zastosowaniach. Biogodność i biotolerancja biomateriału jest przy tym w dużej mierze zależna od fizykochemicznego stanu powierzchni kontaktu. Dlatego jeden z obszarów badań nad poszukiwaniem bezpiecznych i niezawodnych materiałów do zastosowań w implantologii dotyczy możliwości modyfikowania warstwy wierzchniej materiału poprzez stosowanie technologii warstwowych.

# SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SILICON CARBONITRIDE LAYERS ON POLYETHER- ETHERKETONE

ANNA MAŁEK<sup>1\*</sup>, JADWIGA KONEFAŁ-GÓRAL<sup>1</sup>,  
STANISŁAWA KLUSKA<sup>1</sup>, KATARZYNA TKACZ-ŚMIECH<sup>1</sup>,  
STANISŁAWA JONAS<sup>1</sup>, TADEUSZ WIERZCHOŃ<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING,  
UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSAW, POLAND

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

## Abstract

Silicon carbonitride layers have many interesting properties, including mechanical and biological ones. However obtaining such layers on polymeric substrate is very difficult due to low surface energy of polymers and their sensitivity to elevated temperatures. In this work it is shown that it is possible by application of plasma assisted chemical vapour deposition, where plasma is generated by radiowaves (RF PACVD, 13.56 MHz, 400 W). The structure of the layers was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The presence of Si-C, Si-N, C-N, C=N, C=C, C≡N, Si-H and C-H bonds was shown. Tribological and biological studies revealed that the  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layer has good sliding properties and obtained composite material PEEK/a-C:N:H/ $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  exhibits lower friction coefficient, higher wear resistance and better biocompatibility compared to the unmodified polyetheretherketone. Good adhesion between the layer and the substrate has been achieved by a proper preparation of the substrate surface by subjecting it to the Ar plasma etching. Such pre-treatment caused increment of surface energy and roughness parameters of modified polymers. Formation of the intermediate carbon nitride layer also contributed to ensuring high adhesion between a- $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layer and polymeric substrate.

**Keywords:**  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layers, polyetheretherketone, PACVD, biomaterials

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 40-44]

## Introduction

A response of living tissues to the implanted biomaterial is particularly crucial in terms of its future applications. Biocompatibility and biotolerance depend, in large part, on the physicochemical state of the contact surface. This is why the studies aimed at searching safe and reliable biomaterials often concern layer technologies. This research direction appears particularly successful when the materials for contact with blood are designed, in the case of which high nontrombogenicity, hemocompatibility and good tribological properties are needed [1]. At present, good effects are obtained by application of carbon layers [2-5]. Unfortunately, such layers often exhibit poor adhesion to the substrate and a tendency to cracking and spalling caused by internal compressive stresses [6,7].

Ten kierunek badań przynosi dobre efekty szczególnie w odniesieniu do materiałów przeznaczonych do kontaktu z krwią, w przypadku których pożądana jest nie tylko wysoka atrombogenność i hemozgodność, ale również dobre właściwości tribologiczne [1]. Obecnie efekty takie uzyskuje się przez stosowanie warstw węglowych [2-5]. Jednak na skutek naprężeń własnych, tego typu warstwy wykazują słabą przyczepność do podłoża, ulegają spękaniami i w końcu odpadają [6,7]. Zmniejszenie naprężeń można wprowadzić uzyskując poprzez modyfikację warstw węglowych azotem, jednak wprowadzenie tego pierwiastka do struktury warstwy węglowej powoduje jej rozluźnienie, czemu towarzyszy obniżenie odporności na korozję [7,8]. Drugi rodzaj warstw, stosowanych w przypadku materiałów do kontaktu z krwią, stanowią uwodornione amorficzne warstwy węgla krzemu [9,10]. Warstwy te wykazują wysoką atrombogenność i biologiczną zgodność z krwią oraz są odporne na korozję biologiczną. Ich wadą jest wysoka twardość i kruchość, które często ograniczają ich zastosowanie [5,10].

Celem tej pracy jest wykazanie, że amorficzne warstwy uwodornionego węglazotku krzemu, których właściwości są połączeniem właściwości warstw węglowych, azotku węgla i warstw węgla krzemu, osadzone na polieteroeteroketonie, modyfikują jego właściwości biologiczne i tribologiczne, w aspekcie zastosowań w roli atrombogenicznego biomateriału. Przedstawione zostaną warunki formowania tego typu warstw w procesie chemicznego osadzania z fazy gazowej ze wspomaganiami plazmy (PACVD).

## Material i metody

Warstwy węglazotku krzemu,  $a\text{-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ , otrzymano z zastosowaniem metody chemicznego osadzania z fazy gazowej ze wspomaganiami plazmy generowanej falami radiowymi o częstotliwości 13,56 MHz, 400 W. Syntezę prowadzono w reaktorze RF PACVD firmy Elettrorava. Jako podłoża użyto krążki z polieteroeteroketonu (PEEK) o średnicy 15 mm i grubości 2 mm. Przed procesem osadzania próbki przemyto alkoholem izopropylowym i poddano trawieniu w plazmie argonowej. Właściwe osadzanie warstwy prowadzono w dwóch etapach. W pierwszym wytworzono warstwę przejściową typu  $a\text{-C:N:H}$ , charakteryzującą się bardzo dobrą adhezją do podłoża. W drugim etapie osadzenia została warstwa  $a\text{-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ . Warunki procesu trawienia i osadzania przedstawiono w TABELI 1. Dodatkowo, na potrzeby badań strukturalnych, otrzymano warstwę  $a\text{-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  na monokrystalicznym krzemie Si (001). Zastosowano te same warunki, co w przypadku warstw na PEEK (z pominięciem pierwszego etapu). Badania strukturalne oparto na analizie widma transmisyjnego FTIR, zarejestrowanego w zakresie  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . Pomiar wykonano przy użyciu spektrofotometru Bio-Rad FTS 60V (rezolucja  $2\text{ cm}^{-1}$ , 1024 skany).

Ocenę efektów trawienia podłoża PEEK dokonano poprzez pomiar energii powierzchniowej wyjściowych i trawionych próbek. Zastosowano metodę opartą o znajomość kątów zwilżania dla dwóch wzorcowych cieczy o różnej polarności (woda, diiodometan). Dodatkowo za pomocą profilometru T500 Hommelwerke wyznaczono parametry profilu chropowatości:  $R_a$  – średnią arytmetyczną profilu chropowatości,  $R_t$  – maksymalną wysokość pomiędzy najwyższym szczytem a najniższą doliną oraz  $R_z$  – arytmetyczną średnią wysokości pięciu najwyższych wzniesień i pięciu najniższych wgłębień profilu chropowatości dla wyjściowego PEEK oraz trawionego w plazmie argonowej. Pomiar wykonano dla trzech próbek z każdej serii, trzykrotnie dla każdej z nich. Adhezję dwuwarstwowego układu  $a\text{-C:N:H/a-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  do PEEK poddano ocenie w teście zarysowania, przeprowadzonym przy pomocy urządzenia Micro-Combi-Tester.

A reduction of the stresses can be achieved in carbon layers doped with nitrogen, but the nitrogen addition relaxes the structure and decreases corrosion resistance [7,8]. Latter type of layers designed for contact with blood includes hydrogenated amorphous silicon carbide layer. These layers are known for their high anti-thrombogenicity, blood compatibility and good resistance to biological and chemical corrosion [9,10]. A use of silicon carbide layers is often limited because of their high hardness and fragility [5,10].

A purpose of this work is to show that amorphous layers of silicon carbonitride, which join properties of carbon, carbon nitride and silicon carbide layers, when deposited on polyetheretherketone, modify its tribological and biological properties. We present the results concerning technology of such layers. It is shown that high adhesion of the layer to the substrate can be achieved by plasma assisted chemical vapor deposition (PACVD).

## Materials and Methods

Silicon carbonitride layers,  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ , were obtained by plasma assisted chemical vapor deposition method in which plasma was generated by radiowaves (13.56 MHz, 400 W). The synthesis was carried out in RF PACVD reactor, produced by Elettrorava. The layers were deposited on polyetheretherketone discs (PEEK) of the diameter equal to 15 mm and the thickness 2 mm. Before the deposition, the substrates were cleaned with isopropyl alcohol and then subjected to argon plasma etching. In the first stage of deposition, the intermediate carbon nitride layer,  $a\text{-C:N:H}$ , was synthesised to enhance the adhesion of the layer to the polymer substrate. In the second stage, the silicon carbonitride layer,  $a\text{-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ , was deposited. The processing conditions are given in TABLE 1. Additionally, for structural studies, the single  $a\text{-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layers were deposited on monocrystalline silicone Si(001). The same processing conditions as in the case of the layers on PEEK were applied (excluding stage 1). Structural studies were based on FTIR transmission spectrum registered within wavenumbers  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . The measurements were made with application of Bio-Rad FTS 60V spectrophotometer with the resolution  $2\text{ cm}^{-1}$ . 1024 scans were taken for the sample.

The effect of PEEK etching was evaluated by the surface-energy measurements. For this purpose contact angles for water and diiodomethane on PEEK were determined. Additional information concerning surface-etching effects was derived from roughness profile measurements made with T500 Hommelwerke profilometer.

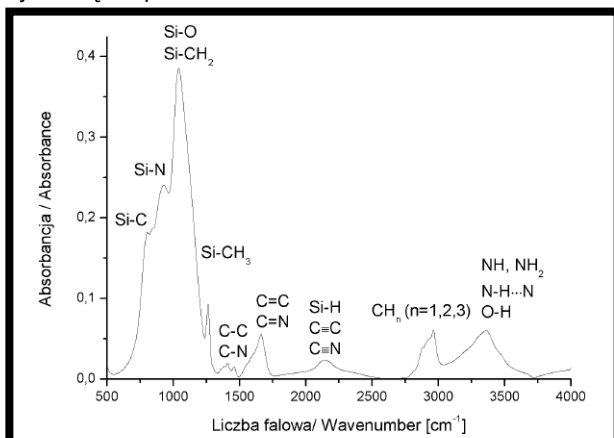
**TABELA 1. Warunki otrzymywania warstw  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  w układzie RFCVD.**  
**TABLE 1. Conditions of  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layer' formation in RFCVD system.**

		Przepływ gazów Gas flow [sccm]				P [W]	p [Pa]	T [°C]	t [min]
		Ar	CH <sub>4</sub>	N <sub>2</sub>	SiH <sub>4</sub>				
Trawienie Etching		200	---	---	---	20	53.3	<30	10
Osadzanie Deposition	a-C:N:H	75	25	104	---	80	53.3	<30	30
	a-SiC <sub>x</sub> N <sub>y</sub> (H)	75	25	104	5	80	53.3	<30	30

Pomiary parametrów tribologicznych wykonano zgodnie z normą ASTM G 99-05, ISO 20808:2004, na tribotesterze typu kula – tarcza. Jako przeciwpróbkę zastosowano kulkę o średnicy 6 mm, wykonaną ze stali łożyskowej o polerowanej powierzchni. Właściwości biologiczne oceniono na podstawie analizy ilościowej płytek krwi oraz w badaniach ekspresji markera aktywacji płytek – P-selektywny (CD62). Wykorzystano metodę cytometrii przepływowej. Testy tribologiczne i biologiczne wykonano dla niemodyfikowanego PEEK oraz dla otrzymanego materiału kompozytowego PEEK\_a-C:N:H/a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H). Do badań wybrano po jednej próbce z każdej serii ponieważ wcześniej przeprowadzone badania nie wykazały istotnych różnic pomiędzy próbkami w obrębie jednej serii.

## Wyniki i dyskusja

Widmo FTIR warstwy a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) na krzemie (RYS. 1) potwierdza obecność węgla, azotu, krzemu oraz wodoru w różnych ugrupowaniach, natomiast poszerzenie i nakładanie się pasm dowodzi, że otrzymano warstwy amorficzne. Szczegółowe przypisanie pasm absorpcji do drgań określonych wiązań przedstawiono na RYS. 1.



**RYS. 1. Widmo FTIR warstwy a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) osadzonej na (001)Si.**

**FIG. 1. FTIR spectrum of a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layer deposited on (001)Si.**

Adhezję warstw do podłoża określono za pomocą scratch testu. Test wykonano stosując węglanik diamentowy Rockwella o promieniu zaokrąglenia 200 μm, przy liniowo narastającym obciążeniu od 0 do 20 N. Badania wykazały, że warstwa SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) jest bardzo dobrze przyczepna do podłoża PEEK. Nawet maksymalne obciążenie nie powodowało całkowitego usuwania warstwy z podłoża. Tak wysoką adhezję między warstwą a podłożem polimerowym udało się osiągnąć dzięki odpowiedniemu przygotowaniu próbki przed procesem osadzania. Polimery charakteryzują się bowiem niską energią powierzchniową i niewielkim stężeniem miejsc aktywnych na powierzchni. To powoduje, że osadzenie dobrze przyczepnej warstwy bezpośrednio na takiej powierzchni jest bardzo trudne. Zastosowanie trawienia jonowego powoduje zarówno zwiększenie energii powierzchniowej podłoża, jak i zwiększenie jego chropowatości (TABELA 2). Towarzyszy temu wielokrotnienie liczby miejsc aktywnych, w których mogą tworzyć się silne wiązania chemiczne pomiędzy atomami warstwy i podłoża. Poprawę adhezji uzyskano również poprzez wytworzenie przejściowej warstwy a-C:N:H. Tego typu warstwy są dobrze przyczepne do polimerów, co wykazano we wcześniejszych badaniach [11]. Ich stosowanie w roli warstwy przejściowej pomiędzy polimerem i warstwą powoduje redukcję naprężeń na granicy warstwa-podłoże.

Three roughness parameters, Ra - arithmetic average of the roughness profile, Rt - maximal difference between the highest peak and lowest valley, and Rz - average height of the roughness profile determined from five highest peaks and five lowest valleys, were measured both for unmodified and etched PEEK. The adhesion of the a-C:N:H/a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layer to PEEK was evaluated in the scratch test performed with Micro-Combi-Tester. The tribological parameters, friction coefficient and wear resistance, were measured using "sphere - shield" type tribotester, in accordance with ASTM standards G 99-05, ISO 20808:2004. A counterpart made of bearing steel of the diameter equal to 6 mm was used. Biological properties were evaluated from the number of platelets and analysis of CD62 expression after incubation in blood under shear stress. The tests were performed by flow cytometry technique. The samples of unmodified PEEK and PEEK with a-C:N:H/a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layer were subject of tribological and biological studies.

## Results and Discussions

The FTIR spectrum recorded for hydrogenated silicon carbonitride deposited on Si(001) (FIG. 1) reveals a presence of Si, C, N and H in various environment. Broadening and overlapping of the bands associates with varying lengths of the bonds and various angles between them (typical for amorphous structure). A detailed assignment of the absorption bands to the vibrations characteristic for the bonds between various atoms is given in FIG. 1.

Adhesion between the layer and PEEK was determined from the scratch test. Rockwell diamond indenter (with a radius of 200 μm) was used. The load linearly increased from 0 N to 20 N. The results confirmed high adhesion of the layer to the substrate. Even the maximum load did not cause total removal of the layer from the substrate. Such high layer adhesion was achieved due to the appropriate sample preparation prior to the deposition. It should be emphasized here that because of low polymer surface energy and low concentration of active sites at the surface, obtaining high adhesion between a layer and polymer is difficult. The more that the process cannot be conducted at elevated temperatures. Therefore ion etching is of crucial meaning for enhancing the adhesion. During etching, both the surface energy and roughness of the substrate are increased (TABLE 2). A change of physicochemical parameters of the substrate surface is accompanied by an increase of a number of active sites, where strong chemical bonds between the atoms from the layer and the substrate atoms can be formed. The present results also confirm that the formation of the transition a-C:N:H layer additionally improves the adhesion, in agreement with our previous research on deposition of carbon nitride on polymers [11].

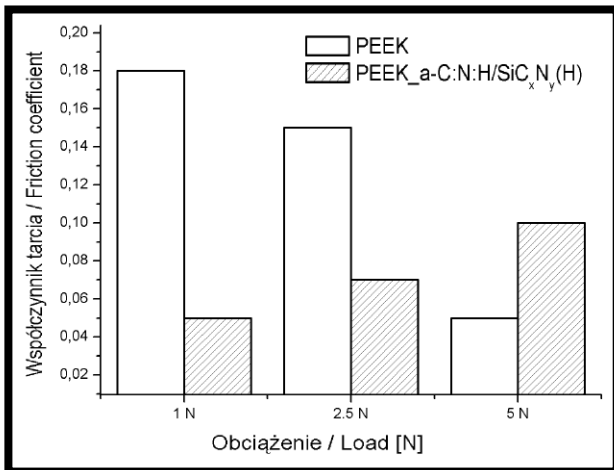
**TABELA 2. Parametry chropowatości i energia powierzchniowa niemodyfikowanego i trawionego PEEK.**

**TABLE 2. Roughness parameters and surface energy for unmodified and etched PEEK.**

		PEEK	PEEK trawiony PEEK etched
Chropowatość Roughness	Ra [μm]	1.40 ± 0.22	1.55 ± 0.16
	Rz [μm]	10.41 ± 1.63	11.68 ± 2.02
	Rt [μm]	12.93 ± 2.23	13.76 ± 2.44
Energia powierzchniowa Surface energy [mJ/m <sup>2</sup> ]		43.74 ± 0.84	50.48 ± 0.92



Badania właściwości tribologicznych próbek obejmowały wyznaczenie współczynnika tarcia podczas ślizgania w ruchu obrotowym oraz odporności na zużycie przez tarcie. Wyniki przedstawione na RYS. 2 potwierdzają, że ze wzrostem obciążenia kulki współczynnik tarcia dla próbki z warstwą rośnie. Odwrótny efekt zaobserwowano dla niemodyfikowanego PEEK. Przy najmniejszym obciążeniu, równym 1 N, największy wpływ na siłę tarcia ma oddziaływanie adhezyjne, które dla niepokrytego polimeru jest szczególnie duże. Warstwa a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) ma bardzo dobre właściwości ślizgowe i dobrze rozdziela współpracujące powierzchnie stalowej kulki i PEEK, w efekcie współczynnik tarcia przy obciążeniu 1 N maleje od wartości 0,18 dla niemodyfikowanego PEEK do 0,05 dla układu PEEK\_a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H). Coraz większe obciążenie powoduje wzrost składowej deformacyjnej siły tarcia, która dla niemodyfikowanego PEEK ogranicza oddziaływanie adhezyjne, a dla PEEK z warstwą powoduje niszczenie powłoki. Odporność na zużycie wyznaczono na podstawie pomiarów wielkości profilu bruzdy powstałej po tarcu kulką stalową. Wyniki zebrane w TABELI 3 potwierdzają, że zużycie próbek z warstwą jest dwukrotnie mniejsze niż próbek niemodyfikowanych.



**RYS. 2. Współczynnik tarcia w funkcji obciążenia mierzony dla niemodyfikowanego PEEK i PEEK z warstwą a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H).**  
**FIG. 2. Friction coefficient measured under various load for unmodified PEEK and PEEK with a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layer.**

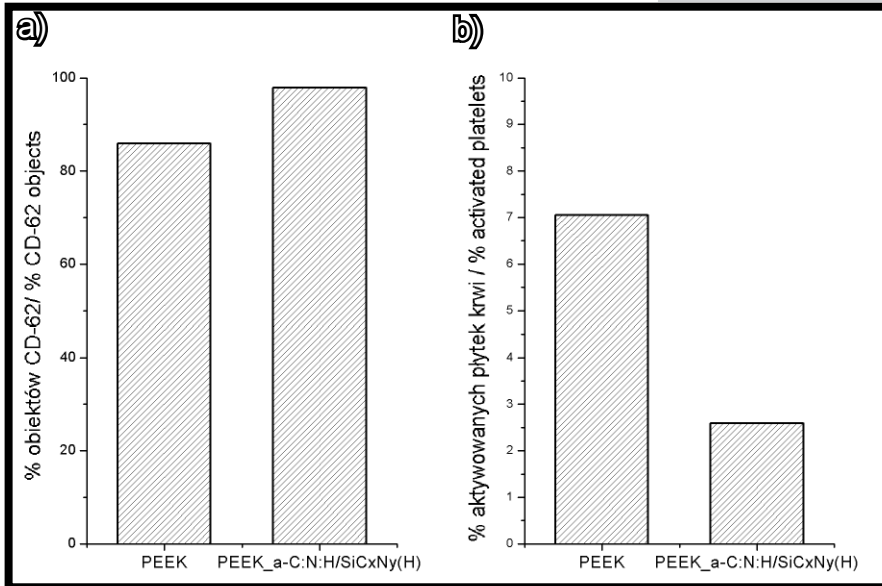
Właściwości biologiczne otrzymanych materiałów określono na podstawie analizy liczby płytek krwi i oceny ekspresji markera aktywacji płytek – P-selektyny (CD62), po inkubacji w krwi poddanej działaniu naprężeń ścinających. Wyniki badań biologicznych przedstawiono na RYS. 3. Liczba płytek krwi krążących po teście w przypadku próbki PEEK z warstwą a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) jest większa w porównaniu do próbki niemodyfikowanej (RYS. 3a). Oznacza to, że znacznie mniej płytek uległo adhezji i agregacji w kontakcie z próbką PEEK\_a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H). Ponadto liczba płytek aktywowanych w wyniku kontaktu z próbką PEEK modyfikowaną warstwą jest mniejsza niż po kontakcie z czystym polieteroeterketonem (RYS. 3b). Można zatem stwierdzić, że modyfikacja powierzchni PEEK warstwami SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) poprawia właściwości biologiczne podłoża i obniża jego trombogeniczność.

Tribological studies of the PEEK\_a-C:N:H/a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) composite and unmodified PEEK were design to evaluate the friction coefficient at sliding during rotation and the resistance to wear by friction. The results presented in FIG. 2 show the variation of the friction coefficient of PEEK with and without the layer changes with the load. The friction coefficient of PEEK\_a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) increases with increasing load. For unmodified PEEK, the reverse dependence is observed. Under low load (here 1 N), the largest contribution into friction force comes from adhesive interactions, which are characteristic for unmodified PEEK. The a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layer has very good sliding properties and well separates cooperating surfaces of the steel ball and the polymer. Hereby, the friction coefficient measured under 1 N of least load decreases from 0.18 for unmodified polyetheretherketone to 0.05 for the synergic PEEK-layer system. Increasing load causes an increase of the deformation component of the friction force, which for unmodified PEEK reduces the adhesive interaction. In the case of PEEK\_a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) composite the layer destruction is accelerated. The results of the comparative measurements of the wear resistance of unmodified PEEK and PEEK with the layer are given in TABLE 3. The data confirm that wear index decreases from 51.4·10<sup>-6</sup> mm<sup>3</sup>/Nm for unmodified PEEK to 21.7·10<sup>-6</sup> mm<sup>3</sup>/Nm for the PEEK – layer composite.

**TABELA 3. Średnie pole przekroju poprzecznego bruzdy oraz wskaźnik zużycia dla niemodyfikowanego PEEK i PEEK\_a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H).**  
**TABLE 3. The average groove cross-sectional area and wear index for unmodified PEEK and PEEK\_a-C:N:H/SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H).**

Próbka Sample	Pole przekroju poprzecznego bruzdy / Groove cross-sectional area [μm <sup>2</sup> ]	Wskaźnik zużycia Wear index W <sub>v</sub> ·10 <sup>-6</sup> [mm <sup>3</sup> /Nm]
PEEK	257	51.4
PEEK_a-C:N: H/SiC <sub>x</sub> N <sub>y</sub> (H)	136	27.2

Biological studies were dedicated to the analysis of the number of platelets and CD62 expression after material incubation in blood under shear stress. The results are given in FIG. 3. The number of platelets after the test in the case of PEEK\_a-C:N:H/a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) samples is higher compared to the unmodified sample (FIG. 3a). It means that level of platelet adhesion and aggregation in contact with coated sample was lower than in contact with the unmodified PEEK. Furthermore, the deposited layers decreased the level of platelet activation (FIG. 3b). Such results confirm that the modification of the PEEK surface with silicon carbonitride layer improves the biological properties of the substrate and decreases danger of blood clotting and the thrombogenicity.



**RYS. 3. Właściwości biologiczne:**  
 a) liczba płytek krwi krążących po inkubacji w krwi poddanej działaniu naprężeń ścinających;  
 b) liczba płytek aktywowanych wyznaczona na podstawie ekspresji P-selektyny.

**FIG. 3. Biological properties:**  
 a) the number of platelets after incubation within blood under shear stress;  
 b) the number of activated platelets based on P-selectin expression.

## Wnioski

Opracowano warunki otrzymywania amorficznych warstw uwodornionego węglaotłoku krzemu, dobrze przyczepnych do podłoża polieteroetoketonowego. Trawienie jonowe próbek, przeprowadzone przed właściwym procesem osadzania warstw, pozwoliło nie tylko na usunięcie zanieczyszczeń powierzchniowych, ale przede wszystkim, poprzez zwiększenie energii powierzchniowej i chropowatości podłoża, przyczyniło się do osiągnięcia dobrej adhezji. Dodatkowo wzrost adhezji uzyskano poprzez wytworzenie przejściowej warstwy a-C:N:H pomiędzy właściwą warstwą SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) a podłożem.

Wyniki badań tribologicznych i biologicznych potwierdzają, że modyfikacja podłoża PEEK warstwami węglaotłoku krzemu zapewnia poprawę właściwości użytkowych polimeru: zwiększa jego odporność na zużycie i obniża niebezpieczeństwo trombogeniczności.

## Conclusions

The hydrogenated silicon carbonitride layers were deposited on polyetheretherketone. The process was conducted by PA CVD method and conditions were optimized in view of obtaining good adhesion of the layer to the substrate. It is shown that adhesion may be improved (despite the process was run at room temperature) by proper preparation of the substrate surface. In this work the Ar plasma etching was applied and additionally the transition layer was deposited directly on the PEEK, followed by the proper a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layer.

Our tribological and biological measurements reveal that the application of the two-layer a-C:N:H/a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) system improves PEEK operational parameters. The layer increases wear resistance and reduces thrombogenicity of unmodified PEEK and make it attractive material for contact with blood.

## Piśmiennictwo

- [1] Ikada Y.: Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials* 15 (1994) 725-736.
- [2] Ohgoe Y., Hirakuri K. K., Tsuchimoto K., Friedbacher G., Miyashita O.: Uniform deposition of diamond-like carbon films on polymeric materials for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology* 184 (2004) 263-269.
- [3] Kubova O., Svorcik V., Heitz j., Moritz S., Romanin Ch., Matejka P., Mackova A.: Characterization and cytocompatibility of carbon layers prepared by photo – induced chemical vapor deposition. *Thin Solid Films* 515 (2007) 6765-6772.
- [4] Deamaley G., Arps J. H.: Biomedical applications of diamond-like carbon (DLC) coatings: A review, *Surface and Coatings Technology* 200 (2005) 2518-2524.
- [5] Nurdin N., Francois P., Mugnier Y., Krumeich J., Moret M., Aronsson B.-O., Descouts P.: Hemocompatibility evaluation of DLC- and SiC-coated surface. *European Cells and Materials* 5 (2003) 17-28.

## References

- [6] Zou J.W., Reichelt K., Schmidt K., Dischler B.: The deposition and study of hard carbon films. *Journal of Applied Physics* 65 (1989) 3914-3918.
- [7] Grill A., Patel V.: Stresses in diamond-like carbon films. *Diamond & Related Materials* 2 (1993) 1519-1524.
- [8] Fernandez-Ramos C., Sanchez-Lopez J.C., Belin M., Donnet C., Ponsonnet L., Fernandez A.: Tribological behavior and chemical characterization of Si-free and Si-containing carbon nitride coatings. *Diamond & Related Materials* 11 (2002) 169-175.
- [9] [www.arlab.cl/productos/pdf/probio.pdf](http://www.arlab.cl/productos/pdf/probio.pdf)
- [10] Okpalugo T.I.T., Ogwu A.A., Maguire P.D., McLaughlin J.A.D.: Platelet adhesion on silicon modified hydrogenated amorphous carbon films. *Biomaterials* 25 (2004) 239-245.
- [11] Nowak R.M., Jonas S., Zimowski S., Tkacz-Śmiech K.: Amorphous carbon layers on polymeric substrates. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 25 (2007) 23-26.

# BADANIA WŁASNOŚCI MECHANICZNYCH KOŚCI WOŁOWYCH I WIEPRZOWYCH

ANITA KAJZER<sup>1\*</sup>, WOJCIECH KAJZER<sup>1</sup>, MARCIN BASIAGA<sup>1</sup>, ELŻBIETA KUNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH, WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, POLITECHNIKA ŚLĄSKA,

UL. GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE

<sup>2</sup> STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE INŻYNIERII BIOMATERIAŁÓW „SYNERGIA”, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, UL. GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE

\* E-MAIL: ANITA.KAJZER@POLSL.PL

## Streszczenie

Celem prowadzonych badań było określenie własności wytrzymałościowych wieprzowych i wołowych kości udowych. Wartości te są niezbędne w numerycznych i doświadczalnych analizach układu kość – implant, które przeprowadza się podczas projektowania ich nowych postaci konstrukcyjnych. W ostatnich latach implanty stosowane są do leczenia złamań kości nie tylko u ludzi, ale coraz częściej u zwierząt. Dlatego też wiedza dotycząca własności wytrzymałościowych kości umożliwia optymalny dobór własności biomateriału metalowego oraz implantu w celu zapewnienia prawidłowej stabilizacji zrostu kostnego. W warunkach fizjologicznych na kości udowe najczęściej działają siły ściskające i zginające, z tego względu w pracy przedstawiono wyniki jednoosiowej próby ściskania i trójpunktowego zginania próbek pobranych z kości o różnej wilgotności. Do badań wytypowano 3 grupy próbek: I – próbki świeże, II – próbki suszone przez 24 dni i III – próbki suszone przez 30 dni. W wyniku przeprowadzonych prób wyznaczono wartości modułu Younga, wytrzymałości na ściskanie i zginanie próbek ze wszystkich grup badawczych. Na podstawie uzyskanych wyników i analiz literaturowych stwierdzono, że największymi wartościami własności wytrzymałościowych charakteryzują się kości zwierząt o większej masie. Dla zwierząt o kościach długich mniejszym można więc zastosować implant o mniejszym umocnieniu, a tym samym mniejszej sztywności. Przeprowadzone badania stanowią pierwszy etap analiz i w dalszym etapie zostaną uzupełnione i rozszerzone o kolejne badania wytrzymałościowe w tym twardości próbek po kontrolowanym sposobie i czasie suszenia.

**Słowa kluczowe:** kości zwierzęce, badania wytrzymałościowe, własności mechaniczne

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 45-50]

# STUDY OF THE MECHANICAL PROPERTIES OF OX AND PIG BONES

ANITA KAJZER<sup>1\*</sup>, WOJCIECH KAJZER<sup>1</sup>, MARCIN BASIAGA<sup>1</sup>, ELŻBIETA KUNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND MEDICAL DEVICES ENGINEERING, FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING, SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

UL. GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE, POLAND

<sup>2</sup> STUDENTS' SCIENTIFIC SOCIETY OF BIOMEDICAL ENGINEERING „SYNERGIA”, FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING, SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

UL. GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE, POLAND

\* E-MAIL: ANITA.KAJZER@POLSL.PL

## Abstract

The aim of this study was to determine the mechanical properties of pig and ox femoral bones. Those values are necessary for numerical and experimental analyses of the bone-implant system, conducted during designing new structural solutions for the system. In recent years implants have been used not only to treat bone fractures in humans, but also, increasingly often, in animals. Therefore, knowledge of mechanical properties of bones allows for optimal selection of the metallic biomaterial and the implant properties in order to provide adequate stabilisation for the bone union. In physiological conditions, femoral bones are usually subjected to compressive and bending forces, therefore, the paper presents the results of a uniaxial compressive test and a three-point bending test on the samples obtained from bones with different moisture content. Three groups of samples were selected for the research: I – fresh samples, II – samples dried for 24 days and III – samples dried for 30 days. As a result of the tests conducted, Young's modulus values were determined, as well as ultimate compressive strength and bending strength for the samples from all the groups tested. On the basis of the results and literature data it was concluded that the highest values of mechanical properties are revealed in the bones of animals with higher mass. For animals with smaller long bones an implant with less reinforcement, therefore less rigid, can be used. The tests conducted constitute the first stage of analysis, and at future stages they will be supplemented with and extended by further tests on the mechanical properties, including hardness of the samples after drying with the use of a controlled method and time.

**Keywords:** animal bones, mechanical test, mechanical properties

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 45-50]



W ostatnich latach zaznacza się wzrost liczby urazów w obrębie układu kostnego. Do leczenia złamań stosowane są implanty odpowiednio dostosowane pod względem geometrii oraz własności mechanicznych i fizykochemicznych powierzchni do rodzaju kości i typu złamania. Wprowadzając nowe postaci implantów o zmodyfikowanym składzie chemicznym biomateriału oraz własnościach fizykochemicznych powierzchni zaleca się przeprowadzenie zgodnie z zaleceniami normy „Biologiczna ocena wyrobów medycznych” PN-EN ISO10993-1 badań przedklinicznych „in vivo” na organizmach zwierzęcych [1]. Badania te przeprowadza się na dwóch grupach zwierząt - z implantami i bez, jako grupie kontrolnej. Badania powinny być prowadzone w porównywalnych warunkach z wykorzystaniem zwierząt tego samego gatunku, płci, wieku i w porównywalnych miejscach anatomicznych. Czas badania musi być dostosowany do przewidywanego okresu uzyskania wiarygodnej i powtarzalnej reakcji wokół tkanek implantu. Uzyskanie pozytywnych wyników badań na zwierzętach umożliwia przeprowadzenie badań klinicznych na wytypowanej grupie pacjentów. Prowadzone są również badania nowych postaci konstrukcyjnych w układzie zwierzęca tkanka kostna – implant w celu wyznaczenia charakterystyk biomechanicznych, a następnie optymalizacji cech wymiarowych, jak również własności mechanicznych biomateriału [2,3].

Zastosowanie implantów do leczenia złamań kości zwierzęcych wymaga także doboru cech konstrukcyjnych stabilizatora, jak i własności mechanicznych biomateriału. Coraz częściej złamania kończyn koni, psów, kotów czy królików stabilizuje się implantami wytwarzanymi z biomateriałów metalowych [4-7]. Wprowadzenie implantu do zespolenia odłamów kostnych powoduje, że najczęściej przejmuje on całość przenoszonych obciążeń. Z kolei niedociążenie kości powoduje powstanie procesu osteolizy. Dlatego też bardzo istotne jest dopasowanie odpowiednich własności mechanicznych implantu do własności danej struktury kostnej [8-10].

W dostępnej literaturze temat dotyczący oceny własności mechanicznych kości zwierzęcych jest rzadko podejmowany. Dlatego też według autorów celowym wydaje się przeprowadzenie badań wytrzymałościowych kości w celu doboru optymalnych własności biomateriału metalowego stosowanego na implanty do leczenia złamań kości zwierzęcych, jak również poszukiwanie zwierzęcia o własnościach kości, w jak największym stopniu zbliżonych do własności tkanki kostnej ludzkiej. Wyniki uzyskanych badań, mogą posłużyć jako dane do numerycznych i doświadczalnych analiz układu kość – implant na etapie projektowania i optymalizacji cech geometrycznych oraz materiałowych wszczepu, a w dalszej kolejności jego wytworzenia i badania przedklinicznego prowadzonego na zwierzętach.

## Materiały i metody

Do badań wytypowano wołowe oraz wieprzowe kości udowe, które poddano mechanicznemu oczyszczaniu z tkanek miękkich, a następnie zdezynfekowano powierzchniowo alkoholem. Przed przystąpieniem do badań przy użyciu przecinarki precyzyjnej firmy Struers Secotom-15, przynasady kości odcięto i przygotowano próbki ze środkowej części trzonu w kierunku wzdłużnym (RYS. 1). Materiał podzielono na trzy grupy pomiarowe: I – próbki z kości świeżej, II – próbki z kości suszonej przez 24 dni oraz III – próbki z kości suszonej przez 30 dni. Badania podzielono na kilka etapów. Pierwszym z nich było przygotowanie próbek do próby jednoosiowego ściskania o średnich wymiarach 10 x 4 x 4 mm (18 próbek) i do próby trójpunktowego zginania o wymiarach 40 x 10 x 2 mm (12 próbek).

## Introduction

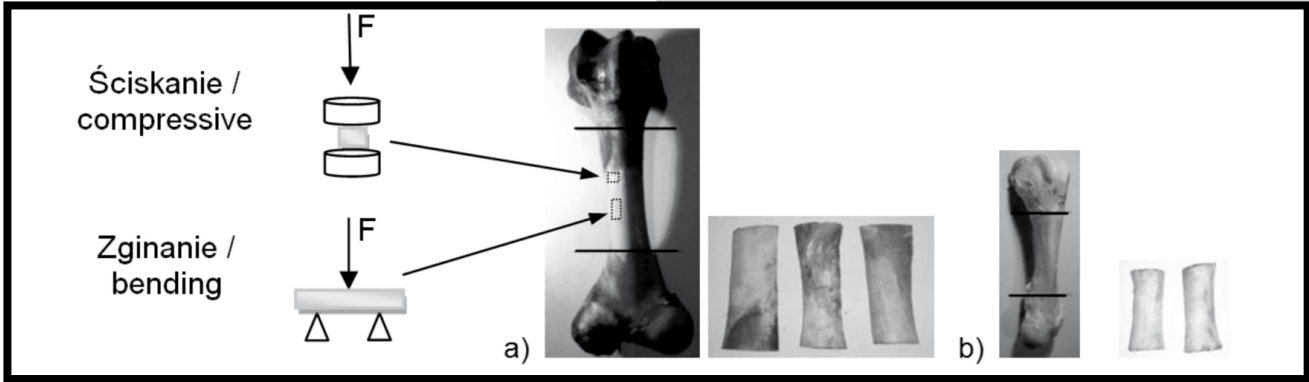
In recent years an increase in skeletal systems injuries has been observed. For the treatment of fractures implants are used, adequately selected for a given type of bone and fracture, considering geometry, as well as mechanical, physical and chemical properties of the surface. Introducing new forms of implants which contain biomaterial with modified chemical composition and physical and chemical properties of the surface, it is recommended to conduct an in vivo pre-clinical study on animal organisms, according to the PN-EN ISO10993-1 “Biological assessment of medical devices” standard [1]. Such study involves two groups of animals - with and without the implant, the latter being a control group. The study should be conducted in comparable conditions, using animals of the same species, sex and age, and in comparable anatomic sites. The length of the study needs to be adjusted to the expected time of reliable and replicable reaction around the implant site tissue. Positive animal study results enable conducting a clinical study involving a chosen group of patients. Studies on new structural solutions in the animal bone tissue-implant system are carried out, in order to determine the biomechanical characterisations, and, consequently, to optimise the dimensional characteristics, as well as the mechanical properties of biomaterial [2,3].

Using implants in the treatment of animal bone fractures requires also selecting adequate structural characteristics of the stabiliser, as well as the mechanical properties of biomaterial. Increasingly often limb fractures in horses, dogs, cats or rabbits are stabilised with implants made of metallic biomaterials [4-7]. Introducing the implant in the anastomosis of bone fragments usually results in transmission of all the loading forces to the implant. On the other hand, insufficient loading leads to the process of osteolysis. Thus the choice of adequate mechanical properties of the implant, adjusted to the characteristics of a given bone structure, is essential [8-10].

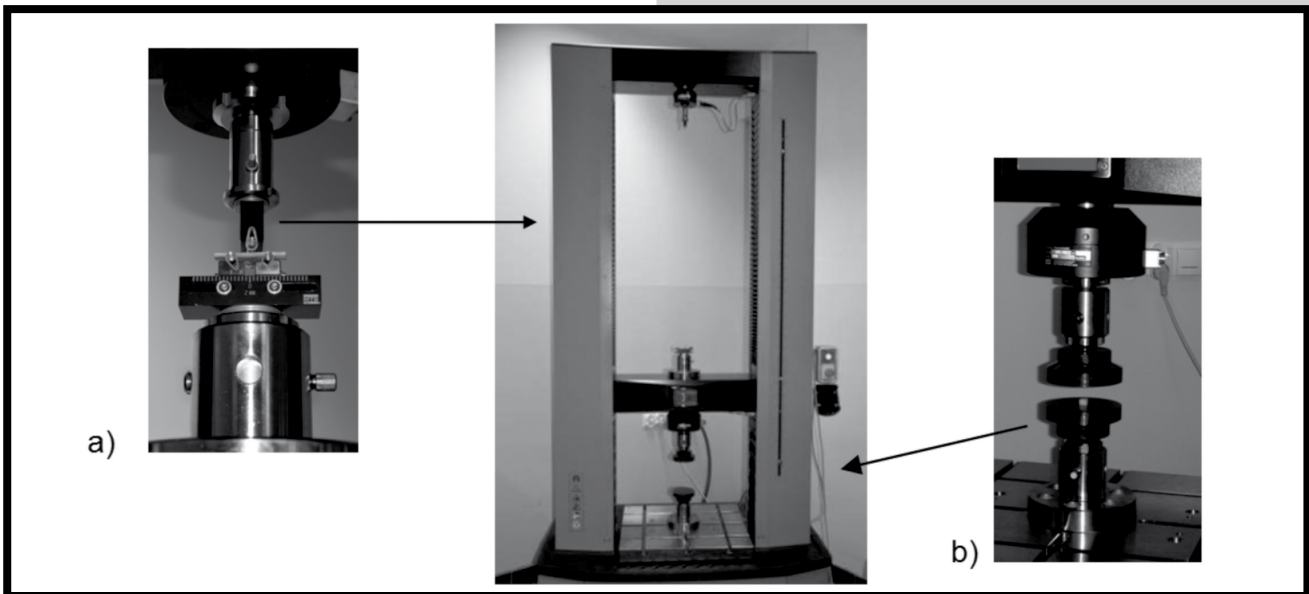
The assessment of mechanical properties of animal bones is rarely present in the available literature. Therefore, the authors believe it is expedient to conduct a study testing mechanical properties of bones, in order to select optimal characteristics of the metallic biomaterial used to make implants for the treatment of animal bone fractures, and also to find an animal whose bone properties closely resemble those of a human bone tissue. The test results can be used for numerical and experimental analyses of the bone-implant system during design and optimisation of the geometrical and material-related characteristics of the implant, as well as at the subsequent stages of its manufacturing and the pre-clinical study on animals.

## Materials and Methods

Bones selected for testing were the ox and pig femoral bones, mechanically cleaned from the soft tissue, and surface disinfected with alcohol. Before testing, the metaphysis of each bone was cut off with the use of a precise cutting-off machine by Struers Secotom-15, and samples were prepared from the central part of the stem in longitudinal direction (FIG. 1). The material was divided into three measurement groups: I – fresh bone samples, II – samples from bone dried for 24 days and III – samples from bone dried for 30 days. The study was divided into stages. The first one involved preparing the samples for uniaxial compressive test, whose average dimensions were 10 x 4 x 4 mm (18 samples), whereas for the three-point bending test the dimensions were 40 x 10 x 2 mm (12 samples).



RYS. 1. Materiał do badań: a) kość wołowa, b) kość wieprzowa - linie ciągłe przedstawiają miejsca odcięcia nasad.  
 FIG. 1. Research material: a) ox bone, b) pig bone – the continuous lines present where the metaphysis were cut off.



RYS. 2. Stanowisko pomiarowe: maszyna wytrzymałościowa MTS Criterion: a) strefa zginania, b) strefa ściskania.  
 FIG. 2. Test station: MTS Criterion testing machine: a) bending area, b) compression area.

W drugim etapie badań wyznaczano własności mechaniczne kości. Badania przeprowadzono na stanowisku pomiarowym zawierającym maszynę wytrzymałościową MTS Criterion, model 45. Ściskanie realizowano w części dolnej maszyny, natomiast zginanie w części górnej (RYS. 2). Całość zintegrowana była z komputerem, na którym zainstalowano program MTS TestSuite, dzięki któremu dla każdej z próbek uzyskano charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe. Próbkę do badań były ściskane i zginane z prędkością 4 mm/min. Próby przeprowadzono w temperaturze pokojowej do momentu pęknięcia materiału.

W przeprowadzonych badaniach wyznaczono wartości wytrzymałości na ściskanie  $R_c$  i zginanie  $R_g$  oraz moduły Younga ( $E_c$  i  $E_g$ ) dla maksymalnych obciążeń.

## Wyniki i dyskusja

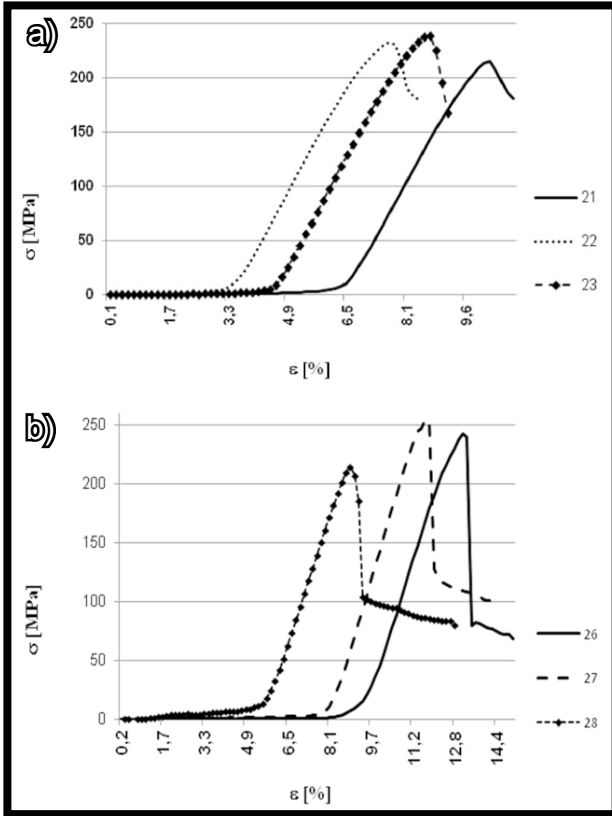
Dla wszystkich badanych próbek uzyskano charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe (RYS. 3 i 5). Na podstawie otrzymanych wartości naprężeń wszystkich próbek obliczono średnie wartości wytrzymałości na ściskanie  $R_{cśr}$ , zginanie  $R_{gśr}$  oraz moduły Younga  $E_{cśr}$  oraz  $E_{gśr}$ . (TABELA 1 i 2). Wartości te uzyskano z trzech badań dla każdej z grupy w próbie jednoosiowego ściskania i dwóch badań w próbie trójpunktowego zginania.

In the second stage of the study the mechanical properties of bones were determined. The tests were conducted in a test station equipped with a MTS Criterion, model 45 testing machine. Compression took place in the lower part of the machine, whereas bending in the upper part (FIG. 2). Everything was integrated with a computer equipped with MTS TestSuite software, which enabled establishing of strain and stress characteristics for each sample. The tested samples were compressed and bent with the speed of 4 mm/min. The testing was conducted at room temperature until the material broke.

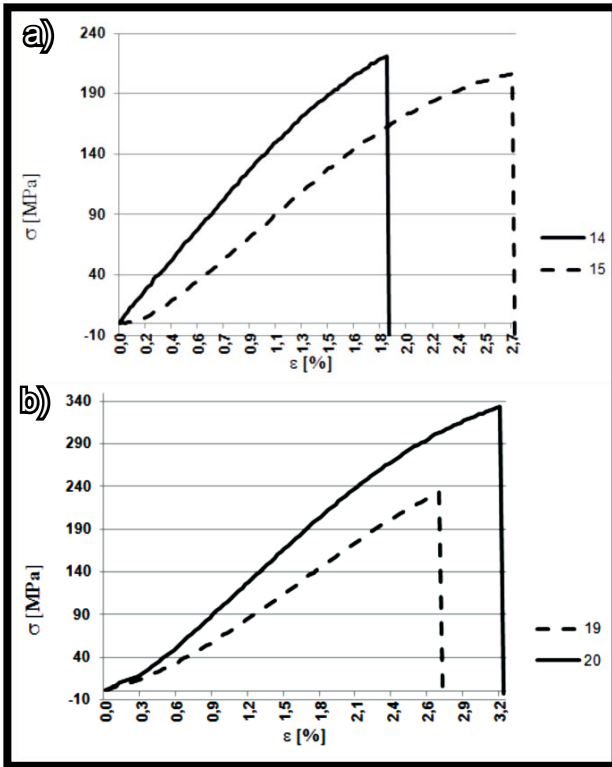
As a result of the tests, values for compressive strength  $R_c$ , bending strength  $R_g$  and Young's modulus ( $E_c$  and  $E_g$ ) were found. The strength values were defined by maximum load whereas bone deformation was measured from the machine crosshead displacement.

## Results and Discussions

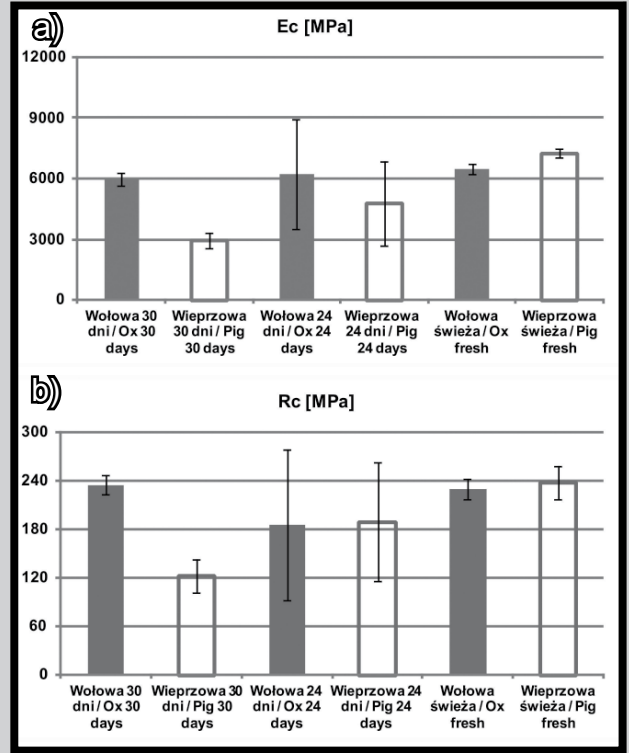
Strain and stress characteristics were received for all the samples tested (FIG. 3 and 5). On the basis of stress values for all the samples mean compressive ( $R_{cm}$ ) and bending ( $R_{gm}$ ) strength values were calculated, as well as Young's modulus  $E_{cm}$  and  $E_{gm}$  (TABLE 1 and 2). The values were received as a result of three uniaxial compression tests, and two three-point bending tests for each group.



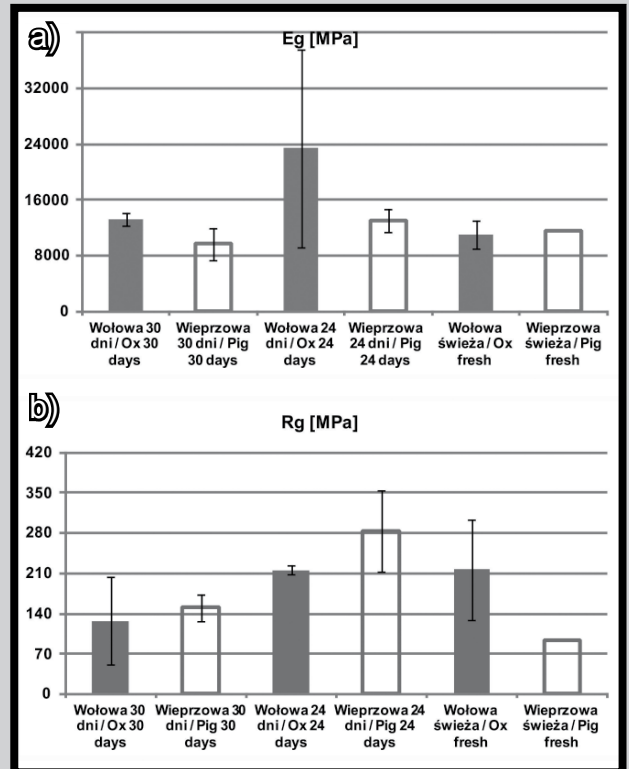
RYS. 3. Przykładowe charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe (próba ściskania): a) kość wołowa, b) kość wieprzowa.  
 Fig. 3. Examples of strain and stress characteristics (compression test): a) ox bone, b) pig bone.



RYS. 5. Przykładowe charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe (próba zginania): a) kość wołowa, b) kość wieprzowa.  
 FIG. 5. Examples of strain and stress characteristics (bending test): a) ox bone, b) pig bone.



RYS. 4. Porównanie wartości modułu Younga  $E_{c\text{sr}}$  (próba ściskania) - a), i wytrzymałości na ściskanie  $R_{c\text{sr}}$  - b) kości wołowych i wieprzowych.  
 FIG. 4. Comparison of values – Young's modulus  $E_{cm}$  (compression test) - a) and compressive strength  $R_{cm}$  - b) of ox and pig bones.



RYS. 6. Porównanie wartości modułu Younga  $E_{g\text{sr}}$  (próba zginania) - a), i wytrzymałości na zginanie  $R_{g\text{sr}}$  - b) kości wołowych i wieprzowych.  
 FIG. 6. Comparison of values – Young's modulus  $E_{gm}$  (bending test) - a), and bending strength  $R_{gm}$  - b) of ox and pig bones.



**TABELA. 1. Własności mechaniczne wyznaczone w próbie ściskania.**  
**TABLE 1. Mechanical properties marked out in bending tests.**

Nr No	Kość Bone	Czas suszenia Length of drying [dni / days]	Średnia wartość modułu Younga Young's Modulus $E_{c_{sr}} / E_{cm}$ [MPa]	Odchylenie standardowe Standard deviation [MPa]	Średnia wartość wytrzymałości na ściskanie Compressive strength $R_{c_{sr}} / R_{cm}$ [MPa]	Odchylenie standardowe Standard deviation [MPa]
1-3	Wołowa / Ox	30	5988	313	235	12
6-8	Wieprzowa / Pig	30	2922	370	122	21
11-13	Wołowa / Ox	24	6224	2735	185	93
16-18	Wieprzowa / Pig	24	4062	2071	189	73
21-23	Wołowa / Ox	Świeża / Fresh	6474	242	229	12
26-28	Wieprzowa / Pig	Świeża / Fresh	7278	224	237	20

**TABELA 2. Własności mechaniczne wyznaczone w próbie zginania.**  
**TABLE 2. Mechanical properties marked out in bending tests.**

Nr No	Kość Bone	Czas suszenia Length of drying [dni / days]	Średnia wartość modułu Younga Young's modulus $E_{g_{sr}} / E_{gm}$ [MPa]	Odchylenie standardowe Standard deviation [MPa]	Średnia wartość wytrzymałości na zginanie Bending strength $R_{g_{sr}} / R_{gm}$ [MPa]	Odchylenie standardowe Standard deviation [MPa]
4-5	Wołowa / Ox	30	13287	864	127	75
9-10	Wieprzowa / Pig	30	9687	2256	150	23
14-15	Wołowa / Ox	24	23413	14174	216	7
19-20	Wieprzowa / Pig	24	13110	1600	284	70
24-25	Wołowa / Ox	Świeża / Fresh	10992	2008	216	86
29-30	Wieprzowa / Pig	Świeża / Fresh	11515	-	94	-

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że w większości przypadków kości wołowe charakteryzowały się prawie dwukrotnie większym modułem Younga w stosunku do kości wieprzowych w każdej z badanych grup. Największą średnią wartością modułu  $E_{c_{sr}}$  zaobserwowano dla kości świeżych, zarówno wieprzowych  $E_{c_{sr}} = 7278$  MPa, jak i wołowych  $E_{c_{sr}} = 6474$  MPa. Średnie wartości wytrzymałości na ściskanie  $R_{c_{sr}}$  również były większe dla kości wołowych i malały wraz ze wzrostem czasu suszenia kości (RYS. 4 i 6). Uzyskane wyniki badań uzależnione są w dużym stopniu od sposobu przygotowania próbek. Ze względu na przenoszony większy ciężar ciała część krowa kości udowej wołu charakteryzuje się większą grubością niż część krowa kości wieprzowej. Dlatego też w tym przypadku łatwiej było uzyskać porównywalną geometrię próbek. W kościach wieprzowych część krowa jest znacznie cieńsza, co powodowało problemy w uzyskaniu geometrii próbek porównywalnej do kości udowych wołowych.

Próbę zginania dla kości wieprzowej świeżej przeprowadzono na jednej próbce. Uzyskane podczas próby wartości wytrzymałości na zginanie  $R_{g_{sr}}$  oraz modułu Younga  $E_{g_{sr}}$  kości wołowych i wieprzowych zmniejszały się wraz ze wzrostem czasu wysuszenia próbek. Średnia wytrzymałość na zginanie kości wołowych suszonych przez 30 dni  $R_{g_{sr}} = 127$  MPa i była około 58% mniejsza od wytrzymałości  $R_{g_{sr}} = 216$  MPa kości świeżych. Porównując wartości średnie dla poszczególnych grup próbek zauważono, że kości wieprzowe wykazują w większości przypadków większą wytrzymałość na zginanie niż kości wołowe. Średni moduł Younga  $E_{g_{sr}}$  dla wszystkich grup był większy niż moduł Younga  $E_{c_{sr}}$  uzyskany w próbie ściskania kości. Na przykład dla kości wołowej świeżej  $E_{g_{sr}} = 10992$  MPa, natomiast dla tej samej kości w próbie ściskania  $E_{c_{sr}} = 6474$  MPa. Wartości średniego modułu Younga dla obu rodzajów kości były do siebie zbliżone w grupach o tym samym stopniu wysuszenia.

Test results reveal that in most cases ox bones were characterised by nearly two times higher Young's modulus compared to pig bones in each of the groups tested. The highest average values for modulus  $E_{cm}$  were found with relation to fresh bones, both pig bones  $E_{cm} = 7278$  MPa and ox bones  $E_{cm} = 6474$  MPa. Mean values in compressive strength  $R_{cm}$  were also higher for ox bones, and were decreasing with the increase in the length of drying time (FIG. 4 and 6). The obtained test results are highly dependent on the method of sample preparation. Due to transmission of a greater body weight, cortical part of femur in oxen is wider than that of a pig. Therefore, in this case it was easier to obtain comparable geometry of samples. In pig bones the cortical part is much more narrow, which caused problems in obtaining geometry of samples comparable to that of ox femoral bones.

One bending test was performed on a fresh pig bone. The values for bending strength  $R_{gm}$  and for Young's modulus  $E_{gm}$  of ox and pig bones obtained as a result of the test were decreasing with the increase in the length of drying. Mean bending strength of the ox bones dried for 30 days  $R_{gm} = 127$  MPa, and was ca. 58% lower than the bending strength  $R_{gm} = 216$  MPa in fresh bones. Comparing mean values for different groups of samples it was found that pig bones in most cases reveal higher bending strength than ox bones. Mean Young's modulus  $E_{gm}$  for all the groups was higher than the Young's modulus  $E_{cm}$  observed in the compression test. For instance, for fresh ox bone  $E_{gm} = 10992$  MPa, whereas for the same bone the compression test shows  $E_{cm} = 6474$  MPa. Mean Young's modulus values for both types of bones were similar in groups with the same level of dryness.

Porównując własności wytrzymałościowe badanych kości zwierzęcych można stwierdzić, że wartości wytrzymałości na ściskanie i zginanie różnią się od własności ludzkiej kości udowej. Ich średnie wartości odpowiednio dla kości wieprzowych i wołowych świeżych, suszonych 24 dni i suszonych 30 dni przedstawiono w TABELACH 1 i 2 w porównaniu do wartości wytrzymałości na ściskanie  $R_c = 159$  MPa i wytrzymałości na zginanie  $R_g = 160$  MPa wysuszonej ludzkiej tkanki kostnej [10]. Jednoosiowe ściskanie kości udowych wieprzowych prowadzili również autorzy [11]. Dla tkanki zbitej trzonu kości udowej wyznaczyli wartość wytrzymałości na ściskanie około  $R_c = 118$  MPa. Natomiast autorzy [11] na podstawie przeprowadzonej trójpunktowej próby zginania kości udowych szczurów wyznaczyli wartość modułu Younga  $E = 3440$  MPa, co wskazuje na mniejsze wartości w stosunku do modułu Younga dla kości wołowych i wieprzowych – TABELA 2.

## Wnioski

Na jakość i powtarzalność uzyskanych wyników badań miały wpływ: cechy osobnicze zwierzęcia, rodzaj kości, geometria próbek, miejsce ich pobrania oraz warunki ich przechowywania. Przeprowadzona analiza literatury w odniesieniu do prezentowanej pracy wskazuje na różnorodność przygotowania próbek pod względem ich geometrii, co sprawia trudność w bezpośrednim porównywaniu wyników uzyskanych przez różne zespoły badawcze. Jednakże można stwierdzić, że spośród analizowanych materiałów badawczych największe wartości własności wytrzymałościowych wykazują kości zwierząt o największej masie.

Przeprowadzane badania mają charakter wstępny. Na ich podstawie autorzy przeprowadzą kolejne serie badań wytrzymałościowych tkanki kostnej próbek o kontrolowanym sposobie i czasie suszenia. Dodatkowo, analizy zostaną uzupełnione wynikami pomiarów twardości preparatów kostnych.

## Podziękowania

*Praca została sfinansowana ze środków Centrum Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej.*

Comparing mechanical properties of the tested animal bones revealed that their compressive and bending strength values differ from those of human femur. Their respective mean values, for fresh ox and pig bones, for bones dried for 24 days and those dried for 30 days were presented in TABLES 1 i 2 compared to the compressive strength value of  $R_c = 159$  MPa, and the bending strength value of  $R_g = 160$  MPa for dried human bone tissue [10]. Uniaxial compression of ox and pig femoral bones was conducted also by the authors [11]. The calculated value of compressive strength for dense tissue of the femoral stem is about  $R_c = 118$  MPa. Whereas the authors [11] on the basis of conducted three-point bending test performed on the rat femurs determined the value of Young's modulus as  $E = 3440$  MPa, which indicates lower values with respect to the Young's module for ox and pig bones – TABLE 2.

## Conclusions

Quality and reproducibility of the study results was influenced by: animal's individual characteristics, type of bones, geometry of samples, the site they were obtained from, and storage conditions. The analysis of literature regarding this paper indicates variety of sample preparation methods considering their geometry, which complicates direct comparison of the results from different research teams. However, it has been found that among the analysed research materials, bones of animals with the higher mass have the higher mechanical properties values.

The conducted tests are preliminary. The authors will conduct further series of studies on mechanical properties of bone tissue dried using controlled method and time. Moreover, the analyses will be supplemented with the results of the bone preparation density.

## Acknowledgments

*The work was financially supported by the Center of Biomedical Engineering, Silesian University of Technology.*

## Piśmiennictwo

- [1] Norma PN-EN ISO 10993-1: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Ocena i badanie.
- [2] Gzik M., Wolański W., Tejszerska D.: Badania eksperymentalne sposobów mocowania śrub stabilizacji kręgosłupa. Modelowanie Inżynierskie. Gliwice (2009) 45-50.
- [3] Kiel M., Basiaga M., Szewczenko J., Kus W., Kokot G., Wadek T.: Numerical and experimental analysis of spine's transpedicular stabilizer. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering 41(1-2) (2010) 124-130.
- [4] Kajzer A., Ordon J.: Surface Damage of Intramedullary Nails Used In Veterinary. Engineering of Biomaterials 96-98 (2010) 49-53.
- [5] Samsel J.: Osteosynteza kości nadgarstkowej III u koni pod kontrolą artroskopową. Życie Weterynaryjne 85(5) (2010) 440-444.
- [6] Samsel J.: Zachowawcze i operacyjne leczenie złamania kości promieniowej u dwóch dorosłych koni – opis przypadków klinicznych. Życie Weterynaryjne 88(5) (2013) 398-401.

## References

- [7] Degórska B., Sterna J.: Protezowanie stawu biodrowego u psów, Życie Weterynaryjne 82(2) (2007) 110-113.
- [8] Sadowska J., Kromka-Szydek M.: Zmiany własności mechanicznych kości zwierzęcych w zależności od stopnia nawilżenia preparatu. Materiały Konferencyjne. Majówka Młodych Biomechaników (2012) 93-94.
- [9] Marciniak J.: Biomateriały w chirurgii kostnej, wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [10] Będziński R.: Biomechanika inżynierska, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997.
- [11] Nikodem A., Dobrzański Z.: Influence of calcium content in feed phosphate on mechanical properties of bone tissue. Engineering of Biomaterials 109-111 (2011) 78-80.
- [12] Ritchie R.O., Koester K.J., Ionova S., Yao W., Lane N.E., Ager III J.W.: Measurement of the toughness of bone: A tutorial with special reference to small animal studies. Bone 43 (2008) 798-812.



STUDIA PODYPLOMOWE  
**Biomateriały – Materiały dla Medycyny**  
**2013/2014**

<b>Organizator:</b> Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	<b>Adres:</b> 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 tel. 12 617 44 48; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
<b>Kierownik:</b> Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH	<a href="http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materialy-dla-medycyny.html">http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materialy-dla-medycyny.html</a>
<b>Charakterystyka:</b> Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci 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). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
<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.	
<b>Zasady naboru:</b> Termin zgłoszeń: od 20.09.2013 do 20.10.2013 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 Osoby przyjmujące zgłoszenia: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Mgr inż. Małgorzata Krok (tel. 12 617 47 44, e-mail: krok@agh.edu.pl)	
<b>Czas trwania:</b> 2 semestry (od XI 2013 r. do VI 2014 r.)	<b>Opłaty:</b> 2 600 zł
<b>Informacje dodatkowe:</b> Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.	