ENGINEERING OF BIOMATERIALOW

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 124 Numer 124 Volume XVII Rok XVII

JANUARY 2014 STYCZEŃ 2014

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 Górniczo-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



BI MATERIALS

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 Bedziński - WROCŁAW 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 - Białystok Technical University, Poland Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM Matthias Epple - University of Duisburg-Essen, Germany Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY Wojciech Maria Kuś - Medical University of Warsaw, Poland Małgorzata Lewandowska-Szumieł - Medical University of Warsaw, Poland Jan Marciniak - Silesian 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 - WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND Vehid Salih - UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, LONDON, UNITED KINGDOM Jacek Składzień - Jagiellonian University, Collegium Medicum, Krakow, Poland Andrei V. Stanishevsky - University of Alabama at Birmingham, USA Anna Ślósarczyk - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland Tadeusz Trzaska - University School of Physical Education, Poznań, Poland Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

BI MATERIALS

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.

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, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma: www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać na adres: 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.

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). Highresolution 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, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website: 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 Slaski S.A. account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001



9-12 October 2014 Hotel "Perła Południa" Rytro, Poland

www.biomat.agh.edu.pl







ENGINEERING OF **BI** MATERIALS

SPIS TREŚCI

WSPÓŁCZESNE KIERUNKI BADAŃ W ZAKRESIE RECENT TRENDS IN SURFACE MODIFICATION MODYFIKACJI WARSTWY WIERZCHNIEJ OF THE TITANIUM BIOMATERIALS USED **BIOMATERIAŁÓW TYTANOWYCH PRZEZNACZONYCH** FOR ENDOOSSEUS DENTAL IMPLANTS NA ŚRÓDKOSTNE WSZCZEPY STOMATOLOGICZNE RAFAŁ POKROWIECKI, BARBARA SZARANIEC, RAFAŁ POKROWIECKI, BARBARA SZARANIEC, JAN CHŁOPEK, MAŁGORZATA ZALESKA 2 JAN CHŁOPEK, MAŁGORZATA ZALESKA **ELASTIC POLYACRYLAMIDE SUBSTRATES** ELASTYCZNE PODŁOŻA POLIAKRYLOAMIDOWE FOR CELL STUDIES DO BADAŃ KOMÓRKOWYCH KAROLINA ZAMORA, DANIEL DZIOB, JUSTYNA NOWAK, KAROLINA ZAMORA, DANIEL DZIOB, JUSTYNA NOWAK, WOJCIECH PIEKARCZYK, ZENON RAJFUR, JADWIGA LASKA 11 WOJCIECH PIEKARCZYK, ZENON RAJFUR, JADWIGA LASKA IN VITRO EVALUATION OF DOXYCYCLINE OCENA DZIAŁANIA IN VITRO DOKSYCYKLINY **RELEASED FROM BIODEGRADABLE** UWALNIANEJ Z BIORESORBOWALNEGO POLYMERIC CARRIER ON DESULFOVIBRIO POLIMEROWEGO NOŚNIKA NA SZCZEP **DESULFURICANS STRAIN DESULFOVIBRIO DESULFURICANS** ANNA KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI, ANNA KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI, MARZENA JAWORSKA-KIK, MAŁGORZATA PASTUSIAK 19 MARZENA JAWORSKA-KIK, MAŁGORZATA PASTUSIAK POSSIBILITIES AND LIMITATIONS MOŻLIWOŚCI I OGRANICZENIA W STOSOWANIU OF THE APPLICATION OF THE ILIZAROV **METHOD IN VETERINARY MEDICINE** METODY ILIZAROWA W WETERYNARII 24 STANISŁAW MAZURKIEWICZ, MACIEJ SIWECKI STANISŁAW MAZURKIEWICZ, MACIEJ SIWECKI **BIODEGRADOWALNE POLIURETANOWE BIODEGRADABLE POLYURETHANE CARRIERS** OF CITROPIN - PREPARATION, PHYSICO-CHEMICAL NOŚNIKI CITROPINY - OTRZYMYWANIE. **BADANIA FIZYKOCHEMICZNE I BIOLOGICZNE** AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION URSZULA PIOTROWSKA, MARCIN SOBCZAK, URSZULA PIOTROWSKA, MARCIN SOBCZAK, 29 CEZARY DEBEK CEZARY DEBEK **BADANIA WŁASNOŚCI MECHANICZNYCH TESTS OF MECHANICAL PROPERTIES** WARSTW SiO, PRZEZNACZONYCH NA IMPLANTY **OF SIO, LAYERS FOR IMPLANTS** STOSOWANE W UKŁADZIE KRWIONOŚNYM **USED IN VASCULAR SYSTEM** 36 WITOLD WALKE, MARCIN BASIAGA, ZBIGNIEW PASZENDA WITOLD WALKE, MARCIN BASIAGA, ZBIGNIEW PASZENDA

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

.

Wydanie dofinansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Edition financed by the Minister of Science and Higher Education

CONTENTS

2

11

19

24

29

WSPÓŁCZESNE KIERUNKI BADAŃ W ZAKRESIE MODYFIKACJI WARSTWY WIERZCHNIEJ BIOMATERIAŁÓW TYTANOWYCH PRZEZNACZONYCH NA ŚRÓDKOSTNE WSZCZEPY STOMATOLOGICZNE

Rafał Pokrowiecki¹, Barbara Szaraniec², Jan Chłopek², Małgorzata Zaleska¹

 ¹ Zakład Chirurgii Stomatologicznej Instytutu Stomatologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, ul. Montelupich 4, 31-155 Kraków
 ² AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

Streszczenie

2

Celem pracy była charakterystyka współczesnych poglądów na zagadnienie warstwy wierzchniej i jej roli w procesie osteointegracji wszczepów stomatologicznych. Przedstawiono parametry powierzchni, które bezpośrednio wpływają na inicjację procesu integracji implantu oraz jego późniejsze funkcjonowanie w organizmie. Szczególną uwagę poświęcono zagadnieniu struktury powierzchni implantów dentystycznych oraz metodom modyfikacji umożliwiającym funkcjonalizację powierzchni z wykorzystaniem biomolekuł. Współczesne kierunki inżynierii powierzchni skupiają się na zwiększeniu biozgodności materiałów metalicznych i intensyfikacji procesów osteointegracji w oparciu o zasady biomimetyki. Liczne badania in vitro, in vivo oraz wstępne badania kliniczne wskazują, że uzyskanie nanotopografii zapewnia szybszą osteointegrację implantów dentystycznych w porównaniu ze standardowymi wszczepami o powierzchni mikrostrukturalnej. Zastosowanie biomolekuł takich jak: kolagen, sekwencje peptydowe lub czynniki wzrostu przyspieszają procesy wgajania się implantów, co zostało również potwierdzone w badaniach in vitro oraz in vivo. W pracy poruszony również został problem biofilmu bakteryjnego, który jest szczególnie zauważalny w implantologii stomatologicznej. Zjawisko kolonizacji powierzchni abiotycznych przez mikroorganizmy jest szczególnym problemem implantologii stomatologicznej. Ocenia się, że powstający na powierzchni implantu biofilm bakteryjny jest jedną z najczęstszych przyczyn utraty wszczepu. Dlatego też obserwuje się dążenia do opracowania nowych metod walki z zakażeniami okołowszczepowymi, wśród których szczególną uwagę poświęca się odpowiedniej modyfikacji warstwy wierzchniej. Obecnie uważa się więc, że oprócz osiągnięcia dobrej osteointegracji, biomateriały powinny wykazywać właściwości umożliwiające zahamowanie adhezji bakterii, a tym samym formowania biofilmu, który może być przyczyną utraty implantu.

Słowa kluczowe: tytan, modyfikacja powierzchni, implanty stomatologiczne, mikrostruktura, nanostruktura

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 2-10]

RECENT TRENDS IN SURFACE MODIFICATION OF THE TITANIUM BIOMATERIALS USED FOR ENDOOSSEUS DENTAL IMPLANTS

Rafał Pokrowiecki¹, Barbara Szaraniec², Jan Chłopek², Małgorzata Zaleska¹

¹ DEPARTMENT OF ORAL SURGERY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE – UNIVERSITY DENTAL CLINIC, UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKOW, POLAND ² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

Abstract

The aim of this work is to present modern directions in the field of surface layer and its role in the process of dental implants osseointegration. The subject of analysis were parameters of the surface that directly initiate process of integraton of the implant with the tissue and its further functioning in the body. The thorough attention was paid to the micro- and nanostructure of dental implant surface and the methods of its modification using biomolecules in order to make the implant functional. Another subject of the study was bacterial biofilm formation. which is particularly noticeable and dangerous in dental implantology. Having read the literature about modifications of titanium biomaterials surface, it can be concluded that modern trends in surface engineering focus on maximizing the biocompatibility of implants and their osseointegration on the basis of biomimetics. Numerous in vitro, in vivo tests and clinical research suggest that using nano-topographic materials results in faster osseointegration of dental implants in comparison with standard microstructure implants. Furthermore, introducing such biomolecules like collagen, peptide sequences or growth factors accelerate the implant healing process, which has been proven by in vitro and in vivo tests. The long-term implant functionality might also depend on using additional agents which prevent bacterial adhesion and subsequent formation of biofilm, leading to the implant loss.

Keywords: *titanium, surface modification, dental implants, microstructure, nanostructure*

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 2-10]

Wstęp

Tytan od wielu lat z powodzeniem wykorzystywany jest w chirurgii kostnej. Znalazł zastosowanie między innymi w ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej, a przede wszystkim w implantologii i implantoprotetyce stomatologicznej. W odróżnieniu od innych biomateriałów metalicznych tytan posiada niską gęstość i moduł Younga, wysoką odporność korozyjną i zmęczeniową, co korzystnie wpływa na jego właściwości biomechaniczne. Ponadto tytan charakteryzuje się zdolnością do samopasywacji czyli spontanicznego wytwarzania na jego powierzchni dwutlenku tytanu, który oddzielając metal od tkanki wpływa na wysoką biozgodność tego materiału [1]. Oprócz biozgodności, implant musi wykazywać kompatybilność mechaniczną oraz morfologiczną. Tylko wówczas możliwe jest prawidłowe wgojenie wszczepu określane mianem osteointegracji czyli funkcjonalnego połączenia wszczepu z żywą tkanką kostną [2-5].

Na przebieg osteointegracji bezpośrednio wpływa stabilizacja implantu w tkance kostnej, którą można podzielić na stabilizację pierwotną oraz wtórną. Stabilizacja pierwotna jest mechaniczną retencją wszczepu w kości. Na jej wartość mają wpływ czynniki związane z pacjentem takie jak: jakość i ilość tkanki kostnej, położenie anatomiczne wszczepu oraz stan ogólny pacjenta. Wśród właściwości implantu determinujących jego stabilizację pierwotną wymienić można: kształt, długość, średnicę oraz rodzaj i stan powierzchni [6].

Stabilizacja wtórna związana jest z biologicznym połączeniem powierzchni implantu z tkanką kostną oraz jej stałą przebudową na powierzchni wszczepu. Jej osiągnięcie jest wyznacznikiem prawidłowej osteointegracji i stanowi główny cel leczenia implantologicznego. Na stabilizację wtórną mają wpływ przede wszystkim właściwości fizykochemiczne warstwy wierzchniej implantu takie jak: topografia, chropowatość, skład chemiczny, zwilżalność i energia powierzchniowa. To one determinują procesy komórkowe zachodzące na powierzchni wszczepu prowadzące do uzyskania efektywnego połączenia na granicy kośćimplant [1,7]. Problem osteointegracji jest szczególnie ważny w przypadku implantów dentystycznych. Współczesne techniki modyfikacji ich powierzchni skupiają się na możliwości przyspieszenia procesów prowadzących do uzyskania stabilnego połączenia wszczepu z tkanką kostną i utrzymaniu tego połączenia przez wiele lat, a tym samym zapewnieniu skutecznej rehabilitacji protetycznej pacjenta. W niniejszej pracy opisano kierunki badań w tym właśnie zakresie.

Zjawiska zachodzące na granicy implantu i tkanki kostnej

Tuż po wprowadzeniu implantu do wypreparowanego łoża, następuje zjawisko preadsorpcji czyli zwilżania powierzchni wszczepu płynem ustrojowym, a następnie adhezji białek pochodzących z płynu tkankowego oraz krwi takich jak: fibronektyna, witronektyna, laminina, albuminy oraz kolagen [8]. Obecna na powierzchni materiału warstwa protein jest niezbędna do zainicjowania adhezji komórek. Komórki poprzez liczne wypustki cytoplazmatyczne analizują strukturę materiału w poszukiwaniu odpowiedniego miejsca, w którym mogą łączyć się z adsorbowanymi białkami [9]. W procesie tym biorą udział integryny. Są to heterodimeryczne białka adhezyjne zbudowane z dwóch podjednostek: α i β. Część zewnątrzkomórkowa integryn łączy się z białkami macierzy pozakomórkowej, głównie poprzez ich sekwencję peptydowa arginina-glicyna-kwas asparaginowy (RGD), tworząc płytki przylegania (focal adhesions) [10,11].

Introduction

Titanium has been successfully used in bone surgery for several years. It is employed in orthopaedics, face and jaw surgery, and above all - dental implantology. Unlike other metallic biomaterials, titanium is characterized by low density, relatively low Young's modulus and high corrosion and fatigue resistance which makes it a material with excellent biomechanical properties. Moreover, titanium is also prone to self-passivation i.e. spontaneous formation of a surface layer of titanium oxide which separates metal from tissue and results in its high biocompatibility [1]. Apart from biocompatibility, an implant must display mechanical and morphological compatibility as well. Only then it is possible to succeed in proper healing process called osseointegration i.e. establishing a proper structural and functional connection between the living bone and the implant [2-5].

Osseointegration is directly dependent on the process of stabilizing an implant in the bone tissue. The implant stability is achieved at two stages: primary and secondary. The primary stability comes from initial mechanical engagement with a bone tissue. Its success depends strictly on the patient's conditions: the bone quality and quantity, the anatomical location of an implant and the patient's general health. Also the properties of an implant - such as its type, shape, length, diameter, model and condition of the surface - determine the proper initial stability [6].

The secondary stability means a biological connection existing between the bone and the implant surface and is developed from regeneration and constant remodeling of the bone and tissue surrounding the implant after insertion. Implant stability plays a critical role in the process of osseointegration and remains the main objective of successful dental implant procedures. The secondary stability is affected by physical-chemical properties of the implant surface, such as: topography, roughness, chemical composition, wettability and surface energy. These are the factors determining cellular processes carried out on the surface of the implant that lead to establishing a successful bone/implant interface [1,7]. Osseointegration is particularly crucial in the case of dental implants. Modern techniques focus on modifying implant surface to accelerate the implant stability and make the implant/bone connection long-lasting, which means efficient prosthetic rehabilitation of a patient. Recent trends of such surface modifications research are presented in this work.

Phenomena happening on the implant/ bone tissue interface

Right after inserting an implant into a prepared bony socket, the healing process follows in stages: pre-adsorption (keeping the implant surface wet with physiological fluid), protein adsorption, cell adhesion. The implant surface interacts with blood components and proteins from tissue fluid e.g. fibronectin, vitronectin, laminin, albumins and collagen [8]. The layer of proteins on the implant surface is requisite for initiating cell adhesion. Numerous cytoplasmic extensions of cells analyze the material structure in search of proper places to connect to adsorbed proteins [9]. The vital role in this process is played by integrins - heterodimeric cell adhesion receptors consisting of α and β subunit. The extracellular part of integrin binds to extracellular matrix proteins mainly through their peptide sequence arginine-glycine-aspartic acid (RGD), thus creating focal adhesions [10,11].

Wewnątrzkomórkowa część podjednostki ß łączy się włóknami cytoszkieletu, a te z lameninami zlokalizowanymi w jądrze komórkowym, bezpośrednio wpływając na ekspresję genów [12]. Jednostka β aktywuje kinazę płytek przylegania - FAK (focal adhesions kinase), która oddziałuje na białka cytoszkieletu oraz uruchamia szereg różnych ścieżek przekazywania sygnałów. Kinaza FAK, bierze udział w transdukcji bodźca mechanicznego na chemiczny, aktywując białka związane z drogami sygnałów wewnątrzkomórkowych takich jak: kinaza fosfatydyloinozytolu-3, fosfolipaza, kinazy białkowe aktywowane miogenami i inne. Kolejnym etapem osteointegracji jest proliferacja, a następnie różnicowanie komórek macierzystych w kierunku osteoblastów i produkcja osteoidu. Wszystkie te procesy są ściśle uzależnione od właściwości fizyko-chemicznych warstwy wierzchniej implantu, stąd też wyzwaniem na najbliższą przyszłość jest opracowanie i wytworzenie powierzchni, które pozwoliłyby na zintensyfikowanie procesu osteointegracji.

Metody modyfikacji powierzchni w celu intensyfikacji procesu osteointegracji

Modyfikacja mikro- lub nanostruktury

Pierwsze wszczepy wprowadzone w latach 70-tych zeszłego stulecia charakteryzowały się gładką powierzchnią. Liczne badania wykazały jednak, że implanty o powierzchni gładkiej (maszynowej) cechuje mniejszy stopień osteointegracji w porównaniu z materiałami chropowatymi, o większym rozwinięciu powierzchni.

Dotychczas powszechnymi metodami uzyskiwania powierzchni chropowatych były między innymi: wytrawianie roztworami kwasów lub zasad, piaskowanie, napylanie plazmy tytanowej, elektrodepozycja cząstek bioaktywnych takich jak np. HAp, TCP. Wszystkie wymienione metody umożliwiają wytworzenie mikrometrycznych nierówności powierzchni prowadząc do zwiększenia powierzchni kontaktu kości z implantem (BIC: *bone-to-implant contact*) [13,14]. Ponadto inkorporacja cząstek bioaktywnych ma na celu przyspieszenie procesów osteointegracji.

Nierówności powierzchni są najczęściej charakteryzowane poprzez współczynnik Ra. Jest on średnią arytmetyczną odchylenie profilu od linii średniej. Powierzchnie charakteryzujące się chropowatością (Ra) równą 1-2 µm sprzyjają wytworzeniu silniejszego połączenia implantu z tkanką kostną w porównaniu z powierzchniami gładkimi (o mniejszej wartości parametru Ra). Zapewniają one zwiększenie obszaru kontaktu z kością oraz odpowiednie rozłożenie nacisku na otaczające tkanki [15]. Natomiast na powierzchniach o zbyt wysokim współczynniku Ra obserwowano w warunkach in vitro obniżenie adhezji i proliferacji komórek ludzkich osteoblastów i zwierzęcych komórek linii MG-63. Powierzchnie takie mogą dodatkowo ułatwić uwalnianie jonów tytanu, zaburzać mineralizację tkanki kostnej i ostatecznie prowadzić do resorpcji tkanki kostnej podczas długotrwałego użytkowania wszczepu. Natomiast depozycja zbyt dużych cząstek bioaktywnych może, w skutek siły tarcia prowadzić do ich odrywania się i inicjowania stanu zapalnego. Obecnie coraz częściej można spotkać się z opiniami, że projektowanie powierzchni w oparciu wyłącznie o wartość współczynnika Ra jest błędne [1].

W związku ze złożonością procesów osteointegracji, w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie projektowaniem powierzchni na poziomie nanometrycznym [16,17]. Zaobserwowano, że w nanoskali pojawiają się specyficzne zjawiska, które nie występują w odniesieniu do materiałów mikrokrystalicznych [18]. Związane jest to ze zmianą właściwości termodynamicznych substancji. The intracellular part of β subunit forms a connection to the cytoskeleton filaments which, on the other hand, interacts with lamenins in the nucleus and directly affects gene expression [12]. Subunit β activates focal adhesions kinase (FAK) that influences proteins of cytoskeleton and triggers different signal transduction pathways. FAK takes part in the transduction of mechanical signal into the chemical one by activating proteins connected with intracellular signaling pathways, such as: phosphoinositide-3 kinase, phospholipase, mitogen-activated protein kinase and others. The next stage of osseointegration is proliferation and then differentiation of stem cells towards osteoblasts and the production of osteoid. All the above mentioned biological processes are rigorously dependent on physical and chemical properties of the implant surface. That is why elaboration and fabrication of such a surface that will facilitate more successful osseointegration is the goal for the nearest future.

Methods of modifying the surface in order to intensify osseointegration

Modification of micro- or nanostructure

The first implants introduced in the 1970s had a smooth surface. Nonetheless, numerous tests have proven that implants with smooth (machined) surface result in weaker osseointegration in comparison to the rough material with more developed surface.

There are several ways to obtain rough surfaces: acid- or alkali-etching, sandblasting, titanium plasma spray, bioactive molecules electrodeposition (e.g. HAp, TCP). All those methods are used to form micrometric irregularities on the surface in order to achieve a higher bone-to-implant contact (BIC) [13,14]. Besides, incorporation of bioactive molecules accelerates osseointegration.

Surface roughness is defined by Ra parameter - it is the arithmetic mean of the absolute departures of the roughness profile from the mean line. Surfaces with 1-2 µm roughness indicator (Ra) tend to make a stronger bone-to-implant contact as compared to smooth surfaces (lower Ra). They provide a larger area of BIC and proper distribution of pressure on the surrounding tissue [15]. However, in vitro tests performed on surfaces with too high Ra values showed less adhesion and proliferation of human osteoblasts and animal cell line MG-63. Such surfaces may also facilitate titanium ions release, disturb bone mineralization and eventually lead to bone tissue resorption in the long-lasting implant usage. Due to friction force, depositing not small enough bioactive molecules may lead to their detachment and subsequent inflammation. Nowadays, it more often thought that designing the surface on the sole basis of roughness indicator Ra is not sufficient [1].

Due to osseointegration complexity, in the recent years nanometric design of surface has become worthy of interest [16,17]. It was observed that there are particular phenomena occurring at the nanoscale that do not happen in the case of microcrystalline materials [18]. They are connected with changes in thermodynamic properties of a given substance. The idea of applying nanometric modification of the surface implant is based on biomimetic approach. The main idea is that the implant structure should be as similar to the structure of the surrounding tissue as possible. The hierarchical structure of bone tissue must be taken into consideration in order to understand the importance of the surface layer in successful osseointegration process.

Idea zastosowania modyfikacji powierzchni implantów na poziomie nanometrycznym jest oparta o zasady biomimetyki, zgodnie z którymi materiał implantacyjny powinien jak najdokładniej przypominać budowę tkanki, w której się znajduje. Aby zrozumieć jak istotną rolę odgrywa warstwa wierzchnia w procesie osteointegracji należy zwrócić uwagę na hierarchiczną budowę tkanki kostnej, którą można scharakteryzować na trzech poziomach. Na poziomie makrostruktralnym wyróżniamy kość zbitą oraz gąbczastą. Na poziomie drugim, mikrostrukturalnym: lamelle, osteony, systemy Haversa oraz komórki kostne. Na trzecim, nanostrukturalnym, który mieści się w zakresie od 1 do 100 nm spotykane są białka, włókna kolagenowe oraz kryształy hydroksyapatytów. Należy pamiętać, że to właśnie na poziomie nanostrukturalnym zachodzą specyficzne procesy ligand-receptor odpowiadające za adhezje komórek macierzystych do powierzchni wszczepu oraz organizację płytek przylegania, co zapoczątkowuje proces osteointegracji. Ilość, konformacja oraz dostępność białek z sekwencja RGD jest kluczowa w procesach przyłączania się komórek do powierzchni oraz ich aktywności metabolicznej.

Metody modyfikacji prowadzące do powstania nanotopografii oparte są również na powszechnie znanych metodach takich jak: piaskowanie, wytrawianie czy procesach elektrochemicznych, z tym wyjątkiem, że celem jest takie dobranie parametrów procesu, które umożliwią wytworzenie określonych nanostruktur jak: nanorurki, nanopory, nanorowki czy depozycję nanocząstek bioaktywnych (hydroksyapatyt, fosforan wapnia).

Dotychczas przeprowadzonych zostało wiele badań *in vitro* określających potencjalną przydatność nanostrukturalnych powierzchni w implantologii. Puckett i wsp. [19] opisali silniejszą adhezję komórek ludzkich osteoblastów na powierzchni nanometrycznej w porównaniu z konwencjonalną powierzchnią mikrostrukturalną. Podobne wyniki w swoich badaniach otrzymali Richert i wsp. [20], Webster i wsp. [21] oraz de Oliveira i wsp. [22]. Autorzy ci wykazali, że osteoblasty na strukturach nanometrycznych wykazują szybszą proliferację, różnicowanie oraz zwiększoną ekspresję genów związanych z procesami osteogenezy w porównaniu z konwencjonalnymi powierzchniami "chropowatymi". Stwierdzili również, że na odpowiedź komórkową ma wpływ rodzaj nanofazy: kształt (np. nanodołki, nanorowki, nanorurki), organizacja i odległość pomiędzy jej elementami.

Yap i wsp. [23] twierdzą, że za szybszą adhezję komórek na nanopowierzchniach, odpowiada większa dostępność białek płynu tkankowego oraz krwi, z którymi komórki łączą się na powierzchni wszczepu. Białka zaadsorbowane na powierzchni nanometrycznej przez dłuższy czas zachowują swoją strukturę promując tym samym procesy adhezji komórek oraz przyczyniając się do ich większej aktywności metabolicznej. Nanostrukturalne powierzchnie charakteryzują się znacznie wyższą hydrofilnością oraz energią powierzchniową w porównaniu z powierzchniami mikrostrukturalnymi. Zwilżalność i energia powierzchniej, które bezpośrednio wpływają na adhezję białek, a następnie komórek. Poprzez zwiększenie hydrofilności, wzrasta zatem biozgodność biomateriału [24,25].

Majewski [26] w badaniach klinicznych określił wpływ zmodyfikowanej powierzchni wszczepów tytanowych na osteointegrację i związaną z nią stabilizację wtórną. W badaniu porównano implanty dentystyczne o powierzchni porowatej pokrytej nanocząstkami fosforanów wapnia z implantami o klasycznej mikroporowatej powierzchni. Wyniki wykazały, że u pacjentów u których zastosowano implanty z powierzchnią nanostrukturalną zaobserwowano szybszą osteointegrację i uzyskanie stabilizacji wtórnej wszczepów. Tym samym, możliwym była wcześniejsza odbudowa protetyczna na implantach, a zatem rehabilitacja pacjentów. The bone tissue can be described on three levels. On the first macrostructural level there are two types of bone tissue: compact and spongy. On microstructural level there are: lamellae, osteons, Haversian canal and bone cells. On the third level – the nanostructural one (in the range of 1-100 nm) - there are proteins, collagen fibers and hydroxyapatite crystals. It is on this level where specific ligand/receptor processes take place. They are responsible for adhesion of matrix cells to the implant surface and organizing focal adhesions, which triggers osseointegration. Quantity, conformation and accessibility of proteins possessing RGD sequence are crucial for the process of cells attachement to the surface and their metabolic activity.

Modification methods to create nanotopography are based on sandblasting, etching and electrochemical processes. The aim is to find such parameters as to obtain certain nanostructures like: nanotubes, nanopores, nanogrooves or to deposit bioactive nanomolecules (hydroxyapatite, tricalcium phosphate).

Many *in vitro* tests have been performed so far to describe potential application of nanosurfaces for implantology. Puckett et al. [19] described stronger adhesion of human osteoblasts on nanostructural surface in comparison to conventional microstructure surface. Similar research results were obtained by Richert et al. [20], Webster et al. [21] and de Oliveira et al. [22]. These authors proved that osteoblasts on nanostructures show faster proliferation, differentiation and higher gene expression connected with osteogenesis as compared to traditional 'porous' surfaces. They also found out that cell response is affected by a kind of nanophase: shape (nanoholes, nanogrooves, nanotubes), organization and distance between its elements.

Yap et al. [23] claim that faster adhesion of cells on nanostructures is caused by better accessibility of tissue fluid and blood proteins to which cells bind on the implant surface. Proteins adsorbed on nanometric surface retain their structure for longer period of time, thus promoting cell adhesion and their metabolic activity. Nano-textured surfaces are far more hydrophilic and have higher surface energy in comparison to microstructural ones. Wettability and surface energy are the most important parameters of surface layer as they directly affect proteins adsorption and then cells adhesion. A higher level of hydrophilicity improves biocompatibility of a material [24,25].

In his clinical research Majewski [26] determined how modified surface of titanium implants influences osseointegration and then the implant secondary stability. The research compared dental implants with classical microporous structure to the ones with the porous structure covered with calcium phospate nanoparticles. The results showed that patients with nanostructured implants underwent faster osseointegration and earlier achieved the implant secondary stability. The conclusion was that prosthetic reconstruction and patients' rehabilitation could be accomplished earlier in the case of nanostructured implants.

Modifying chemical properties of the surface

Methods of obtaining micro- and nanotopography and incorporating inorganic bioactive molecules are presently employed to manufacture dental implants. Nonetheless, research is still conducted how to use organic compounds to achieve better biofunctionality of the implant surface. Such modern methods are much more complicated than the ones mentioned above. They are still experimental in nature and are not used in everyday medical practice.

In order to improve adhesion of cells to the surface, there are attempts to modify the surface using proteins naturally present in extracellular matrix that connect to integrins.

Modyfikacja właściwości chemicznych powierzchni

Metody prowadzące do powstawania mikro- lub nanotopografii oraz inkorporacji nieorganicznych cząstek bioaktywnych są obecnie najczęściej stosowane podczas produkcji wszczepów dentystycznych. Niemniej jednak prowadzone są również badania, których celem jest biofunkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem związków organicznych. Należy tutaj zaznaczyć, że są to metody znacznie bardziej skomplikowane niż opisywane wcześniej. Ponadto, mają one obecnie charakter eksperymentalny i nie są jeszcze wykorzystywane w codziennej praktyce lekarskiej.

W celu zwiększenia adhezji komórek do powierzchni prowadzi się próby modyfikacji powierzchni z wykorzystaniem białek naturalnie występujących w macierzy pozakomórkowej z którymi łączą się integryny. Pokrycie powierzchni wszczepu kolagenem czy fibronektyną przyspiesza proces adhezji osteoblastów [27,28]. Prowadzone są również badania nad zastosowaniem sekwencji peptydowych takich jak RGD. Jest ona sekwencją trzech aminokwasów: Arg-Gly-Asp która występuje w białkach takich jak: fibronektyna, fibrynogen, kolagen, osteopontyna z którymi łączą się osteoblasty [29-31]. Podejmowane są próby kontrolowania proliferacji, różnicowania oraz dojrzewania wybranych komórek stosując czynniki wzrostu takie jak: TGF-B, FGF, VEDF, PDGF, BMP. Immobilizacja białek i czynników wzrostu na inertnej powierzchni implantu jest procesem trudnym, ponieważ tytan nie posiada odpowiednich grup funkcyjnych z którymi mogłyby wiązać się białka. Natomiast zbyt silne, nieodwracalne związanie białek z powierzchnią może ograniczać ich aktywność biologiczną. Kolejnym problemem jest ich inaktywacja lub zmiana struktury w wyniku oddziaływania z powierzchnią metalu. Aby umożliwić połączenie białek z biomateriałem, powierzchnię można poddać procesowi osadzania plazmowego, szczepiania, samoorganizujących się monowarstw. Powstałe na powierzchni grupy funkcyjne jak NH₂, SH, SiH czy krótkie łańcuchy weglowodorowe moga reagować z łańcuchami białek, co umożliwia zatrzymanie ich na powierzchni materiału. Inną metodą jest modyfikowanie białek i czynników wzrostu poprzez ich łączenie z tzw. aptamerami (oligonukleotydami lub peptydami) które wiążą się specyficznie z określoną cząsteczką [32,33]. Umożliwiają one wytworzenie połączenia, którego stabilność zależna jest od pH środowiska. Przyłaczanie aptameru do powierzchni odbywa się w środowisku o neutralnym pH, natomiast w kwaśnym następuje jego odłączanie. Odwracalność immobilizacji powoduje, że białka nie są zbyt silnie związane ze strukturą materiału. Dzięki temu zachowują swoją strukturę i aktywność w środowisku tkankowym [34]. TBP-1 (Titanium Binding Protein) to aptamer wykazujący zdolność przyłączania się do tytanu [35]. Połączenie TBP-1 z cząsteczka BMP może umożliwiać jej immobilizację na powierzchni z zachowaniem właściwości osteoindukcyjnych [36].

Alternatywną metodą jest osadzanie biomolekuł z wykorzystaniem warstw pośrednich w postaci polimerów. Polimery pochodzenia naturalnego takie jak chitozan są od wielu lat wykorzystywane w medycynie. Nie wykazują właściwości immunogennych oraz posiadają właściwości bakteriobójcze. Chitozan jest biodegradowalnym polimerem otrzymywanym w procesie deacylacji chityny. Jest nierozpuszczalny w wodzie oraz posiada udowodnione właściwości sprzyjające adhezji osteoblastów oraz fibroblastów. Stosowany jest jako element podłoży do regeneracji tkanki kostnej bądź jako samodzielny nośnik dla materiałów kościozastępczych. Możliwe jest również zastosowanie innych polimerów jak kwas hialuronowy, dekstran, alginiany oraz syntetyczne bioresorbowalne polimery jak polilaktyd czy poliglikolid [37,38]. Zastosowanie polimeru umożliwia inkorporację biomolekuł, które są stopniowo uwalniane do tkanki kostnej podczas stopniowej resorpcji polimeru, co intensyfikuje procesy osteointegracji.

....

Coating the implant surface with collagen or fibronectin accelerates the process of osteoblasts adhesion [27,28]. Also application of peptide sequences such as RGD is tested. RGD is the sequence of three amino acids arginineglycine-aspartic acid which is present in many proteins that osteoblasts connect to (such as fibronectin, fibrinogen, collagen, osteopontin) [29-31]. There are attempts to control proliferation, differentiation and maturation of particular cells by applying growth factors such as: TGF-B, FGF, VEDF, PDGF, BMP. Immobilization of proteins and growth factors on the inert implant surface is a difficult task because titanium lacks proper functional groups capable of binding proteins. However, too strong and irreversible connection of proteins to the surface might limit their biological activity. Another problem is protein inactivity or the change of their structure as a result of the metal surface influence. In order to make proteins bind to biomaterial, its surface might undergo the process of plasma assisted deposition, hooking together, self-organizing monolayers. Functional groups (e.g. NH₂, SH, SiH) or short hydrocarbon chains which emerge on the surface can interact with chains of proteins attaching them to the surface of the material.

Another method of modifying proteins and growth factors is connecting them to so-called aptamers (oligonucleotides or peptides) which specifically bind to a particular molecule [32,33]. They establish a connection which stability depends on pH of the environment. Binding aptamers to the surface happens at neutral pH, while in the acid environment aptamers detach. Reversible immobilization makes proteins loosely connected to the structure of the material. Thanks to it, they retain their structure and activity in the tissue environment [34]. TBP-1 (Titanium Binding Protein) is an aptamer capable of binding to titanium [35]. Connecting BMP to TBP-1 may immobilize it on the surface while retaining its osteoinductive properties [36].

The alternative method is fixing biomolecules using intermediary layer – polymers. Polymers of natural origin such as chitosan have been long used in medicine. They do not show immunogenic properties and they are bactericidal. Chitosan is a biodegradable polymer obtained in the process of chitin deacylation. It is insoluble in water and is proved to favor adhesion of osteoblasts and fibroblasts. It is used as an element of substrate for bone tissue regeneration or as an independent scaffold for bone-replacing materials. Application of other polymers such as hyaluronic acid, dextran, alginians or synthetic biodegradable polymers e.g. polylactide or polyglicolide is also possible [37,38]. Polymers allow incorporation of biomolecules which are gradually released into the bone tissue during polymer resorption, which intensifies osseointegration.

Bacterial biofilm versus surface modification of titanium biomaterials

Bacterial biofilm formation is a key problem particularly in the case of dental implants in the environment of oral cavity. Bacteria adhesion to abiotic surfaces is a complex process ruled by three main mechanisms. Gristina [11] characterized three classes of interactions which affect bacterial colonization of the biomaterial: van der Waals forces, non-specific chemical bonds (e.g. hydrogen) and specific chemical bonds (protein ones). The processes that determine bacterial attachment are mediated by microbial proteins called adhesins. They make bacteria compete with osteoblasts for proteins adsorbed on the implant surface. However, they are not structures as specialized as integrins so they are less selective. The colonizing mechanisms of osteoblasts and bacteria differ. Unlike osteoblasts, bacteria do not need proteins on the surface to initiate cells adhesion.

Biofilm bakteryjny a modyfikacja powierzchni biomateriałów tytanowych

Problem formowania biofilmu bakteryjnego jest szczególnie istotny w przypadku implantów dentystycznych, które przebywają w środowisku jamy ustnej. Przyleganie bakterii do powierzchni abiotycznych jest procesem złożonym i obejmuje trzy główne mechanizmy. Gristina [11] wyszczególnił trzy klasy interakcji wpływających na kolonizację biomateriału przez bakterie: siły van der Waalsa, wiązania chemiczne niespecyficzne (np. wodorowe), wiązania chemiczne specyficzne (białkowe). Za wiązania specyficzne odpowiada grupa białek bakteryjnych zwanych adhezynami. Obecność adhezyn sprawia, że bakterie konkurują z osteoblastami o białka adsorbowane na powierzchni wszczepu. Adhezyny nie są jednak strukturami tak wyspecjalizowanymi jak integryny i są przez to mniej selektywne. Cechą różnicującą mechanizmy kolonizacji powierzchni przez osteoblasty i bakterie jest fakt, że w przypadku tych drugich, obecność białek na powierzchni materiału nie jest niezbędna do zainicjowania adhezji komórek. Dużą rolę w kolonizacji bakterii odgrywają wiązania wodorowe i kowalencyjne oraz siły Van der Waalsa, które sprzyjają adhezji zarówno do materiału jak i między samymi komórkami bakteryjnymi [12].

Raz powstały biofilm bakteryjny nie może być usunięty przez naturalne mechanizmy obronne organizmu, ze względu na niezwykle złożoną strukturę. Poprzez produkcję egzo- i endotoksyn oraz produktów przemiany materii, bakterie zawarte w biofilmie indukują odpowiedź komórek immunokompetentnych. Reakcja zapalna oraz obecność toksyn prowadzi do destrukcji tkanki łącznej, resorpcji kości, obluzowania wszczepu i w konsekwencji do jego utraty [14]. Niepowodzenie na skutek infekcji może wystąpić w każdym etapie postępowania leczniczego. W przypadku kontaminacji wszczepu podczas zabiegu istnieje ryzyko, że implant nie zintegruje się z tkanką i zostanie utracony. Mówimy wówczas o tzw. wczesnej utracie implantu. Jama ustna nigdy nie jest wolna od drobnoustrojów. W celu zminimalizowania ryzyka okołooperacyjnej kontaminacji wszczepu, pacjent poddawany jest ogólnoustrojowej profilaktyce antybiotykowej. Utratę wszczepu po uzyskaniu funkcjonalnego połączenia implantu z tkanką kostną określamy jako późną. Związana jest ona z obecnością zakażenia okołowszczepowego zwanego periimplantitis, które może postępować nawet przez wiele lat. Jego przyczyna jest biofilm bakteryjny gromadzący się na uzupełnieniach protetycznych osadzonych na wszczepach lub obecność mikroszczeliny powstającej pomiędzy wszczepem śródkostnym, a łącznikiem protetycznym. Na skutek destrukcyjnego oddziaływania bakterii dochodzi do uszkodzenia połączenia przeztkankowego. W dalszej kolejności, ze względu na brak ozębnej i mechanizmów obronnych, które występuja w uzebieniu naturalnym, proces zapalny szybko obejmuje tkankę kostną i prowadzi do utraty implantu [15]. U pacjentów obciążonych chorobami ogólnoustrojowymi lub po przebytej radio- i chemioterapii okolicy głowy i szyi, ryzyko zakażenia jest znacznie większe.

Modyfikacja powierzchni prowadząca do powstania mikronierówności sprzyjających adhezji komórek, zwiększa również przyleganie bakterii i powstawanie biofilmu bakteryjnego. Pacjenci, u których zdiagnozowano zakażenie okołowszczepowe często poddawani są ogólnoustrojowej terapii antybiotykowej. Należy jednak mieć na względzie, że stosowanie antybiotyków może wyeliminować ostre objawy zakażenia, lecz nie będzie skuteczne w usunięciu przyczyny powstałego zakażenia tj. biofilmu bakteryjnego, który ze względu na swoją złożoną strukturę wykazuje znacznie wyższą odporność na antybiotyki niż bakterie w postaci planktonowej. Nagminne i często nieuzasadnione stosowanie antybiotyków sprzyja powstawaniu coraz większej liczby szczepów opornych. Bacteria colonize the material by means of hydrogen and covalent bonds as well as van der Waals forces which bind bacteria not only to the host but to each other too [12].

Once-formed biofilm cannot be removed by natural bodily defence mechanisms because of its unusually complex structure. Bacteria which form the biofilm release exo-, endotoxins and metabolic waste inducing immunological response. Inflammatory reaction and the presence of toxins result in the damage of connective tissue, bone resorption, implant loosening and then its loss [14]. Complications due to an infection may happen at any stage of dental treatment. Bacterial contamination at implant insertion can be one of the factors leading to so-called early implant failure when the implant fails to integrate with the bone tissue. Oral cavity is never free of bacteria. In spite of proper preparation for the dental procedure and following all the aseptic and antiseptic rules, a patient is usually prescribed prophylactic antibiotics in order to eliminate the risk of perioperative infection. The late implant failure takes place after the implant became functionally connected to the bone but failed to maintain the achieved osseointegration. It is a result of periimplantitis - the destructive inflammatory process that may last for years. This microbiological complication is caused by bacterial biofilm forming on prosthetic devices fixed on implants or the presence of a microgap between the implant and the connecting element (in dentistry called abutment). Due to destructive activity of bacteria the intratissue connection gets damaged. Additionally, the absence of dentin and defence mechanisms of natural teeth makes inflammation quickly spread to bone tissue and leads to the loss of the implant [15]. It was also observed that patients with poor general health and the ones treated with radio- and chemotherapy in the head and neck area are more susceptible to infections and implant failures.

Modification of the surface creating micro-irregularities promotes adhesion of cells. Unfortunately, it also promotes adhesion of bacteria and biofilm formation. Periimplantitis is often considered as an indication for general antibiotic therapy. It is obviously efficient in depressing acute symptoms of inflammation, however it is not effective in reduction of biofilm on the implant surface as biofilm is highly resistant to commonly used antibiotics in comparison with planktonic bacteria cells. It is worth remembering that widespread use of antibiotics results in the growth of antibiotic-resistant bacteria. Additionally, with the administration of antibiotics adverse efects might occur such as nausea, diarrhea and even life-threatening allergic reactions.

Dental implants manufactured nowadays do not show local bactericidal properties. Internal hexagonal implantto-abutment connection minimizes the emergence of the microgap and has a positive influence on establishing implant- tissue connection. Although it indirectly minimizes the risk of biofilm formation, still it does not entirely eliminate peri-implantitis (present in 5-8% of the cases) [39]. Surgical procedures to remove the bacterial biofilm from the surface and reduce inflammatory process do not eliminate the infection successfully. What is more, mechanical removal of the biofilm may also damage the structure of the implant and make the process of re-osseointegration impossible [40].

The aim of the research conducted in this field is assessing the relationship between the nanostructure and bacterial attachment and biofilm formation [41]. Puckett et al. [42] compared colonization of Staphylococcus aureus, S. epidermidis and Pseudomonas aeruginosa on nanotextured surface. The results showed that all nano-rough titanium plates were much less colonized than the plates with conventional machined surface. They also found out that proper modification applied to the titanium surface reduces the adhesion of bacterial cells. Ponadto, może być przyczyną działań niepożądanych takich jak: nudności, dolegliwości żołądkowo-jelitowe czy odczyny alergiczne.

Współcześnie produkowane implanty dentystyczne nie wykazują miejscowych właściwości bakteriobójczych. Wewnętrzne połączenie heksagonalne pomiędzy wszczepem, a łącznikiem protetycznym zmniejsza powstawanie szczeliny brzeżnej oraz wpływa korzystnie na powstawanie połączenia przeztkankowego. Co prawda pośrednio zmniejsza to ryzyko zalegania biofilmu, niemniej jednak nie wyeliminowuje całkowicie zjawiska *periimplantitis*, które obecnie występuje w 5-8% przypadków [39]. Zabiegi chirurgiczne mające na celu oczyszczenie powierzchni z biofilmu oraz redukcję stanu zapalnego nie są skuteczne w eliminacji raz powstałego zapalenia. Należy pamiętać również, że mechaniczne oczyszczanie powierzchni wszczepu może uszkodzić jego strukturę i uniemożliwić proces powtórnej osteointegracji [40].

Przeprowadzane w tym temacie badania mają na celu określenie wpływu nanotopografii na adhezję bakterii i formowanie biofilmu [41]. Puckett i wsp. [42] porównali przyłączanie się kolonii S. aureus, S. epidermidis oraz P. aeruginosa do powierzchni nanostrukturalnych. Wyniki badań wykazały, że wszystkie tytanowe płytki charakteryzujące się chropowatością na poziomie nanostrukturalnym zostały skolonizowane w znacznie mniejszym stopniu niż płytki z powierzchnią maszynową. Stwierdzili oni, że poprzez zastosowanie odpowiedniej modyfikacji powierzchni można uzyskać powierzchnię tytanu o właściwościach hamujących adhezję komórek bakteryjnych. Do podobnych wniosków w swoich badaniach doszli Whitehead i wsp. [43] Campoccia i wsp. [44] oraz Diaz i wsp. [45].

Opisywane wcześniej metody chemiczne również umożliwiają uzyskanie właściwości hamujących adhezję komórek bakteryjnych. Harris i wsp. [46] oraz Maddikeri i wsp. [47] wykazali, że powierzchnie tytanowe poddane biofunkcjonalizacji z wykorzystaniem sekwencji peptydowych RGD w połączeniu z resorbowalnym polimerem (kopolimerem kwasu mlekowego) sprzyjały szybszej adhezji osteoblastów, jednocześnie hamując przyłączanie się szczepów bakteryjnych z gatunków S. aureus, S. epidermidis, P. aeruginosa oraz S. mutans. W innych badaniach oceniono przydatność połączenia resorbowalnych polimerów z różnymi antybiotykami (gentamycyna, ciprofloksacyna, wankomycyna) w modyfikacji tytanowych płytek do stabilnej osteosyntezy płytkowej (SOP) [48,49]. Ideą takiego połączenia było stopniowe, miejscowe uwalnianie antybiotyku podczas resorpcji polimeru. Pomimo skutecznych właściwości bakteriobójczych w warunkach in vitro, głównym problemem jest zjawisko wytwarzania szczepów opornych. Aby tego uniknać, stężenie danego antybiotyku powinno być wyższe niż minimalne stężenie hamujące (Minimal Inhibitory Concentration - MIC) podczas przebywania implantu w organizmie. O ile w przypadku płytek do SOP, które zostają usunięte po wytworzeniu kościozrostu utrzymanie odpowiednich wartości MIC do czasu osiągnięcia zespolenia odłamów jest możliwe, to w przypadku implantów dentystycznych jest to niewykonalne. W przeciwieństwie do płytek, implanty dentystyczne są wszczepiane na stałe i mają ciągły kontakt z bakteriami znajdującymi się w jamie ustnej. Aby zmniejszyć ryzyko wytwarzania szczepów opornych, zastosowano chlorheksydynę (Chlorhexidine-CHX) oraz czwartorzędowe związki amonowe (Quaternary ammonia compounds- QAC) w połączeniu z resorbowalnymi polimerami [47,51]. Związki te są powszechnie używane w stomatologii, dlatego podjęto próbę wykorzystania ich właściwości bakteriobójczych i hamujących rozwój biofilmu bakteryjnego w implantologii. Harris i wsp. [46] wykazali, że powłoki polimerowe zawierające CHX lub QAC, posiadają właściwości bakteriobójcze w stosunku do bakterii gram- dodatnich i gram- ujemnych.

The similar conclusions were reached by Whitehead et al. [43] Campoccia et al. [44] and Diaz et al. [45].

The chemical methods described earlier are also used to modify the surface in order to reduce bacterial adhesion. Harris et al. [46] and Maddikeri et al. [47] proved that bioactive RGD-modified titanium surfaces (with additional use of biodegradable copolymer of lactic acid) facilitated osteoblasts adhesion and reduced the adhesion of S. aureus, S. epidermidis, P. aeruginosa and S. mutans.

Other tests assessed suitability of combining resorbable polymers with different antibiotics (gentamicin, ciprofloxacin, vancomycin) to modify titanium plates in order to achieve stable osteosynthesis (SOP) [48,49]. The idea behind such combination was a gradual local delivery of antibiotics during the polymer resorption. In spite of efficient in vitro bactericidal properties, the main problem is the emergence of antibiotic-resistant bacteria. In order to avoid this phenomenon the concentration of antibiotics in the host should be higher than minimal inhibitory concentration (MIC). In the case of orthopedic plates being installed for a limited period of time retaining proper MIC in the host organism is possible. However, in the case of dental implants that are installed for infinite amount of time it is not possible, as they are constantly surrounded by bacteria in the mouth environment.

To reduce the emergence of antibiotic-resistant bacteria chlorhexidine (CHX) and quaternary ammonia compounds (QAC) were used in combination with resorbable polymers [46,50]. Such polymeric materials with antimicrobial activity are commonly used in dentistry, so it has been attempted to take advantage of their bactericidal properties in implantology as well. Harris et al. [46] showed that polymer coating containing CHX or QAC is effective against gram-positive and gram-negative bacteria. Still, a negative cytotoxic effect on human fibroblasts was observed, too. Yet another problem is creating a strong enough bond between the titanium implant and the polymer coating [2].

The problem of using silver and its derivatives has been thoroughly researched. Silver is well-known for its antimicrobial properties against gram-positive and gram-negative bacteria. Unfortunately, traditional silver compounds such as silver nitrate or silver sulfadiazine have numerous undesirable side effects and used as a component in biomaterial may result in inflammation of the surrounding tissue. A new approach of using silver in medicine has been proposed by nanotechnology which allows manufacturing silver particles of between 1 nm and 100 nm in size. Numerous tests proved that silver nanoparticles in low concentration have stronger bactericidal properties than traditional silver compounds. The high antimicrobial reactivity is caused by a small size and a big area of contact with bacteria cells [51,52]. It is also thought that - unlike in the case of antibiotics - bacteria are not able to develop resistance against metal nanoparticles. It is connected with multidirectional influence of metal nanoparticles on bacteria, such as: destruction of cell membrane and cell wall, interference with hemostasis, destructive influence on DNA and protein inactivation [53,54].

Incorporation of nanoparticles into the surface layer may be conducted in many manners, both using polymers or directly modeling the metallic biomaterial surface. Nonetheless, it has not been precisely concluded what is the cytotoxic effect of nanoparticles on osteoblasts and fibroblasts. Such an observation is mandatory to consider further application of metal nanoparticles to modify biomaterials for long-lasting implant applications e.g. dental implants.

Zaobserwowali oni natomiast występowanie efektu cytotoksycznego w stosunku do fibroblastów. Kolejnym problemem w zastosowaniu polimerów, jest wytworzenie wystarczająco silnego połączenia pomiędzy implantem tytanowym, a jego polimerową powłoką [2].

Innym sposobem nadania implantom właściwości antybakteryjnych jest zastosowania srebra i jego pochodnych, które zostało dokładnie zbadane. Srebro znane jest ze swoich właściwości bakteriobójczych zarówno wobec bakterii gram-dodatnich jak i gram-ujemnych. Niestety klasyczne postacie związków srebra jak azotan srebra czy sole srebrowe sulfadiazyny wykazują liczne działania niepożądane, a stosowane jako dodatek do biomateriałów mogą powodować stany zapalne otaczających je tkanek. Nowe spojrzenie na zastosowanie srebra w medycynie oferuje nanotechnologia, która umożliwia wytwarzanie cząstek metali o wielkości rzędu od kilku do 100 nm. Liczne badania wykazały, że nanocząstki srebra w niskich stężeniach wykazują silniejsze działanie bakteriobójcze niż klasyczne postacie srebra. Wysoka reaktywność nanocząstek, wynika z małego rozmiaru i dużej powierzchni oddziaływania z komórką bakteryjną [51,52]. Ponadto uważa się, że bakterie nie są w stanie rozwinąć lekooporności przeciwko nanocząstkom metali jak ma to miejsce w przypadku antybiotyków. Związane jest to z wielokierunkowym oddziaływaniem nanocząstek metali na komórkę bakteryjną takim jak: niszczenie błony i ściany komórkowej, zakłócenie hemostazy, destrukcyjne oddziaływanie na DNA oraz inaktywację białek [53,54]. Inkorporacja nanocząstek w warstwę wierzchnią może być przeprowadzona różnymi metodami, zarówno z wykorzystaniem polimerów jak i bezpośrednio na powierzchni biomateriału metalicznego. Wciąż nie określono natomiast jednoznacznie potencjalnego efektu cytotoksycznego nanocząstek w stosunku do osteoblastów i fibroblastów, co jest konieczne aby móc rozważyć zastosowanie nanocząstek metali w modyfikacji biomateriałów przeznaczonych na wszczepy długotrwałe jakimi są implanty dentystyczne.

Podsumowanie

Poprzez odpowiednią modyfikację powierzchni implantu można bezpośrednio wpływać na odpowiedź komórkową. Rodzaj, kształt oraz wzajemna relacja struktur przestrzennych na powierzchni bezpośrednio wpływają na adsorpcję białek, a następnie adhezję i aktywację komórek. Stan powierzchni oraz jej skład chemiczny warunkują intensywność procesów prowadzących do uzyskania osteointegracji implantu.

Obecnie uważa się, że nanometryczne powierzchnie o ściśle zaprojektowanym kształcie oraz topografii mogą selektywnie oddziaływać na określone receptory białkowe. Tym samym mogą regulować procesy osteointegracji prowadząc do szybszego uzyskania stabilizacji wtórnej wszczepu, której osiągnięcie jest głównym celem leczenia implantologicznego.

Kierunki rozwoju inżynierii biomateriałów koncentrują się obecnie na uzyskaniu osteoindukcyjnego charakteru powierzchni oraz intensyfikacji procesów komórkowych w celu wytworzenia szybszego i stabilniejszego połączenia implantu z tkanką. Powierzchnia wszczepu powinna również wykazywać właściwości bakteriobójcze aby zapobiegać ewentualnemu zakażeniu okołowszczepowemu we wczesnej fazie wgajania implantu oraz po uzyskaniu osteointegracji. Umożliwiłoby to ograniczenie stosowania antybiotyków oraz zwiększyło prawdopodobieństwo sukcesu leczniczego nawet wśród pacjentów z grup wysokiego ryzyka.

Na podstawie wyników badań *in vitro*, *in vivo* oraz wstępnych badań klinicznych, można stwierdzić, że w najbliższej przyszłości modyfikacja biomateriałów tytanowych z wykorzystaniem inżynierii powierzchni będzie dalej rozwijać się w oparciu o najnowsze osiągnięcia nanotechnologii.

Summary

Proper modifications of the implant surface can directly affect cellular response. The type, shape and the relationship of structures on the surface have a direct influence on proteins adsorption and then cells adhesion. The condition of the surface and its chemical constitution condition intensity processes leading to osseointegration.

The nanometric surfaces with precisely designed shape and topography may selectively influence specific protein receptors. In this way they regulate osseointegration processes resulting in earlier secondary implant stability - the main objective of successful implantologic treatment.

Modern trends in the development of biomaterial engineering concentrate on osteoinductive characteristics of the surface and intensification of cellular processes leading to establishing a faster and more stable implant/bone interface. The implant surface should also show bactericidal properties to prevent presumptive infection in the early phase of healing and after osseointegration. It would enable doctors to limit the administration of antibiotics and make medical procedures more successful even among high-risk patients.

Taking into consideration the results of *in vitro*, *in vivo* tests and preliminary clinical trials one can claim that engineering of titanium biomaterial surface will be developing on the base of nanotechnology in the nearest future.

Acknowledgements / Podziękowania

This work was financed by statutory research 11.11. 160.256 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology.

Praca finansowana w ramach badań statutowych 11.11.160.256 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Piśmiennictwo

References

[1] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej 2004.

[2] Nałęcz M.: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000 T. 4. Biomateriały. Warszawa: PAN, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT 2003.

[3] Williams D.F.: Definition of biomaterials. Progress in biomedical engineering. 4 ed. Amsterdam: Elsevier 1997.

[4] Oshida Y., Tuna E.B., Aktoren, A., Gencay, K.: Dental Implant Systems. International Journal of Molecular Sciences 11 (2010) 1580-1678.

[5] Szaraniec B., Chłopek J., Dynia G.: Porowate biomateriały tytanowe modyfikowane ceramiką bioaktywną. Inżynieria Materiałowa 30 (2009) 449-451.

[6] Lioubavina-Hack N., Lang N.P., Karring T.: Significance of primary stability forosseointegration of dental implants. Clin. Oral Impl. Res. 17 (2006) 244-250.

[7] Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A., Lindstrom, J.: Osseointegrated itanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-toimplant anchorage in man. Acta orthopaedica Scandinavica 52 (1981) 155-170.

[8] Park B.S., Heo S.J., Kim C.S., Oh J.E., Kim J.M., Lee G., Park W.H., Chung C.P., Min B.M.: Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces. Journal of Biomedical Materials Research Part A 74 (2005) 640-651.

[9] Kuzyk P.R., Schemitsch E.H.: The basic science of peri-implant bone healing. Indian J Orthopaedics 45 (2011) 108-115.

[10] Ruoslahti E.: RGD and other recognition sequences for integrins. Annual Review of Cell and Developmental Biology 12 (1996) 697-715.

10

• [11] Hynes, R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110 (2002) 673-687.

[12] Forgacs G.: On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation. J Cell Sci 108 (1995) 2131-2143.

[13] Jokstad A., Braegger U., Brunski J.B., Carr A.B., Naert I., Wennerberg A.: Quality of dental implants. Int. Dent. J. 53 (2003) 409-443.
[14] Abrahamsson I., Zitzmann N.U., Berglundh T., Wennerberg A., Lindhe J.: Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 16 (2001) 323-332.

[15] Wennerberg A., Albrektsson T.: Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 15 (2000) 331-344.

[16] Shinnosuke O., Hiroyuki I., Atsushi N., Jun K., Hiroaki I.: Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite. Acta Biomaterialia 6 (2010) 591-597.

[17] Manus J.P., Biggs R.G.R., Gadegaard N., Wilkinson C.D.W., Oreffo R.O.C., Dalby M. J.: The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1ţ enriched skeletal stem cells. Biomaterials 30 (2009) 5094-5103.

[18] Jurczyk M., Jakubowicz J.: Bionanomateriały. Poznań. Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej 2008.

[19] Puckett S., Pareta R., Webster T.J.: Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. Int J Nanomedicine 3 (2008) 229-41.

[20] Richert L., Vetrone F., Yi J.H., Zalzal S.F., Wuest J.D., Rosei F. et al.: Surface nanopatterning to control cell growth. Adv Mater 20 (2008)1488-1492.

[21] Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R.: Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. Biomaterials 21 (2000) 1803-1810.

[22] de Oliveira P.T., Nanci A.: Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials 25 (2004) 403-13.

[23] Yap F.L., Zhang Y.: Protein and cell micropatterning and its integration with micro/nanoparticles assembly. Biosens Bioelectron 22 (2007) 775-788.

[24] Gittens R.A., Olivares-Navarrete R., Cheng A., Anderson D.M., McLachlan T., Stephan I., Geis-Gerstorfer J., Sandhage K.H., Fedorov A.G., Rupp F., Boyan B.D., Tannenbaum R., Schwartz Z.: The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of humanosteoblast lineage cells. Acta Biomater 9 (2013) 6268-6277.

[25] Song D.P., Chen M.J., Liang Y.C., Bai Q.S., Chen J.X., Zheng X.F.: Adsorption of tripeptide RGD on rutile TiO(2) nanotopography surface in aqueous solution. Acta Biomater 6 (2010) 684-694.

[26] Majewski P.: Wpływ rodzaju powierzchni tytanowych implantów dentystycznych na ich stabilizację w strukturach kostnych szczęki i żuchwy - rozprawa habilitacyjna. Kraków 2012.

[27] Dolder J., Bancroft G.N., Sikavitsas V.I., Spauwen P.H., Mikos A.G., Jansen J.A.: Effect of fibronectin and collagen I-coated titanium fiber mesh on proliferation and differentiation of osteogenic cells. Tissue Eng. 9 (2003) 505-515.

[28] Schulz M.C., Korn P., Stadlinger B., Range U., Möller S., Becher J., Schnabelrauch M., Mai R., Scharnweber D., Eckelt U., Hintze V.: Coating with artificial matrices from collagen and sulfated hyaluronan influences the osseointegration of dental implants. J Mater Sci Mater Med. (2013) Oct 11. [Epub ahead of print].

[29] Harris L.G., Tosatti S., Wieland M., Textor M., Richards R.G.: Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. Biomaterials 25 (2004) 4135-4148.

[30] Maddikeri R.R., Tosatti S., Schuler M., Chessari S., Textor M., Richards R.G, et al.: Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces. J Biomed Mater Res 84A (2008) 425-435.

[31] Dee K.C., Andersen T.T., Bizios R.: Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomateriale J Biomed Mater Res 40 (1998) 371-377.

[32] Chatzinikolaidou M., Lichtinger T.K., Müller R.T., Jennissen H.P.: Peri-implant reactivity and osteoinductive potential of immobilized rhBMP-2 on titanium carriers. Acta Biomaterialia 6 (2010) 4405-4421.

[33] Baneyx F., Schwartz D.T.: Selection and analysis of solid-binding peptides. Curr Opin Biotechnol 18 (2007) 312-317.

[34] Sano K., Shiba K.: A hexapeptide motif that electrostatically binds to the surface of titanium. J Am Chem Soc 125 (2003) 14234-14235.

[35] Kashiwagi K., Tsuji T., Shiba K.: Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces. Biomaterials (2009) 1166-1175.

[36] Modrzejewska Z.: Formy chitozanowe do zastosowań w inżynierii biomedycznej. Inż. Ap. Chem. 50 (2011) 74-75.

[37] Renoud P., Toury B., Benayoun S., Attik G., Grosgogeat B.: Functionalization of Titanium with Chitosan via Silanation: Evaluation of Biological and Mechanical Performances. PLoS ONE 7 (2012): e39367. doi:10.1371/journal.pone.0039367

[38] Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A.: Biomateriały w Stomatologii. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008.

[39] Berglundh T., Persson L., Klinge B.: A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. J Clin Periodontol 29 (2002) 197-212.

[40] Rehman A., Hu J., Ott S.J., Grössner-Schreiber B.: Microbial community composition on modified dental implant surfaces: an in vivo study. Int J Oral Maxillofac Implants 27 (2012) 811-819.

[41] Colon G., Ward B.C., Webster T.J.: Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO_2 . J Biomed Mater Res A 78 (2006) 595-604.

[42] Puckett S.D., Taylor E., Raimondo T., Webster T.J.: The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. Biomaterials 31 (2010) 706-713.

[43] Whitehead K.A., Colligon J., Verran J.: Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and submicrometer dimensions. Colloids Surf B Biointerfaces 41 (2005) 129-138.

[44] Campoccia D., Montanaro L., Agheli H., Sutherland D.S., Pirini V., Donati M.E., et al.: Study of Staphylococcus aureus adhesion on a novel nanostructured surface by chemiluminometry. Int J Artif Organs 29 (2006) 622-629.

[45] Diaz C., Schilardi P.L., Salvarezza R.C., Lorenzo F., de Mele M.: Nano/ microscale order affects the early stages of biofilm formation on metal surfaces. Langmuir 23 (2007) 11206-11210.

[46] Harris L.G., Mead L., Müller-Oberländer E., Richards R.G.: Bacteria and cell cytocompatibility studies on coated medical grade titanium surfaces. J Biomed Mater Res A 78 (2006) 50-58.

[47] Maddikeri R.R., Tosatti S., Schuler M., Chessari S., Textor M., Richards R.G., Harris L.G.: Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces. J Biomed Mater Res A 84 (2008) 425-435.

[48] Price J.S., Tencer A.F., Arm D.M., Bohach G.A.: Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. J Biomed Mater Res 30 (1996) 281-286.

[49] Lucke M., Schmidmaier G., Sadoni S., Wildemann B., Schiller R., Haas N.P., Raschke M.: Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. Bone 32 (2003) 521-531.

[50] Davies R., Holt N., Nayagam S.: The care of pin sites with external fixation. J Bone Joint Surg Br 87 (2005) 716-719.

[51] Oleszkiewicz A., Korzekwa K., Bugia-Płoskońska G.: Nanoczasteczki w biologii i medycynie. Laboratorium medyczne 5 (2008) 30-33.

[52] Cho K.H, Park J.E, Osaka T, Park SG.: The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochemica Acta 51 (2005) 956-960.

[53] Chen X., Schluesener H.J.: Nanosilver: A nanoproduct in medical application. Toxicology Letters 176 (2008) 1-12.

[54] Wijnhoven S.W.P, Geertsma R.E et al.: Nano-silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology 3 (2009) 109-138.

ш 🗰

.

ELASTYCZNE PODŁOŻA POLIAKRYLOAMIDOWE DO BADAŃ KOMÓRKOWYCH

Karolina Zamora^{1*}, Daniel Dziob¹, Justyna Nowak¹, Wojciech Piekarczyk², Zenon Rajfur¹, Jadwiga Laska²

 ¹ UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, INSTYTUT FIZYKI, UL. REYMONTA 4, 30-059 KRAKÓW
 ² AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
 AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW
 * E-MAIL: KAROLINA.ZAMORA@GMAIL.COM

Streszczenie

Podłoża do hodowli komórkowej charakteryzują się różnymi właściwościami mechanicznymi, które mogą mieć znaczący wpływ na zachowanie komórek. Szczególnie ciekawy typ podłoży stanowią hydrożele akryloamidowe, zarówno ze względu na łatwość ich syntezy, jak i na fakt, iż poprzez niewielkie zmiany ilości substratów wykorzystywanych w wytwarzaniu tych podłoży, można uzyskać podłoża znacznie różniące się elastycznością. Dodatkową zaletą hydrożeli akryloamidowych jest to, że pomimo znacznych różnic elastyczności, biozgodność i bioaktywność pozostają niezmienione.

W niniejszym artykule skupiono się na opisie syntezy podłoży akryloamidowych do hodowli komórkowej, a także na scharakteryzowaniu ich cech mechanicznych i sprawdzeniu wpływu elastyczności podłoży na hodowlę rybich komórek keratynocytowych. Keratynocyty to komórki, których hodowla jest niewymagająca, w porównaniu do innych linii komórkowych, gdyż mogą one być hodowane bez konieczności wykorzystywania drogich pożywek, a także bez konieczności inkubowania w temperaturze 37°C.

W pracy szczegółowo opisano sposób wytwarzania podłoży akryloamidowych o różnych stopniach elastyczności. Hydrofilowość otrzymanych podłoży sprawdzano metodą goniometryczną poprzez pomiar kąta zwilżania. Istotną częścią eksperymentu było określenie właściwości mechanicznych otrzymanych podłoży poprzez pomiar prędkości rozchodzenia się podłużnej fali ultradźwiękowej. W ten sposób porównano właściwości mechaniczne czterech podłoży różniących się modułem elastyczności. Stwierdzono, iż największe prędkości rozchodzenia się fal dotyczą próbek o najniższym module elastyczności, co świadczy o największym upakowaniu cząsteczek polimeru i pośrednio potwierdza najwyższy stopień usieciowania polimeru.

Otrzymane podłoża posłużyły jako matryce do hodowli keratynocytów, których migrację obserwowano pod mikroskopem. Zaobserwowano znaczne różnice w zachowaniu się komórek, szybkości ich migracji oraz przyjmowaniu kształtu wskazującego stresogenne działanie podłoży o niskim module elastyczności rzędu kilku kPa oraz korzystne oddziaływanie podłoży twardych o module elastyczności >30 kPa.

Słowa kluczowe: podłoża poliakryloamidowe, elastyczność, hydrożele, keratynocyty

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 11-18]

.

ELASTIC POLYACRYLAMIDE SUBSTRATES FOR CELL STUDIES

KAROLINA ZAMORA^{1*}, DANIEL DZIOB¹, JUSTYNA NOWAK¹, WOJCIECH PIEKARCZYK², ZENON RAJFUR¹, JADWIGA LASKA²

¹ JAGIELLONIAN UNIVERSITY, INSTITUTE OF PHYSICS, UL. REYMONTA 4, 30-059 KRAKÓW, POLAND ² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND * E-MAIL: KAROLINA.ZAMORA@GMAIL.COM

Abstract

Cell culture substrates show different mechanical properties, that may have significant influence on behavior of cells. Acrylamide hydrogels are particularly interesting substrates, due to both the ease of their synthesis and the fact, that by small changes in the amounts of reactants used in their manufacturing process, one can obtain substrates of significantly different elasticity level. An additional advantage of acrylamide hydrogels is that despite of significant changes in elasticity they exhibit no changes in biological properties.

This article is focused on the synthesis of acrylamide substrates for cell culturing, characterization of their mechanical properties, and also on searching the influence of elasticity of the substrates on culture of fish keratinocytes. Keratinocytes are cells, which culture is simplified, compared to other cell lines, since they may be cultured without usually expensive nourishments and the necessity of incubation at 37°C.

The detailed description of the synthesis of acrylamide substrates of different levels of elasticity is given in this paper. Hydrophilicity of the obtained substrates was also investigated by testing the contact angle by goniometric method. An important part of the experiment was determining mechanical properties of the obtained substrates by measuring velocity of propagation of ultrasonic longitudinal wave for substrates of different elasticity modules. In that way comparison of the elasticity of the four different substrates was possible. It has been found, that the largest wave propagation velocity refers to the samples of the lowest elastic modules, what proves the highest degree of cross-linking in these hydrogels.

The established substrates were used as matrices for keratinocytes culture, which migration was observed under the microscope. Depending on the substrate significant differences in cell behavior, their migration velocity, and shape changing has been observed. The soft hydrogels with elasticity modulus less than several kPa were stressful for the cells while hard ones with elasticity of >30 kPa were beneficial.

Keywords: polyacrylamide substrates, elasticity, hydrogels, keratinocytes

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 11-18]

Podłoża stosowane w hodowlach komórek i tkanek charakteryzują się różnymi właściwościami mechanicznymi, które bezpośrednio wpływają na zachowanie kultur komórkowych. Również mikrostruktura wszczepianego materiału może mieć znaczący wpływ na zachowanie komórek znajdujących się w rejonie implantu. Zachowanie komórek na powierzchniach krawędzi, rowków bądź innych elementów topograficznych odbiega od odpowiedzi komórek osadzanych na gładkich podłożach. W wielu przypadkach komórki reagują na zmianę topografii poprzez ukierunkowanie migracji np. wzdłuż grzbietów i włókien na podłożach [1].

Wśród licznych materiałów stosowanych do wyrobu podłoży do hodowli komórkowych szczególnie popularne są hydrożele polimerowe. Stały się one popularne w latach 50. dwudziestego wieku - pierwszym materiałem hydrożelowym użytym jako implant medyczny był poli(alkohol winylowy), wyprodukowany w formie gąbki. Do wytwarzania materiałów hydrożelowych stosuje się zarówno polimery biodegradowalne, jak i syntetyczne. Biokompatybilne hydrożele polimerowe znajdują szerokie zastosowanie w biomedycynie i farmacji, szczególnie w kontrolowanym dostarczaniu i uwalnianiu leków, inżynierii tkankowej oraz medycynie regeneracyjnej [2,3].

Żele polimerowe to materiały będące połączeniem cieczy z ciałem stałym, w których luźno usieciowana matryca polimerowa tworzy trójwymiarową sieć wypełnioną płynami, ale nie rozpuszcza się w nich. Ilość płynów zaabsorbowanych przez żel może być dużo większa niż ilość polimeru. Trójwymiarowy charakter matrycy polimerowej zapewnia swoistą równowagę struktury żelu – pęcznienie żelu wzrasta wraz ze wzrostem długości mostków sieciujących i odległości między nimi.

W niniejszej pracy wykorzystano żele poliakryloamidowe, wytworzone z akryloamidu usieciowanego bisakryloamidem. Przez kontrolowane zmiany stężenia tych dwóch składników można otrzymać szereg podłoży o różnej elastyczności, przy czym sieciowanie żeli poliakryloamidowych nie wpływa znacząco na wymiary matrycy. Żele te można poddać aktywacji i pokryć wybranymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej przed rozpoczęciem hodowli komórkowej, co daje możliwość niezależnego sterowania właściwościami mechanicznymi i biologicznymi podłoża. Ponadto żele poliakryloamidowe są izotropowe i sprężyste (powracają do pierwotnego kształtu po odjęciu sił odkształcających), co sprawia iż możliwe jest wykonanie obliczeń charakteryzujących deformacje obszarów podłoża. Rozmiary porów nie przekraczają 100 nm, co uniemożliwia migrację komórek w głąb podłoża [10]. Przedstawione badania dotyczyły migracji keratynocytów, czyli komórek nabłonkowych. U ssaków komórki te wraz ze wzrostem ulegają procesom rogowacenia, co pozwala im pełnić funkcje ochronne [4]. W przypadku rybich keratynocytów tylko u wybranych gatunków następuje obumieranie komórek naskórka. W wiekszości przypadków rybi naskórek pokryty jest warstwą śluzu pełniącego rolę warstwy ochronnej w środowisku wodnym [5]. Ważną cechą charakterystyczną tego typu komórek jest migracja posiadająca podobny mechanizm jak w przypadku gojenia się ran. A zatem komórki migrują, gdy nie wyczuwają obok siebie innych komórek. W celu przemieszczenia się, opisywane komórki tworzą płaskie wysuniecie błony komórkowej - lamellipodium. Fazy ruchu keratynocytów nie są wyraźnie rozdzielone w czasie, lecz toczą się równolegle i w efekcie migracja odbywa się płynnie.

Rybie keratynocyty są często używane w badaniach komórkowych ze względu na liczne zalety, wśród których warto wymienić między innymi: niewymagające warunki hodowli i obserwacji (brak konieczności stabilizowania temperatury i stężenia CO₂) oraz łatwość ich pozyskiwania.

Introduction

Substrates used in cell studies and tissue engineering differ in mechanical properties, that directly influence behavior of cell cultures. Also, the microstructure of implanted material can have a significant impact on behaviour of cells residing in the region of implant. The behavior of the cells on edges, grooves or other topographical elements differs from the response of cells cultured on smooth surfaces. In many cases, cells respond to the changes in topography by directing their migration, for example along the grooves and fibres of the substrate [1].

Among many materials applied for cell culturing, especially popular ones are polymer hydrogels. They became popular in the 1950s. The first hydrogel material used as a medical implant was poly(vinyl alcohol) produced in the form of a sponge. Both, natural and synthetic polymers are used for manufacturing hydrogel materials. Biocompatible polymer hydrogels are widely used in biomedicine and pharmacy, particularly in controlled delivery and release of drugs, tissue engineering and regenerative medicine [2,3].

Polymer gels are materials that are combination of a liquid and a solid, where loosely crosslinked polymeric matrix forms a three dimensional network, that is filled with fluid, but does not dissolve in it. The amount of liquids absorbed by gel can be much greater than the amount of the polymer. The three-dimensional character of polymer matrix provides a unique balance of the gel structure – swelling of the gel increases with the increase of crosslinks length and the distance between them.

In this work, polyacrylamide gels produced from acrylamide crosslinked with bis-acrylamide were used. By controlling changes of the concentration of these two components, a number of substrates of different elasticity can be produced, wherein the crosslinking does not significantly affect the dimensions of the matrix. These gels may be activated and coated with selected extracellular matrix proteins before the start of cell culture, which allows for independent control of the mechanical and biological properties of the substrate. Moreover, polyacrylamide gels are isotropic and resilient (they return to original shape after removal deformation forces), which makes possible to perform calculations characterizing the deformation of the substrate. The size of the pores does not exceed 100 nm, which prevents cells from migration into the substrate [10]. Results presented in this article refer to the migration of keratinocytes that are epithelial cells. In mammals these cells usually keratinize while growing, which enables them to perform their protective functions [4]. In the case of fish keratinocytes, death of epidermal cells occurs only among selected species. In most cases fish skin is covered with the layer of mucus, that acts as a protective layer in the aquatic environment [5]. An important attribute of these kinds of cells is migration, which mechanism is similar to wound healing. Thus, cells migrate when they do not sense other cells nearby. In order to move, keratinocytes form a flat protrusion of the cell membrane - lamellipodium. Movement phases of keratinocytes are not clearly separated in time, but run simultaneously, resulting in smooth migration.

Fish keratinocytes are often used in cell studies because of their numerous advantages, among which worth mentioning are undemanding culture and observation conditions (lack of necessity to stabilize the temperature and concentration of CO_2), and effortless procuring. Poza wyżej wymienionymi zaletami, keratynocyty są interesującym obiektem w badaniach podstawowych także z powodu względnie stałego kształtu podczas migracji oraz dużej szybkości przemieszczania się, co wyraźnie skraca czas zbierania danych. Ciało komórki jest w przybliżeniu eliptyczne, zaś uwzględniając lamellipodia można jej kształt określić jako wachlarzowaty [6].

Materiały i metody

Do otrzymywania hydrożeli oraz funkcjonalizacji podłoży użyto następujących odczynników:

- akryloamid 40% roztwór wodny (BioRad)
- N,N'-metylenobisakryloamid 2% roztwór wodny (BioRad)
- (3-aminopropylo)trietoksysilan (APTES) (Sigma-Aldrich)
- N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (BioRad)
- nadsiarczan amonu (APS) (BioRad)
- woda destylowana H_2O^{dd}
- aldehyd glutarowy 0,5% roztwór wodny (BioRad)

- kwas 1-[6-[(4-azydo-2-nitrofenylo)amino]heksanoiloksy] 2,5-diokso-pirrolidyno-3-sulfonowy (sulfo-SANPAH) (BioRad)
 - sztuczny płyn fizjologiczny PBS (phosphate-buffered saline) – 1 litr PBS przygotowano w laboratorium poprzez zmieszanie w roztworze wodnym: wodorosiarczanu(VI) sodu - 8,599 g (Sigma-Aldrich), diwodorosiarczanu(VI) potasu - 2,177 g (Sigma-Aldrich) oraz chlorku sodu - 9,002 g (Sigma-Aldrich).

Morfologię podłoży scharakteryzowano metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (Nova 200 NanoSEM). Hydrofilowość oznaczono metodą goniometrii (DSA10Mk2 Kruss). Prędkość przejścia fal ultradźwiękowych przez żele zmierzono na aparacie CT-3 z głowicami o częstotliwości 1 MHz.

Wyniki i dyskusja

Otrzymywanie podłoży akrylanowych o różnej sztywności

W tej pracy skupiono się na hydrożelach poliakryloamidowych (PAM), różniących się między sobą sztywnością, jako podłożach do hodowli komórkowych. Poliakryloamid jest całkowicie biozgodny pomimo tego, że monomer jest silnie toksyczny. Bardzo dużą zaletą tego typu materiału jest to, iż moduł sprężystości można bardzo łatwo zmienić przez zmianę względnych stężeń akryloamidu i bisakryloamidu. Pomimo zmiany właściwości mechanicznych PAM chemiczna budowa powierzchni żelu nie ulega zmianie [7,8]. Dzięki temu, że rozmiary porów w żelach poliakryloamidowych są mniejsze niż 100 nm, komórki nie migrują do wnętrza żelu [9,10]. Wielkość porów została określona na podstawie obrazów SEM (RYS. 1).

Żele poliakryloamidowe o różnej elastyczności otrzymywano zgodnie z procedurą opisaną wcześniej w literaturze [10]. Ilości użytych odczynników zostały zebrane w TABELI 1.

Polimeryzacja akryloamidu zachodziła zgodnie z mechanizmem rodnikowym. Schemat zachodzącej reakcji przedstawiono na RYS. 2.

Katalizatorami reakcji były N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), natomiast nadsiarczan amonu był inicjatorem reakcji wolnorodnikowej. Proces polimeryzacji przebiegał w środowisku wodnym. Kolejność dodawania składników była istotna ze względu na dużą szybkość reakcji polimeryzacji. Pierwszym krokiem było zmieszanie odpowiednich ilości akryloamidu, bis-akryloamidu z wodą destylowaną. Następnie bardzo szybko dodawano kolejno APS oraz TEMED. Pobierano po 0,1 ml tak otrzymanej mieszaniny i przenoszono na szkiełka mikroskopowe, po czym nakrywano kroplę mniejszym szkiełkiem i pozostawiano do całkowitej polimeryzacji. In addition to these advantages, keratinocytes are also interesting objects in basic research because of their relatively unchanging shape during migration, and their high speed of movement, which clearly reduces the time of data collecting. Cell body is approximately elliptical, only when considering lamellipodia, its shape could be specified as a fan-shaped [6].

Materials and methods

For the preparation of hydrogels and functionalization of substrates following reagents were used:

- acrylamide 40% water solution (BioRad)
- N,N'-metylenebisacrylamide 2% water solution (BioRad)
- (3-aminopropyl)trietoxysilane (APTES) (Sigma-Aldrich)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (BioRad)
- ammonium persulfate (APS) (BioRad)
- distilled water H₂O^{dd}
- glutaraldehyde 0.5% water solution (BioRad)

- 1-[6-[(4-azido-2-nitro-phenyl)amino]hexanoyloxy]-2,5-dioxo-pyrrolidine-3-sulfonic acid (sulfo-SANPAH) (BioRad)

- synthetic physiological fluid PBS (phosphate-buffered saline) – 1 liter of PBS was prepared in laboratory by mixing in water solution: sodium bisulfate(VI) - 8.599 g (Sigma-Aldrich), potassium dihydrosulfate(VI) – 2.177 g (Sigma-Aldrich) and sodium chloride – 9.002 g (Sigma-Aldrich).

The morphology of the substrates was characterized by scanning electron microscopy (Nova 200 NanoSEM). The hydrophilicity was determined by the method of goniometry (DSA10Mk2 Kruss). The velocity of transition of ultrasonic waves through gels was measured with a CT-3 apparatus with heads of 1 MHz frequency.

Results and Discussion

Preparation of acrylate substrates of different stiffness

This work is focused on polyacrylamide hydrogels (PAM) of various stiffness as substrates for cell studies. Polyacrylamide is biocompatible despite the fact that the monomer is highly toxic. One major advantage of this kind of material is the possibility of easy change of the elasticity modulus, by varying the relative concentrations of acrylamide and bis-acrylamie. Despite the change of mechanical properties of PAM, chemical structure of the gel surface does not change [7,8]. Because the pore sizes in polyacrylamide gels are smaller than 100 nm, the cells do not migrate into the interior of the gel [9,10]. Pores size was estimated from SEM images (FIG. 1).

Polyacrylamide gels of different elasticity were prepared according to the procedure previously described in the literature [10]. The amounts of used reagents together with the elasticity modules are summarized in TABLE 1.

Acrylamide polymerization occurred according to the radical mechanism. The scheme of the reaction taking place is presented in FIG. 2.

The catalyst for the reaction was N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), and the free radical polymerization initiator was ammonium persulfate (APS). The polymerization process was carried out in an aqueous medium. The order of addition of the reagents was important due to the high speed of polymerization reaction. The first step was mixing the appropriate amounts of acrylamide, bis-acrylamide and distilled water. Then, APS and TEMED were added successively. After that, 0.1 ml of the mixture was transferred onto microscope coverslip glass. Then the smaller glass was used to cover the drop and was left to complete the polymerization.



RYS. 1. Zdjęcie SEM wysuszonego hydrożelu poli(akryloamido-co-N,N'-methylenobisakryloamidowego).

FIG. 1. SEM image of dried poly(acrylamide-co-N,N'-methylenebisacrylamide) hydrogel.



RYS. 2. Schemat reakcji kopolimeryzacji akryloamidu i N,N'-metylenobisakryloamidu. FIG. 2. Scheme of copolymerization of acrylamide and N,N'-methylenebisacrylamide.

TABELA 1. Odczynniki używane w przygotowaniu podłoży poliakryloamidowych. TABLE 1. Reagents used in the preparation of polyacrylamide substrates.

| Nr próbki Sample No. | llość użytego roztworu akryloamidu The amount of used acrylamide solution [ml] | llość użytego roztworu bis-akryloamidu The amount of used bis-acrylamide solution [ml] | Woda destylowana Distilled water [ml] | TEMED [ml] | APS [ml] | Moduł elastyczności według [10] Elasticity modulus according to [10] [kPa] |
|-------------------------------|--|--|---|---------------|-------------|--|
| 1 | 0.75 | 0.75 | 8.5 | 0.1 | 0.01 | 1.37±0.22 |
| 2 | 1.0 | 1.5 | 7.5 | 0.1 | 0.01 | 3.24±0.58 |
| 3 | 2.5 | 1.5 | 6.0 | 0.1 | 0.01 | 34.88 |
| 4 | 2.0 | 2.4 | 5.6 | 0.1 | 0.01 | 40.40±2.39 |

Układ zalewano roztworem PBS w celu wymycia pozostałości monomeru. Ilości monomeru i czynnika sieciującego dobrano na podstawie literatury tak, by otrzymane hydrożele znacząco różniły się modułem elastyczności E [10]. Oczekiwane wartości modułów E były następujące: próbka 1–1,37±0,22 kPa, próbka 2–3,24±0,58 kPa, próbka 3 – 34,88 kPa, próbka 4 – 40,40±2,39 kPa. Numery próbek zgodne są z TABELĄ 1.

Otrzymane hydrożele charakteryzowały się bardzo gładką powierzchnią, co stwierdzono w obserwacjach w skaningowym mikroskopie elektronowym. Morfologia próbek była identyczna niezależnie od sztywności hydrożelu.

Szkiełka, na których osadzano podłoża były wcześniej odpowiednio modyfikowane powierzchniowo. Pierwszym etapem modyfikacji była silanizacja przy pomocy 0,5% wodnego roztworu 3-aminopropylotrietoksysilanu (APTES). Każde szkiełko trzymano w roztworze silanu przez 10 minut, a następnie płukano w wodzie destylowanej przez 20 minut. Po wysuszeniu powierzchnia była aktywowana przy pomocy 0,5% wodnego roztworu aldehydu glutarowego. Reakcja aktywacji trwała 30 minut. Na RYS. 3 zobrazowano reakcje zachodzące na powierzchni szkła po silanizacji.

Migracja komórkowa jest bezpośrednio związana z tworzeniem punktów adhezyjnych. Aby do tego doszło na powierzchni hydrożelu muszą znajdować się odpowiednie białka macierzy pozakomórkowej. W celu immobilizacji białek na powierzchni podłoży przeprowadzono funkcjonalizację przy pomocy heterobifunkcyjnego związku sieciującego sulfo-SANPAH, którego wzór strukturalny znajduje się na RYS. 4. PBS solution was poured over the system to rinse the residual monomer. The amounts of monomer and crosslinking agent were selected based on the literature data, so that the received hydrogels were of different elasticity modulus E. The expected values of modulus E according to [10] were as follows: sample $1 - 1.37\pm0.22$ kPa, sample $2 - 3.24\pm0.58$ kPa, sample 3 - 34.88 kPa, sample $4 - 40.40\pm2.39$ kPa. Sample numbers are in accordance with TABLE 1.

The all obtained hydrogels showed a very smooth surface, which was found in the observations in the scanning electron microscope. The morphology of the samples was the same, regardless on the stiffness of the hydrogel.

The glasses, on which substrates were deposited, were previously modified on their surface. The first step of modification was silanization by 0.5% water solution of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). Each glass was kept in silane solution for 10 minutes, and then rinsed with distilled water for 20 minutes. After drying, the surface was activated with 0.5% glutaraldehyde solution. The activation reaction lasted 30 minutes. Creation of the silanized surface of glass is presented in FIG. 3.

Cell migration is directly related to the formation of points of adhesion. For this to occur, there have to be appropriate extracellular matrix proteins on the surface of the hydrogel. In order to immobilize proteins on the surface of the substrates, functionalization with the use of a crosslinker – sulfo-SANPAH, which structural formula is illustrated in FIG. 4, was carried out.







RYS. 4. Budowa chemiczna sulfo-SANPAH. FIG. 4. Chemical structure of sulfo-SANPAH.

Reakcja przyłączenia sulfo-SANPAH do powierzchni poliakryloamidowej jest katalizowana przez promieniowanie UV o długości fali od 320 do 350 nm. Jest to możliwe dzięki obecności w strukturze fotoreaktywnej grupy nitrofenyloazydowej. W trakcie procesu funkcjonalizacji powstają wiązania kowalencyjne, które powodują, że cząsteczka jest silnie związana z powierzchnią żelu. Schematycznie funkcjonalizacja podłoża pokazana jest na RYS. 5.

Hydrofilowość otrzymanych poliakryloamidów

Podłoża różniące się stopniem usieciowania i w związku z tym elastycznością, poddano badaniom kąta zwilżania metodą goniometryczną. Przed wykonaniem badania żele wyciągano z PBSu i suszono przez 60 minut. Krople nanoszone na powierzchnię żeli (niezależnie od stopnia sztywności), zwykle były wchłaniane przez podłoże, rozpływały się na jego powierzchni lub kąt zwilżania był bardzo mały. Świadczy to o bardzo dużej hydrofilowości podłoży. Różnice w sztywności podłoży poliakryloamidowych nie wpływają znacząco na ich hydrofilowość, aczkolwiek na powierzchni żelu miękkiego (próbka 1 i 2) kropla wody wsiąkała w próbkę, podczas gdy na twardszych powierzchniach (próbki 3 i 4) pozostawała na powierzchni, co przedstawiono na RYS. 6. Różne miejsca na powierzchni próbek trochę różniły się hydrofilowością, ale kąt zwilżania zawsze był mniejszy niż 30°.



RYS. 5. Schemat procesu funkcjonalizacji podłoży. FIG. 5. Scheme of substrate functionalization

process.



RYS. 6. Przykładowy kształt kropli na powierzchni hydrożelu akryloamidowego. FIG. 6. Exemplary shape of the drop on the surface of acrylamide hydrogel.

The reaction of sulfo-SANPAH attachment to the surface of polyacrylamide is catalyzed by UV radiation with a wavelength of 320 to 350 nm. This is possible due to the presence of photoreactive nitrophenylazide groups in the structure. In the process of functionalization, the covalent bonds are formed, which cause that the molecule is firmly bound to the gel surface. The scheme of the functionalization is given in FIG. 5.

The hydrophilicity of the obtained polyacrylamides

The substrates differing with the degree of crosslinking, and therefore the flexibility, were submitted to the tests of contact angle using goniometry method. Before performing the tests, gels were pulled out of PBS and dried for 60 minutes. Water droplets applied on the surfaces of substrates during the test were usually absorbed by substrate, dissipated on its surface or the contact angle was very small. This demonstrates a very high hydrophilicity of substrates. Differences in stiffness of polyacrylamide substrates do not have a significant influence on their hydrophilicity, however the droplets on the soft gels (sample 1 and 2) just sinked into the surface, while these on samples 3 and 4 partially stayed on the surface as shown in FIG. 6. Different parts of the same sample also slightly differed in hydrophilicity, however the angle never exceeded 30°.

Pomiar prędkości podłużnych fal ultradźwiękowych

Sprężystość próbek porównano poprzez pomiar prędkości rozchodzenia się fal ultradźwiękowych w sporządzonych żelach. Pomiary wykonano przy pomocy aparatu CT-3 z głowicami o częstotliwości 1 MHz. Próbki miały średnicę ok. 35 mm i grubość ok. 2 mm. Po wyciągnięciu z roztworu PBS, żele pozostawiano na określony czas na powietrzu, a następnie dokonywano pomiaru prędkości fal ultradźwiękowych w określonych odstępach czasu w kilku niezależnych od siebie seriach pomiarowych, następujących po sobie w czasie od 45 minut do 100 minut. Próbki umieszczano między dwiema głowicami i w każdej serii pomiarowej odczytywano czas przejścia podłużnej fali ultradźwiękowej oraz drogę przebytą przez falę. Pomiary prowadzono przy dwóch różnych ustawieniach głowic: 1) odległość między głowicami równa jest dokładnie średnicy próbki, tzn. głowice tylko stykają się z próbką, 2) odległość między głowicami zostaje zmniejszona o 1 mm, tzn. próbka ulegała niewielkiemu ściśnięciu pomiędzy głowicami. Wykonano 21 serii pomiarowych dla próbek nr 1, 2 i 4 oraz 15 dla próbki 3. By uniknąć błędów pomiarowych, co pewien czas wykonywano pomiar sprawdzający na wzorcach 2 µs i 10 µs, a serie pomiarowe poprzedzał i kończył pomiar predkości fali ultradźwiękowej w powietrzu. Średnia prędkość podłużnej fali ultradźwiękowej w powietrzu dla całego okresu badania w temperaturze pokojowej wynosiła 343,6 ± 1,05 m/s.

Najwyższe średnie wartości podłużnej fali ultradźwiękowej wyznaczono dla próbki nr 1 (najniższy moduł elastyczności) vL = 1662.3 ± 12.6 m/s. a nieco niższe (w granicach błędu pomiarowego) dla próbki nr 2 vL = 1655,9 ± 6,6 m/s. Natomiast dla próbek 3 i 4 (wysoki moduł elastyczności) uzyskano znacznie mniejsze wartości prędkości podłużnej fali ultradźwiękowej: odpowiednio vL(3) = 1576,6 ± 9,2 m/s i vL(4) = 1547,8 ± 4,6 m/s. Stwierdzono, że suszenie próbek nie ma wpływu na wartości wyznaczonych prędkości fali, co dobitnie świadczy, że obserwowana szybkość przechodzenia fali jest ściśle związana z istnieniem ośrodka polimerowego w hydrożelu. Trzeba jednak dodać, że wartości szybkości zbliżone są do szybkości rozchodzenia się fali ultradźwiękowej w wodzie. Próbki nie zmieniają właściwości sprężystych z czasem suszenia. Nieznaczny wpływ na właściwości ma docisk głowic do próbki. Obserwuje się wzrost prędkości o ok. 6% w pomiarach z głowicami dociśnietymi.

Analiza wyników wykazała, że dla każdej próbki występują dwa rodzaje wyników niezależnie od odległości pomiędzy głowicami. Na RYS. 7 przedstawiono wykresy zmian szybkości fali ultradźwiękowej w czasie dla próbek 2 i 4 różniących się znacznie modułem elastyczności. Niższe wartości z reguły uzyskiwane są przy lekkim kontakcie i są mniejsze o ok. 100 m/s od wartości maksymalnych. Generalnie, większe różnice szybkości obserwowano dla próbek miękkich.

Measurements of velocity of ultrasonic waves propagation

The resilience of the samples was compared by measuring the velocity of propagation of ultrasonic waves in the prepared gels. The measurements were performed by the CT-3 apparatus with heads of 1 MHz frequency. The diameter of samples was about 35 mm, and their thickness was approximately 2 mm. After removing samples from PBS, gels were left for a specified time in the air, and then the velocity of propagation of ultrasonic waves was measured in a number of independent series, following each other in time from 45 minutes to 100 minutes. Samples were placed between the two heads and in each measurement series, the time of transmission of longitudinal ultrasonic wave and the distance crossed by the wave were recorded. Measurements were conducted at two different positions of heads: 1) the distance between heads was equal to the diameter of the sample, i.e. the heads were in contact with the sample, and the sample dimensions were not disturbed; 2) the distance between the heads was reduced by 1 mm, i.e. the sample was slightly compressed between the heads. 21 measuring series were performed for each of the samples 1, 2 and 4, and 15 series for the sample 3. To avoid measurement errors, a checking measurement has been taken periodically using the standards of 2 µs and 10 µs, and the measurement series were preceded and ended by a measurement of velocity of ultrasonic wave in the air. The average velocity of longitudinal ultrasonic wave in the air for the whole testing period at room temperature was 343.6 ± 1.05 m/s.

The highest values were determined for the sample 1 (the lowest flexibility modulus) $v_1 = 1662.3 \pm 12.6$ m/s, and slightly lower (but within the measurement error) for sample 2 v_1 = 1655.9 ± 6.6 m/s. In contrast, samples 3 and 4 (high flexibility modulus) gave much lower values of the velocity of longitudinal ultrasonic wave, respectively: $v_1(3) = 1576.6$ \pm 9.2 m/s and v_L(4) = 1547.8 \pm 4.6 m/s. It was found that the measured velocity values are not affected by the drying time, which clearly shows, that observed velocity is closely related to the existence of polymeric center in the hydrogel. Although, it should be noted, that the velocity values are similar to that in water. The samples do not change their elastic properties while drying. Changing the distance between heads (compressing the sample) has a slight effect on the obtained values. An increase in the speed by about 6% was observed in the compressed samples.

Analysis of the results showed that for each sample there are two types of results regardless the distance between the heads. FIG. 7 shows the changes of the velocity of the ultrasonic wave in time for samples 2 and 4, which significantly differ with elasticity modulus. Lower values are generally achieved with a light contact of heads with the a sample,

W próbkach charakteryzujących się niskim modułem elastyczności obserwowano dalszy spadek szybkości o 100 m/s. Najwyższe wartości szybkości uzyskano dla próbki nr 1 o najniższym module elastyczności i nieznacznie niższe dla próbki nr 2. Istotne obniżenie szybkości pojawia się przy znacznym wzroście modułu elastyczności hydrożelu.





however, at maximum they are less only about 100 m/s. Larger difference in the velocity values were observed for soft samples then for the harder ones. For samples with low elastic modulus further reduction of values by 100 m/s was observed. The highest values of velocity were attained for the sample 1 with the lowest elasticity modulus, and a slightly lower for the sample 2. Significant reduction of velocity occurs with considerable increase in elastic modulus of the hydrogel.

Średnie wartości szybkości przechodzenia fali ultradźwiękowej wraz z odchyleniem standardowym dla wszystkich rodzajów hydrożeli w zależności od modułu elastyczności podano na RYS. 8.

Obserwacja migracji komórek keratynocytowych na podłożach hydrożelowych

Podłoża hydrożelowe wykorzystano w celu obserwacji zachowania komórek keratynocytowych, pochodzących z rybich łusek. Procedura przygotowania tych komórek jest dobrze opisana w wielu publikacjach np. w [6]. Pojedyncze łuski, pozyskane z ryb gatunku Molinezja, umieszczano między dwoma, nałożonymi na siebie podłożami lub szkiełkami nakrywkowymi. Następnie dokonywano infuzji małej ilości

pożywki DMEM (Euroclone) z 10% surowicą FBS (Sigma Aldrich) pomiędzy te podłoża. Tak utworzony "sandwicz" pozostawiano w uszczelnionej szalce Petriego na okres od 24 do 72 godzin w temperaturze pokojowej. Po upływie tego okresu, sprawdzano czy komórki zeszły z łuski na podłoże i wtedy separowano podłoża od siebie. Podłoża z komórkami były umieszczane w plastikowych szalkach Petriego z pożywką DMEM/FBS. Następnie dokonywano pomiarów migracji keratynocytów za pomocą mikroskopu optycznego Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). Obrazy migrujących komórek rejestrowano używając techniki fotografii poklatkowej (tzw. time lapse) co 20 sekund przez 20 minut.

Komórki obserwowano na wszystkich czterech podłożach hydrożelowych. Prawidłowo migrujące komórki, były rozpłaszczone na podłożach i przybierały wydłużone, wrzecionowate kształty. Na RYS. 9 przedstawiono przykładowe zdjęcia mikroskopowe komórek na podłożach hydrożelowych o modułach elastyczności 1,3 kPa (RYS. 9a) oraz 40 kPa (RYS. 9b).

Porównując zachowanie się komórek na wszystkich czterech rodzajach podłoży stwierdzono, iż komórki znacznie łatwiej migruja na podłożach o wiekszej sztywności, czyli na próbkach 3 i 4 (E odpowiednio 35 i 40 kPa). Na tych podłożach komórki zachowywały swój charakterystyczny wachlarzowaty kształt (RYS. 9b). Natomiast na podłożach o niskim module elastyczności (próbki 1 i 2, E odpowiednio 1,3 i 3,2 kPa) zaobserwowano niezwykle interesujący przykład przybierania nietypowego dla rybich keratynocytów kształtu kulistego (RYS. 9a). Kształt taki jest typowy raczej dla komórek stacjonarnych. Pomimo tej zmiany, niektóre komórki keratynocytów usiłowały dalej migrować. Wyjaśnienie mechanizmu wpływu zmniejszonej elastyczności podłoża na taki kształt i zachowanie komórek keratynocytów wymaga dalszych badań. Obserwacje te zostały opisane szczegółowo w innej publikacji [11].



RYS. 8. Średnie prędkości fal ultradźwiękowych w badanych hydrożelach. FIG. 8. Average values of the ultrasonic vawe velocity in the studied hydrogels. Average values of the velocity of transition of an ultrasonic wave with the standard deviation for all types of hydrogels according to the elastic modulus is shown in the FIG. 8.

Observation of keratinocyte cell migration on hydrogel substrates

Hydrogel substrates were used to observe the behavior of keratinocytes derived from fish scales. The preparation procedure of these cells is well described in several papers, for example in [6]. Fish scales, collected from Molly fish, were placed in between two substrate plates or between the substrate and a coverslip. Then infusion

of the small amount of DMEM cell media (Euroclone) with 10% of FBS (Sigma Aldrich) between the substrates was performed. The formed "sandwich" was left in a sealed Petri dish for 24 to 72 hours at room temperature. After that, it was checked whether the cells migrated from the scale onto the substrate and then substrates were separated. Substrates with the cells on them were placed in plastic Petri dishes with DMEM/FBS medium. Cell migration measurements were performed employing optical microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). Images of the migrating cells were registered using time lapse technique with 20 s between frames for 20 minutes.

The cells were observed on all four hydrogel substrates. Properly migrating cells were flattened on substrates and assumed elongated, fusiform-like shape. In FIG. 9 there are shown exemplary microscopic images of cells on hydrogel substrates with elastic modulus of 1.3 kPa (FIG. 9a) and 40 kPa (FIG. 9b).

Comparing cell behavior on all four types of substrates, it was found that the cells migrate more easily on substrates with higher stiffness, that is on sample 3 and 4 (E - 34 and 40 kPa, respectively). On these substrates cells maintained their characteristic fan-like shape (FIG. 9b). However, on the substrates with a low elasticity modulus (samples 1 and 2, E - 1.3 and 3.2 kPa, respectively) a very interesting example of atypical, as for fish keratinocytes, spherical shape was observed (FIG. 9a). Such shape is typical for stationary cells. Despite this shape change, some of the keratinocytes still tried to migrate. In order to explain the mechanism of influence of decreased substrate elasticity on such cells shape and behavior requires further research. More detailed studies are described in another publication [11].



RYS. 9. Komórki keratynocytowe na podłożu hydrożelowym po 24 godzinach przebywania na podłożu:

a) podłoże o module elastyczności 1,3 kPa,
b) podłoże o module elastyczności 40 kPa.
Powiększenie 10x.

FIG. 9. Keratinocytes on hydrogel substrate after 24 hrs of residing on a substrate:

a) substrate of the elasticity modulus 1.3 kPa,b) substrate of the elasticity modulus 40 kPa.Magnification 10x.

BIC MATERIALS

Otrzymano cztery rodzaje hydrożeli akryloamidowych znacznie różniących się modułem elastyczności. Porównano ich właściwości mechaniczne poprzez pomiar szybkości rozchodzenia się fali ultradźwiękowej, a następnie zbadano wpływ elastyczności podłoża na zachowanie się keratynocytów.

Potwierdzono, że podłoża akryloamidowe są odpowiednimi materiałami do hodowli komórek keratynocytowych, które są z kolei doskonałym modelem do badania parametrów procesu migracji komórkowej. Wykorzystując te podłoża wykazano, że średnia szybkość migracji keratynocytów na podłożach sztywnych była znacznie większa niż na podłożach o module elastyczności 10 do 40 razy niższym. Zaobserwowane w badaniach zmiany kształtu keratynocytów na miękkich podłożach jednoznacznie wskazują na wpływ elastyczności podłoża na ten rodzaj komórek.

Podziękowania

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu VENTURES/2012-9/3 finansowanego przez Fundację Nauki Polskiej i współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem sprzętu zakupionego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Polskiego Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (grant nr POIG.02.01.00-12-023/08).

Summary

Four types of acrylamide hydrogels of significantly different elasticity modulus were obtained. Their mechanical properties were compared by measuring the velocity of propagation of ultrasonic waves, and then the influence of the substrate elasticity on keratinocytes behavior was studied.

We confirmed that acrylamide substrates are appropriate materials to culture keratinocyte cells which, on the other hand, are a very good model to study parameters of cell migration process. We proved that the keratinocytes average migration velocity on the stiff substrates was significantly higher than on substrates of elasticity modulus of 10 to 40 times lower. Observed in this work changes of keratinocytes shape on the soft substrates unambigously indicate an influence of the substrate elasticity on this type of cells.

Acknowledgements

••••

This work was done in the framework of the project VENTURES/2012-9/3 financially granted by Foundation for Polish Science, co-financed from European Union, Regional Development Fund.

The research was carried out with the equipment purchased thanks to the financial support of the European Regional Development Fund in the framework of the Polish Innovation Economy Operational Program (contract no. POIG.02.01.00-12-023/08).

Piśmiennictwo

[1] Ross Aftin M., Zhongxiang J., Bastmeyer M., Lahann J.: Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity. Cell Culture Substrates 8 (2012) 336-355.

[2] Jagur-Grodzinski J.: Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. Polymer Advanced Technologies 21 (2010) 27-47.

[3] Kirschner Chelsea M., Anseth Kristi S.: Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. Acta Materialia 61 (2013) 931-944.

[4] Cichocki T., Litwin J.A., Mirecka J.: Kompendium histologii, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego 2011.

[5] Kilarski W.: Anatomia ryb. Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Sp. z.o.o., Poznań, 2012.

[6] Lee J., IshiharaA., Theriot J.A.: Principles of locomotion for simple-shaped cells. Nature 362 (1993) 167-171.

[7] Pelham, R.J. Jr. and Wang, Y.: Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:13661-13665 (1997).

References

[8] Khatiwala C.B., Peyton S.R., Putnam, A.J.: Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of preosteoblastic MC3T3-E1 cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 290 (2006) C1640-C1650.

[9] Flanagan L.A., Ju Y.E., Marg B., Osterfield M., Janmey P.A.: Neurite branching on deformable substrates. Neuroreport 13 (2002) 2411-2415.

[10] Tse J.R., Engler A.J.: Preparation of Hydrogels Substrates with Tunable Mechanical Properties. Current Protocols in Cell Biology Suppl. 47 (2010) 10.16.1-10.16.16.

[11] Dziob D., Nowak J., Laska J., Kolodziej T., Cyzio P., Zamora K., Raczkowska J., Rajfur Z.: The influence of substrate elasticity on the migration parameters of fish keratocytes. Submitted to Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.

OCENA DZIAŁANIA IN VITRO DOKSYCYKLINY UWALNIANEJ Z BIORESORBOWALNEGO POLIMEROWEGO NOŚNIKA NA SZCZEP DESULFOVIBRIO DESULFURICANS

Anna Kopytyńska-Kasperczyk^{1*}, Piotr Dobrzyński^{2,3}, Marzena Jaworska-Kik¹, Małgorzata Pastusiak²

¹ KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC
² CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH, POLSKA AKADEMIA NAUK, UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE
³ AKADEMIA JANA DŁUGOSZA, WYDZIAŁ MATEMATYCZNO-PRZYRODNICZY, UL. ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-218 CZĘSTOCHOWA
* E-MAIL: AKOPYTYNSKA_KASPERCZYK@GO2.PL

Streszczenie

Systemy miejscowego uwalniania leku stanowią obiecującą drogę leczenia chorób przyzębia współtowarzyszącą mechanoterapii. Uzasadnieniem dla ich zastosowania jest fakt, że osiągają one dno kieszonki dziąsłowej, które jest niedostępne dla narzędzi stomatologicznych. Przyszłość tychże systemów bardzo silnie związana jest z polimerowymi nośnikami leku. Celem prezentowanych badań było oszacowanie działania jakościowego wcześniej opracowanych systemów miejscowego uwalniania doksycykliny, opartego na polimerowym nośniku leku (bioresorbowalne kopolimery o wysokiej elastyczności: ɛ-kaprolaktonu z trimetylowęglanem oraz kopolimer glikolidu z ε-kaprolaktonem) na potencjalnie patogenny dla przyzębia szczep Desulfovibrio desulfuricans. Wykorzystana w badaniach doksycyklina została wybrana ze względu na swoje dodatkowe szczególne właściwości, które nie związane są z jej wpływem na bakterie, a bardzo pomocne w terapii chorób przyzębia. Wykonano badanie oceny wrażliwości szczepu i wyznaczono minimalne stężenie hamujące (MIC) dla doksycykliny. Ocenę skuteczności systemu in vitro przeprowadzono poprzez wystawienie szczepu Desulfovibrio desulfuricans na działanie doksycykliny uwalnianej z polimerowych nośników w kolejnych dobach badania. Każdego dnia badania dokonywano odczytu wzrostu kolonii bakteryjnych na płytkach z podłożem. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono szczególną przydatność systemu zawierającego 5% leku, formowanego z udziałem kopolimeru o składzie 80% mol. kaproilu i 20% mol. jednostek węglanowych. System ten zapewnia pełną skuteczność w walce z tą modelową dla chorób przyzębia bakterią w okresie 8 dni od wprowadzenia.

Słowa kluczowe: periodontitis, miejscowe uwalnianie leku, doksycyklina, Desulfovibrio desulfuricans

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 19-23]

IN VITRO EVALUATION OF DOXYCYCLINE RELEASED FROM BIODEGRADABLE POLYMERIC CARRIER ON DESULFOVIBRIO DESULFURICANS STRAIN

Anna Kopytyńska-Kasperczyk^{1*}, Piotr Dobrzyński^{2,3}, Marzena Jaworska-Kik¹, Małgorzata Pastusiak²

 ¹ DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND
 ² CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCE, M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLAND
 ³ THE FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES, JAN DLUGOSZ UNIVERSITY, ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-218 CZĘSTOCHOWA, POLAND
 * E-MAIL: AKOPYTYNSKA_KASPERCZYK@G02.PL

Abstract

Local drug delivery systems are promising route of drug administration in periodontal treatment, parallel to scaling and root planning (SRP). The concept of this form of treatment is justified by the fact that it reaches the area unavailable for dental instruments. The future of these systems is tightly connected with polymeric drug carriers. The aim of this study was evaluation of polymeric local doxycycline delivery system (designed and described earlier) and its antimicrobial effect on Desulfovibrio desulfuricans, potentially pathogenic to periodontal tissue. Doxycycline used in the study was chosen for its additional special non-antibiotic properties that may be very helpful in periodontal treatment. The presented and tested polymeric drug carriers were flexible bioresorbable copolymers of *ε*-CL/TMC and ε-CL/GL. Bacteria susceptibility to doxycycline has been estimated and doxycycline Minimal Inhibitory Concentration (MIC) has been fixed. The antimicrobial effect of examined systems has been tested by D.desulfuricans exposure to doxycycline released daily from copolymers. Bacterial colony growth on agar plates was examined each day of the study. On the basis of these investigations, 20%TMC/80% ϵ -CL copolymer has been reported to be the most suitable for the designed local drug device. It showed doxycycline release able to inhibit bacterial growth during 8 days of the experiment.

Keywords: periodontitis, local drug delivery, doxycycline, Desulfovibrio desulfuricans

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 19-23]

Introduction

The first to introduce the idea of local drug delivery in periodontal treatment was Goodson in 1979. The concept of this form of treatment is the fact that it reaches area unavailable for dental tools used in scaling and root planning (SRP) and the bottom of periodontal pocket. This route of administration enables drug to remain directly where it was applied until it gains the antimicrobial effect. Periodontal pocket provides reservoir bathed by gingival crevicular fluid (GCF) and is easily accessible for insertion of drug delivery device [1]. Jako pierwszy koncepcję miejscowego podawania leku w leczeniu przyzębia zaproponował w 1979 r. Goodson i wsp., a u podstaw takiej metody leżał fakt, że w ten sposób możliwe byłoby osiągnięcie dna kieszonki dziąsłowej (niedostępnej instrumentom stosowanym przy konwencjonalnym leczeniu poprzez mechaniczne usuwanie złogów nadi poddziąsłowych) przez lek, który mógłby pozostawać bezpośrednio w miejscu swojego działania aż do czasu uzyskania efektu przeciwbakteryjnego. Kieszonka dziąsłowa stanowi naturalny rezerwuar opłukiwany przez płyn dziąsłowy i jest także miejscem łatwo dostępnym dla umieszczenia w niej systemu uwalniającego lek [1].

Systemy miejscowego uwalniania leku można podzielić ze względu na mechanizm kontrolowanego uwalniania leku. Wyróżniamy: systemy rozpuszczalnych matryc oparte na makromolekularnej przepuszczalności matrycy dla małych molekuł po spęcznieniu w uwodnionym medium, systemy-rezerwuary uwalniające lek poprzez dyfuzję przez polimerową błonę, systemy kontrolowane chemicznie, gdzie szybkość uwalniania leku jest kontrolowana prędkością i rozległością degradacji wiązań chemicznych i erozji matrycy polimerowej. We wszystkich tych systemach bazowy polimer może być pochodzenia naturalnego (np. kolagen czy inne białka), półsyntetycznego (pochodne celulozy) lub syntetycznego. Spośród tych ostatnich, największą popularnością cieszą się polimery degradowalne [1].

Rozważano zastosowanie naturalnych polimerów jako biodegradowalnych nośników. Jednakże, większość z nich ma wady wynikające z ich struktury, takie jak ograniczony okres półtrwania, złożoność budowy oraz immunogeniczność z powodu obecności samych polimerów lub produktów ich rozpadu. Dotychczas opracowano i przebadano in vitro lub/i in vivo wiele systemów opartych na polimerowych nośnikach leku. Niestety, większość prac dostarcza niewiele informacji na temat wpływu tychże systemów na progresję choroby. Ponadto, niewiele jest danych na temat zmian w mikroflorze kieszonki dziąsłowej, dlatego trudno jest ustalić odpowiednie schematy leczenia. Większość tych systemów jest nieresorbowalna. Te systemy, które nie są biodegradowalne, należy usunąć po całkowitym uwolnieniu leku z matrycy. Usuwanie nośnika leku może spowodować podrażnienie tkanek i stan zapalny w miejscu leczonym. Dlatego przewaga leży po stronie biodegradowalnych systemów kontrolowanego uwalniania leku, które można umieścić na długi okres w kieszonce dziasłowej. Dodatkowym atutem takiego rozwiązania jest brak konieczności ponownej wizyty pacjenta w gabinecie lekarskim związanej z koniecznością usunięcia nośnika z kieszonki dziąsłowej [1].

Do tej pory opracowano rozmaite postaci systemów miejscowego uwalniania leku do leczenia chorób przyzębia. Wśród nich najczęściej spotykane to: włókna, filmy, systemy do iniekcji, mikrocząstki, żele, paski, kompakty, nanocząstki [1].

Jednym z antybiotyków stosowanych w leczeniu chorób przyzębia jest doksycyklina (RYS. 1). Doksycyklina należy do grupy tetracyklin. Tetracykliny to antybiotyki o właściwościach bakteriostatycznych, charakteryzujące się szerokim zakresem działania zarówno na bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne. Charakteryzują się one długim okresem półtrwania [2]. Poza oddziaływaniem na bakterie, tetracykliny posiadają także szereg właściwości niezwiązanych z tymi przeciwbakteryjnymi.

Tetracykliny mogą działać jak jonofory i w ten sposób wspomagać transport kationów metali przez bariery syntetyczne, ale także błony naturalne. Kolejną ich właściwością jest hamowanie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, co pośrednio obniża produkcję kolagenazy. Intra pocket local delivery devices may be divided into two broad groups on the basis of their degradability: non degradable devices (first generation) and degradable devices (second generation). When considering drug release mechanism, it is possible to distinguish: systems based on soluble matrix, where matrix is permeable for micromolecules when swelling in hydrated medium; systems-reservoirs releasing drug by diffusion through polymeric membrane; chemically controlled systems, where release rate depends on velocity and range of chemical bonds cleavage and polymer matrix degradation. For all of these systems, basic polymer may be of natural origin (such as collagen or other proteins), semi-synthetic (cellulose derivatives) or synthetic (preferably degradable) [1].

Natural polymers have been considered as biodegradable drug carriers. Nevertheless, most of them show disadvantages related to their structure: limited half-life, complexity of their composition and immunogenicity owing to polymer itself or products of its degradation. So far many polymer-based local delivery devices have been evaluated in vitro or/and in vivo. Unfortunately, little information about their influence on disease's progression is available. In addition, it seems difficult to establish treatment patterns due to few clinical data referring to changes in periodontal pocket microflora. Most of the devices are non resorbable. Non degradable devices must be removed after the total drug releasing. Removal of the device may lead to tissue irritation and inflammation in treated area. Therefore degradable matrices are much more useful. They may be inserted safely into periodontal pocket for longer period of time. Another advantage of such carrier is the fact that it does not require the patient to pay another visit to the dental office [1].

Various forms of local drug delivery systems have been examined. The most common are: fibers, films, injectable systems, microparticles, gels, strips, compacts and nanoparticles systems [1].

One of the antimicrobial agents used in periodontal treatment is doxycycline (FIG. 1). Doxycycline is a member of tetracycline group. Tetracyclines are antimicrobial agents with broad spectrum, both Gram-positive and Gram-negative bacteria. This group of antibiotics has a long half-life. Apart from antimicrobial effect, tetracyclines have also nonantibiotic properties [2].

Tetracyclines may work as ionophores and support metal cations transport through synthetic and natural membranes. Its another advantage is inhibition of MMPs what decreases collagenase production. Tetracyclines are also reported to inhibit angiogenesis [3] and to have antiapoptotic properties [4]. It is also very important for periodontal treatment purposes (especially periodontitis treatment) that tetracyclines have beneficial effect on bone metabolism – because they reduce osteoblasts' function [3].



RYS. 1. Wzór chemiczny doksycykliny. FIG. 1. Doxycycline structure.

Ponadto ta grupa antybiotyków ma zdolność hamowania angiogenezy [3]. Ostatnie badania wskazują także na antyapoptotyczne własności tetracyklin [4]. Kolejną, niezwykle ważną dla leczenia chorób przyzębia cechą tetracyklin jest pozytywny ich wpływ na metabolizm kości (redukcja funkcji osteoklastów) [3].

Desulfovibrio desulfuricans należy do grupy bakterii redukujących siarczany (BRS). Willis i wsp. Stwierdzili obecność BRS w jamie ustnej człowieka [5]. Van der Hoeven i wsp. przebadali grupę 43 osób i u 25 z nich odnotowali istnienie w jamie ustnej bakterii z rodzaju *Desulfobacter* oraz *Desulfovibrio* [6]. Wielce prawdopodobne jest więc to, że BRS są przyczyną etiologiczną chorób przyzębia, w tym parodontozy [7,8]. Z tego powodu mogą służyć, jako modelowe organizmy patogenne do badań skuteczności leczenia chorób przyzębia w warunkach *in vitro*.

Materiały i metody

Formowanie polimerowych systemów uwalniania doksycykliny

Do realizacji założeń systemu uwalniania doksycykliny, który w postaci odpowiednio dopasowywanych pierścieni ma być wprowadzany poprzez przeciąganie przez koronę zęba do kieszeni zębowych, poszukiwaliśmy biokompatybilne i biodegradowalne kopolimery spełniające wymagane w wypadku takiego zastosowania warunki, to jest stosunkowo dobrą wytrzymałość mechaniczną i wysoką elastyczność. Jedynie takie własności matrycy pozwalają na dość łatwy montaż systemu, a zarazem nie obniżają komfortu pacjenta. Materiały polimerowe, które wybrano na nośniki doksycykliny spełniające wcześniej założone warunki, to kopolimery glikolidu (GL), ε-kaprolaktonu (ε-CL) oraz węglanu trimetylenu (TMC) o różnych udziałach jednostek monomerycznych: 10% GL / 90% ε-CL, 50% TMC / 50% ε-CL, 20% TMC / 80% ε-CL. Sposób syntezy kopolimerów, metodę formowania tych matryc, jak i kinetykę uwalniania z nich doksycykliny w warunkach in vitro przedstawiono w naszej wcześniejszej publikacji [9]. Spośród przebadanych materiałów najlepszym profilem uwalniania, zbliżonym do liniowego, charakteryzował się materiał o składzie 20% TMC / 80% ε-CL z zawartością 5% wag. leku.

Badania skuteczności bakteriostatycznej wykonanych systemów

W pierwszym etapie badań, celem poznania zachowania badanego szczepu Desulfovibrio desulfuricans na doksycyklinę, wykonano badanie wrażliwości metodą seryjnych rozcieńczeń (0,03-64 µg/ml) w podłożu płynnym (pożywka Postgate'a). Szczep Desulfovibrio desulfuricans, przeznaczony do badań hodowano na pożywce pirogronianowej Postgate'a [10] z obniżoną zawartością MgCl₂ do 25 mg/L. W celu realizacji badań wykonano serię rozcieńczeń (0,03-64 µg/ml) antybiotyku w płynnym podłożu (płynna pożywka rozcieńczano znane stężenie antybiotyku), a następnie każdą z tak otrzymanych próbek zaszczepiono znaną liczbą komórek bakteryjnych. Inokulum (0,5 w skali Mc Farland) wraz z rozcieńczeniami antybiotyku wysiewano na szklane płytki z agarem. Po 48 godzinnym okresie inkubacji w komorze MACS MG 500 (Anaerobic Workstation dW Scientific, West Yorkshire, Anglia) w atmosferze zawierającej 80% N₂, 10% H₂ i 10% CO₂ w temperaturze 37°C, dokonywano odczytu wzrostu (lub jego braku) szczepu na płytkach z podłożem. Najniższe stężenie doksycykliny, dla którego nie zaobserwowano wzrostu, zostało odnotowane jako MIC - najniższe stężenie hamujące wzrost równe około 0,12 µg/ml.

Desulfovibrio desulfuricans is a member of sulfate reducing bacteria (BRS). Willis et al. have confirmed *D. desulfuricans* presence in human oral cavity [5]. Van der Hoeven et al. have examined a group of patients, 25 out of 43 examined have been reported to have in oral cavity microflora *Desulfobacter* and *Desulfovibrio spp.* [6]. It is greatly probable that BRS play a major role in periodontal diseases and *periodontitis* etiology [7,8]. This is why the *D. desulfuricans* strain may be a model pathogenic strain to estimate antimicrobial effect on periodontal pathogens *in vitro*.

Materials and methods

Formation of polymeric devices for doxycycline release

For implementation of designed drug release system we assume that flexible ring-like matrices will be stretched onto tooth root's surface and placed into periodontal pocket. Therefore we have searched for biocompatible and biodegradable copolymers with properties adequate for periodontal purposes, i.e. with relatively good mechanical strength and high flexibility. Only these properties of polymeric matrix will assure the comfort to the patient. Polymer materials taken into consideration, owing to their required properties that matched assumptions, were copolymers of glycolide (GL), ϵ -caprolactone (ϵ -CL) and trimethylene carbonate (TMC) with various molar ratio of monomers: 10% GL / 90% ϵ -CL, 50% TMC / 50% ϵ -CL.

The copolymers synthesis, the way of matrices formation and kinetics of the drug release *in vitro* have been described earlier in our paper [9]. Among all of examined materials, the one with the most suitable doxycycline release profile (closest to linear) was the matrix formed with 20%TMC / 80% ϵ -CL copolymer and 5% wt. of doxycycline.

Study on antimicrobial effect of designed systems

The first step of the study was Desulfovibrio desulfuricans susceptibility to doxycycline testing. The chosen method was broth dilution test. This method involves preparing a set of doxycycline dilution in a liquid growth-medium dispensed in tubes. The following step was to inoculate the medium. The used medium was previously described by J.R. Postgate [10] with MgCl₂ concentration of 25 mg/L. The doxycycline concentrations in medium ranged between 0.03 and 64 µg/ml. The inoculum (0.5 according to Mc Farland standard) with different doxycycline concentrations was gained. Agar plates were immediately inoculated by loop starting with the lowest doxycycline concentration by spreading 10 µl of the inoculation-suspension. Plates were incubated for 48 hours in anaerobic conditions with MACS MG 500 (Anaerobic Workstation dW Scientific, West Yorkshire, England) at 37°C and following anaerobic conditions: 80% N₂, 10% H₂ and 10% CO₂. After 48 hours of incubation, the agar plates have been examined. The minimum inhibitory concentration (MIC) was recorded as the lowest concentration without visible bacteria growth.

The antimicrobial effectiveness of the system has been tested in the same conditions. Ring-like samples (weight about 0.03 g) of polymeric matrices (drug carriers) were immersed in inoculum. Bacterial strain suspended in liquid growth-medium was exposed to daily dose of doxycycline released from different matrices. After 24 hours of incubation in anaerobic conditions, polymer matrices were removed and placed in "fresh" portion inoculum. The "old" inoculum with the released doxycycline was plated on agar and incubated for 48 hours in anaerobic conditions. After 48 hours of incubation the plates were observed, and visible growth or lack or growth on plates were reported for each copolymer.

Badanie oceny skuteczności przeciwbakteryjnej systemu uwalniającego doksycyklinę przeprowadzano w tych samych warunkach. Próbki badanych systemów polimerowych (różnych nośników leku), o kształcie pierścieni wyciętych z folii o masie ok. 0,03 g umieszczano w inokulum. Bakterie zawieszone w płynnej pożywce wraz z wprowadzonym badanym systemem uwalniającym lek, umieszczano na okres jednej doby w komorze beztlenowej. Po 24 godzinach działania antybiotyku uwalniającego się w tym czasie z matrycy do pożywki (równego uwolnionej dobowej dawce), oddzielano pożywkę od próbki polimerowej, a inokulum wysiewano na płytki z podłożem stałym. Po następnych 48 godzinach inkubacji w warunkach beztlenowych, dokonywano oceny ilości tworzących się kolonii bakterii lub stwierdzano ich brak. Próbę kontrolną stanowiły matryce polimerowe nie zawierające leku, które analogicznie umieszczane były w zawiesinie bakterii, a po okresie 24 godzin, wysiewane na podłoże i poddawane inkubacji w warunkach beztlenowych. Czynności powtarzano dla tej samej próbki przez kolejne doby. W ten sposób notując wpływ działania bakteriobójcze-

Wyniki i dyskusja

dobach badania.

Wyniki badania skuteczności bakteriostatycznej (wyrażone brakiem wzrostu bakterii) dla poszczególnych polimerowych nośników doksycykliny przedstawione zostały w TABELI 1.

go uwalniającej się dawki antybiotyku w drugiej i kolejnych

Wszystkie matryce w trakcie pierwszych czterech dni uwalniały doksycyklinę w ilości powyżej wcześniej wyliczonej wartości MIC, co powodowało silne hamowanie wzrostu *Desulfovibrio desulfuricans* na zastosowanym podłożu. Począwszy od piątej doby zaobserwowano powolny wzrost bakterii, które przypisane były matrycom o składzie 10% GL / 90% ε-CL oraz 50% TMC / 50% ε-CL. Zaobserwowane zjawisko było związane z spadkiem dobowej ilości uwalnianego antybiotyku w tych próbach. Spadek ten nie był jednak na tyle dramatyczny, aby nie zanotować wpływu układu na namnażanie się badanych mikroorganizmów.

Dla matrycy wykonanej z kopolimeru 10% GL / 90% ε-CL odnotowano wzrost jedynie kilkudziesięciu kolonii, natomiast dla drugiej z nich formowanej z kopolimeru 50% TMC / 50% ε-CL już na poziomie kilkuset (RYS. 2). W kolejnych dniach badania proporcje te odwróciły się na korzyść matrycy 50% TMC / 50% ε-CL. Matryca 20% TMC / 80% ε-CL uwolniła ilości doksycykliny hamujące wzrost D. desulfuricans do 8 doby włącznie. W kolejnych dobach badania liczba kolonii na płytkach oscylowała wokół kilkudziesięciu, wyjątek stanowiła 11 doba badania, kiedy to odnotowano wzrost na poziomie kilkuset kolonii, aby w kolejnej dobie powrócić do poziomu trzydziestu.

The obtained results were analyzed. The control group of samples was inoculum with polymeric matrices without the drug. All of the study steps and conditions were the same for examined and control groups. The examined samples were exposed to daily dosage of doxycycline released from different polymeric matrices so as to evaluate the antimicrobial effect of polymeric materials. Every day of the study was reported separately.

Results and Discussions

The susceptibility to doxycycline for *D. desulfuricans* was detected at a concentration of 0.12 μ g/ml. The results of bacterial growth for different kinds of copolymer carriers are shown in TABLE 1.

TABELA 1. Badania skuteczności bakteriostatycznej polimerowych nośników doksycykliny. TABLE 1. Antimicrobial effect on *D. desulfuricans* expressed by no visible colony growth on agar plates.

| Kolejne doby badania Day of the experiment | 10% GL / 90% ε-CL | 50% TMC / 50% ε-CL | 20% TMC / 80% ε-CL | | | | |
|--|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| 1. | - | - | - | | | | |
| 2. | - | - | - | | | | |
| 3. | - | - | - | | | | |
| 4. | - | - | - | | | | |
| 5. | _/+ | + | - | | | | |
| 6. | + | + | - | | | | |
| 7. | + | + | - | | | | |
| 8. | + | + | - | | | | |
| 9. | + | + | -/+ | | | | |
| 10. | + | + | + | | | | |
| Gdzie: (-) - brak pojawienia się widocznych kolonii, (-/+) - obecność pojedynczych kolonii, (+) - obecność dużej liczby kolonii bakterii Where: (-) - no visible colony growth, (-/+) - single colonies | | | | | | | |

growth, (+) - multiple colony growth visible plates 1200 10%GL/ 90%CL Number of colonies visible on agar 1000 Liczba kolonii na podłożu Ø 50%TMC/50%CL 800 20%TMC/80%CL 600 400 200 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Doba badania / Day of the study

RYS. 2. Zależność liczby kolonii *D. desulfuricans* w zależności od czasu uwalniania doksycykliny i rodzaju zastosowanej matrycy polimerowej. FIG. 2. Dependence of *D. desulfuricans* colony growth on time and different drug carriers used in the study. Obserwowane fluktuacje spowodowane były nierównomiernym uwalnianiem antybiotyku z jednej strony, jak i wolną dyfuzją roztworu tego leku w żelowej pożywce, co było spowodowane statycznym charakterem prowadzonej hodowli.

Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonego badania niewątpliwie widać, że matryca polimerowa o składzie kopolimeru 20% TMC / 80% ε-CL jest najlepszym nośnikiem doksycykliny dla założonego systemu. Z przeprowadzonych wcześniej badań własnych [9] wynika, że system formowany z użyciem tego kopolimeru odznacza się także najkorzystniejszym profilem uwalniania leku w badanej grupie. To zjawisko jest bezpośrednią przyczyną tak dobrego zachowania biostatycznego tego badanego systemu. Okres hamowania wzrostu bakterii w środowisku płynnej pożywki Postgate'a, był jedynie nieznacznie różny od przewidywanego na podstawie wcześniej badanej kinetyki uwalniania leku, a założony na podstawie ilości leku uwolnionego w dawkach powyżej minimalnego stężenia hamującego - MIC dla doksycykliny okres, w obu badaniach wyniósł 7 dni. Znacznie większe różnice wystąpiły w wypadku badań in vitro dwóch pozostałych materiałów. Różnica ta wynika przede wszystkim z innej szybkości dyfuzji leku zawartego w kopolimerze do płynnej, gęstej pożywki bakteryjnej, znacznie wolniejszego w porównaniu do środowiska "sztucznej śliny", w którym wcześniej badano przebieg uwalniania doksycykliny z badanych systemów [9]. Wytypowany w opisanych badaniach materiał na matryce - kopolimer 20% TMC / 80% ε-CL z uwagi na swoją potwierdzoną w osobnych badaniach biozgodność, biodegradowalność i elastyczność, wydaje się być optymalnym nośnikiem leku dla projektowanego skutecznego systemu miejscowego uwalniania doksycykliny, który może znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób przyzębia. W warunkach in vivo ze względu na zwiększoną szybkości dyfuzji w środowisku płynu zalegającego w kieszonkach zębowych oczekiwać należy nawet większą efektywność bakteriostatyczną tego systemu wobec bakterii, w porównaniu ze stwierdzoną w opisanych badaniach.

Podziękowania

Praca realizowana w ramach Regionalnego Funduszu Stypendiów Doktoranckich 2, oraz finansowana z działalności statutowych CMPW PAN w Zabrzu i SUM w Sosnowcu.

Piśmiennictwo

[1] Kaplish V., Walia M.K., Kumar S.L.H.: Local drug delivery systems in the treatment of periodontis; A Review. Pharmacophore (An Int. Res. J.) 4, 2 (2013) 39-49.

[2] Sender-Janeczek A., Ziętek M.: Miejscowe zastosowanie antyseptyków i antybiotyków w leczeniu przewlekłego zapalenia przyzębia – przegląd piśmiennictwa. Dent. Med. Probl. 44, 3 (2007) 396-402.

[3] Sapadin A.N., Fleischmajer R.: Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. J Am Acad Dermatol 54 (2006) 258-65.

[4] Yjranheikki J., Keinanen R., Pelikka M., Hokfelt T., Koistinaho J., Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 15769-74.

[5] Willis C.L., Cummings J.H., Neale G., Gibson G.R.: Growth, incidence and activities of dissimilatory sulfatreducing bacteri in the human oral cavity. FEMS Microbiol Lett. 129 (1995) 267-272.

All of examined copolymers have released daily amounts of doxycycline able to inhibit *D.desulfuricans* growth for four days (above estimated MIC). Starting with day 5, colonies growth has been noticed for two copolymers: 10% GL / 90% ϵ -CL and 50% TMC / 50% ϵ -CL. This was a result of drug concentration decrease, but the observed phenomenon appeared rather limited. The agar plates referring to copolymer 10% GL / 90% ϵ -CL showed only tens of colonies grown. Plates referring to 50% TMC / 50% ϵ -CL matrices revealed growth of hundreds of colonies at the same day (FIG. 2.). In following days of the study the 50% TMC / 50% ϵ -CL matrices gained less colonies growth. Only 20% TMC / 80% ϵ -CL matrices were able to inhibit *D. desulfuricans* development within 8 days of the conducted experiment. From day 9, practically only tens of colonies were reported.

The irregularity of colonies growth observed during the experiment was a result of uneven drug release and slow drug diffusion into agar medium.

Conclusions

Based on the results of this study, it may be concluded that 20% TMC / 80% ε-CL copolymer is the best doxycycline carrier of the designed drug delivery system. It has also been shown in earlier own studies [9] that this copolymer had the most suitable doxycycline release profile among the group of examined materials. The period of bacterial growth inhibition was only slightly different from predicted according to drug release kinetics. For both studies, the period of doxycycline release above Minimal Inhibitory Concentration have been gained for seven days. The differences were bigger for other materials and it may be explained by the fact that drug diffusion rate differs in artificial saliva and bacteria supporting growth medium. The chosen 20% TMC / 80% E-CL copolymer has been described as biocompatible, biodegradable and flexible. It seems to be the most suitable drug carrier for the effective local drug delivery of doxycycline among analyzed systems. The described drug carrier may be used for periodontal treatment purposes. It might be expected that in vivo antimicrobial effect of the system will be higher due to higher drug diffusion rate GCF bathing the periodontal pocket.

Acknowledgments

.

The study was supported by RFSD2 scholarship and performed in Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Science in Zabrze as well as Department of Biopharmacy, Medical University of Silesia in Sosnowiec.

References

[6] Van der Hoeven J.S., Van den Kieboom C.W., Schaeken M.J., Sulfate-reducing bacteria in periodontal pocket. Oral Microbiol. Immunol.10 (1995) 288-290.

[7] Boopathy R., Roichaux M., LaFont D., Howell M.: Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket. Can. J. Microbiol. 48 (2002) 1099-1103.

[8] Langendijk P.S., Kulik D.M., Sandmeier H., Meyer J., Van der Hoeven S.J.: Isolation of Desulfomicrobium orale sp. Nov and Desulfovibro strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. Intern. J. Sys. Evol. Microbiol. 51 (2001) 1035-1044.

[9] Kopytyńska-Kasperczyk A., Dobrzyński P.: Polymeric matrices as carriers for local doxycycline delivery dedicated for periodontal purposes – preliminary report". Engineering of Biomaterials 109-111 (2011) 17-21.

[10] Postgate J.R.: The sulfate-reducing bacteria. Cambridge University Press, Cambridge 1984.

MOŻLIWOŚCI I OGRANICZENIA W STOSOWANIU METODY ILIZAROWA W WETERYNARII

STANISŁAW MAZURKIEWICZ*, MACIEJ SIWECKI

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki, Wydział Mechaniczny, Instytut Mechaniki Stosowanej, Al. Jana Pawła II 37, 31-864 Kraków * e-mail: stan@mech.pk.edu.pl

Streszczenie

W artykule przedstawiono przegląd zastosowania metody Ilizarowa w leczeniu złamań kości u zwierząt. W krajach takich jak Włochy, Turcja czy Francja metoda ta stosowana była z pozytywnym skutkiem już w latach 80-tych ubiegłego wieku. W zależności od rejonu świata powstawały różne jej modyfikacje. Na kontynencie amerykańskim opracowano liczne warianty stosowane do dziś. W Europie najbardziej znane konstrukcje to: Rhesear Small Bone Fixator, Dynamic External Fixator, External Circular Stabilization. Wykorzystanie metody Ilizarowa w weterynarii wymaga odpowiedniej modyfikacji konstrukcji aparatu.

W Polsce w ostatnim dwudziestoleciu podejmowane były próby zastosowania tej metody u małych zwierząt takich jak psy i koty. W artykule zaprezentowano własną, oryginalną modyfikację aparatu, omówiono technikę jego zakładania, zaprezentowano sposób aplikacji na wyizolowanych kościach oraz na kończynach psa. W zakończeniu zaprezentowano wnioski dotyczące możliwości i ograniczenia zastosowania metody Ilizarowa w weterynarii.

Słowa kluczowe: Ilizarow, weterynaria, stabilizator, modyfikacja

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 24-28]

Wprowadzenie

Spośród licznych współczesnych technik i metod stosowanych w operacyjnym leczeniu złamań kończyn długich począwszy od Codwilla (1905), Puttiego (1921), Alana (1933), Andersona (1952), Grucy (lata pięćdziesiąte ubiegłego wieku) oraz Waisa i Kowalskiego, na szczególną uwagę zasługuje metoda Ilizarowa, opisana po raz pierwszy w 1954 roku przez G. Ilizarowa. Zastosowana była ona początkowo do zewnętrznej stabilizacji otwartych złamań kości długich, a w następnych latach - do egalizacji i operacyjnego leczenia licznych, nieraz złożonych przypadków traumatologicznych i korekcyjnych. Zajmuje jednak szczególne miejsce wśród stabilizatorów, dzięki swej unikalnej, wykorzystującej obręcze konstrukcji, pozwalającej na tworzenie wielorakich konfiguracji, adekwatnych do określonych przypadków leczenia - między innymi stawów rzekomych, wrodzonych deformacji itp. W trakcie leczenia tą metodą tworzy się w szczelinie złamania tkanka kostna i proces ten nazywany jest osteogenezą. Aparat charakteryzuje się dużą sztywnością i ogólną stabilnością, co pozwala na poruszanie się pacjenta w trakcie leczenia. Równocześnie uzyskuje się w nim określoną podatność osiową spełniającą wymóg tzw. dynamizacji. Jest to korzystne z uwagi na zachodzący w trakcie leczenia proces funkcjonalnej adaptacji tkanki kostnej do zewnętrznych obciążeń. Obszerny opis metody i zasady jej stosowania przedstawiono w pracy [1].

POSSIBILITIES AND LIMITATIONS OF THE APPLICATION OF THE ILIZAROV METHOD IN VETERINARY MEDICINE

STANISŁAW MAZURKIEWICZ*, MACIEJ SIWECKI

TADEUSZ KOŚCIUSZKO CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, INSTITUTE OF APPLIED MECHANICS, AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKÓW * E-MAIL: STAN@MECH.PK.EDU.PL

Abstract

The article presents a review of the applications of the Ilizarov method in the treatment of animal bone fractures. In such countries as Italy, Turkey and France, this method was successfully applied already in the 1980s. Depending on the world region, various modifications have been created. On the American continent, numerous variants have been elaborated, which have been applied up till now. In Europe, the most popular constructions are: Rhesear Small Bone Fixator, Dynamic External Fixator and External Circular Stabilization. The application of the Ilizarov method in veterinary medicine requires a proper modification of the apparatus construction.

In Poland, attempts at using the method in the cases of small animals, such as dogs and cats, have been made in the last two decades. The articles discusses the own, original modification of the apparatus, describes the technique of its installation and presents the method of application on dissected bones and on the limbs of the dogs. The final section draws the conclusions regarding the possibilities and limitations of the application of the llizarov method in veterinary medicine.

Keywords: *Ilizarow, veterinary medicine, stabilizer, modification*

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 24-28]

Introduction

Among the numerous contemporary techniques and methods applied in the surgical treatment of long bone fractures, such as that of Codwill (1905), Putti (1921), Alan (1933), Anderson (1952), Grucy (the 1950s) as well as Wais and Kowalski, a special attention should be paid to the Ilizarov method, which was described for the first time by G. Ilizarov in 1945. It was initially applied for the external stabilization of open long bone fractures, and in the consecutive years - also for the equalization and surgical treatment of other, often complex, traumatological and correction cases. Yet, the method has a special place among stabilizers, due to its unique circular construction, which allows for the creation of various configurations adequate for the particular treatment cases, such as that of psuedarthrosis, congenital deformations etc. During the treatment with the use of this method, bone tissue is created in the fracture gap, and this process is referred to as osteogenesis. The apparatus is characterized by high rigidity and a general stability, which makes it possible for the patient to move during the treatment. At the same time, it provides specific axial flexibility, which meets the requirement of the, so called, dynamization.

Z upływem kolejnych dziesięcioleci, z uwagi na uzyskiwane korzystne efekty w leczeniu, metoda ta rozpowszechniła się w wielu krajach oraz powstało międzynarodowe stowarzyszenie stosowania tej metody pod nazwą ASAMI (ang. Association for the Study and Application of the Method of Ilizarov and External Fixation).

Materiały i metody

W latach 80-tych ubiegłego stulecia i następnych, w kilku krajach Europy podejmowane były próby wykorzystania tej metody w weterynarii.

Jednym z pionierów stosowania odpowiednio zmodyfikowanego instrumentarium tej metody we Włoszech był A. Ferretti [2-4], zastępując dotychczas stosowane szynowe stabilizatory lub gips. Leczeniu poddawane były psy i koty, które jak podaje autor – "wykazywały dużą tolerancję na założony aparat". Autor stosował zminiaturyzowane elementy typowego zestawu takie jak pierścienie, pręty i śruby, o wymiarach zmniejszonych w stosunku do aparatów używanych w medycynie ludzkiej. Zabiegi dotyczyły m.in. dolnych odcinków kości, kości łokciowej, tułowia, piszczeli i innych. Jak podaje autor, czasy leczenia (założonego aparatu) wynosiły 35÷45 dni, a w szczególnych przypadkach dochodziły do 60 dni. Wyniki były bardzo dobre lub zadawalające.

Unikalną aplikacją metody było zastosowanie aparatu do przypadku dwuletniego konia (o wadze ponad 300 kg) leczonego w obrębie stawu śródręczno-paliczkowego.

W pracy [5] znajdujemy liczne przykłady, odpowiednio zmodyfikowanych aparatów dostosowanych do gabarytów leczonych zwierząt, jak: psów, kotów, a nawet konia i sowy. Leczenie dotyczyło między innymi złamań z przemieszczeniem kości, miednicy, kręgosłupa, pseudoartrozy.

W następnych latach we Francji Y. Latte z zespołem [6] oraz J.P. Farese [7] kontynuowali z powodzeniem wykorzystanie zmodyfikowanego aparatu głównie do małych zwierząt jak psy i koty.

W pracy [8] przedstawiono szczegółową procedurę przedoperacyjną, planowanie, aplikację i postępowanie pooperacyjne. RYS. 1 przedstawia zastosowanie aparatu Ilizarowa na kończynie piersiowej u psa.



RYS. 1. Aparat Ilizarowa zastosowany przy leczeniu kończyny piersiowej u psa [8]. FIG. 1. Ilizarov apparatus in a dog's forelimb treatment [8].

This is beneficial for the process of functional adaptation of the bone tissue to external loads which takes place during the treatment. An extensive description of this method and rules of its application was presented in [1].

In the course of the following decades, due to the positive effects achieved in the treatment, the method became popular in many other countries, followed by the creation of an international association, called ASAMI (Association for the Study and Application of the Method of Ilizarov and External Fixation).

Materials and methods

In the 1980s as well the following years, in several European countries, attempts were made at the application of the method in veterinary medicine.

One of the pioneers of the application of the properly modified instrumentarium of this method in Italy was A. Ferretti [2-4] who replaced the rail stabilizers and plaster which had been used so far. The treatment was applied to dogs and cats, which – as the author states – "demonstrated a high tolerance for the assembled apparatus". The author used miniaturized elements of the typical set, such as rings, rods and bolts, whose sizes were reduced with regards to the apparatuses used in human medicine. The surgical procedures involved the lower bone sections - elbow bones, trunk bones, tibiae and others. According to the author, the time of the treatment (with the applied apparatus) equalled 35÷45 days, and in special cases, it reached 60 days. The results were very good and promising.

A unique application of the method was the case of a two-year old horse (weight over 300 kg) treated for metacarpophalangea.

In [5], we can find numerous examples of apparatus modified according to the sizes of the treated animals, such as dogs, cats and even a horse and an owl. The treatment concerned fractures and displaced fracture of pelvis bones, spinal bones, pseudoarthrosis.

In the following years, in France, Y. Latte et al. [6] and J.P. Farese [7] successfully continued the use of the modified apparatus mainly in the case of small animals, such as dogs and cats.

Work [8] presents the detailed pre-operational procedure, the planning stage, the application and the post-operational steps. FIG. 1 shows a forelimb of a dog with the installed llizarov apparatus.

Experiments of Ilizarov apparatus applications in Polish veterinary medicine

In the 1990s, in Poland, attempts were made at the treatment of small animals with the use of the method. T. Szponder from the University of Life Sciences in Lublin presented the results of the treatment of open fractures in dogs with the particular selection of the Ilizarov method [9,10].

The advantage of the method turned out to be the option of achieving good bone adhesion, correction of bone deformations, pseudoarthrosis as well as fixation of bone fragments, with a minimal limitation of the mobility of the neighbouring joints. According to the author, the results turned out to be highly satisfying.

In the 1990s, M. Krzemiński successfully performed an orthopaedic operation on a dog involving the treatment of pseudoarthrosis of a shinbone [11].

TERIALS

Doświadczenia w stosowaniu aparatu Ilizarowaw weterynarii w Polsce

W latach 90-tych ubiegłego wieku podejmowane były w Polsce próby leczenia tą metodą małych zwierząt. T. Szponder z Akademii Rolniczej w Lublinie przedstawił wyniki stosowania metody Ilizarowa w leczeniu złamań otwartych u psów stosując ją jako metodę z wyboru [9,10]. Jej zaletą okazała się możliwość uzyskania dobrego zrostu kostnego, korekcji deformacji kości, stawów rzekomych oraz unieruchamiania odłamów kostnych, przy minimalnym ograniczeniu ruchomości sąsiednich stawów. Jak stwierdza autor wyniki okazały się bardzo zadawalające. M. Krzemiński wykonał w latach 90-tych z pozytywnym rezultatem operację ortopedyczną psa polegającą na leczeniu stawu rzekomego kości podudzia [11].



RYS. 2. Zdjęcie kondora podczas korekcji osi kończyny za pomocą aparatu Ilizarowa. FIG. 2. Photograph of a condor during the correction of the limb axis with the use of the Ilizarov apparatus.



RYS. 3. a) dwa półpierścienie z materiału kompozytowego połączone łącznikami w pierścień; b) element dwuotworowy łączący półpierścienie; c) półpierścień aluminiowy; d) łączniki 200 mm z nakrętką; e) podkładka dystansowa; f) śruba M5 z gniazdem na klucz imbusowy.

FIG. 3. a) two half rings made of composite material joined with connectors and forming a ring; b) two-aperture element connecting the half rings; c) aluminium half ring; d) 200 mm connectors with a nut; e) distance pad; f) M5 allen bolt.



RYS. 4. Elementy aparatu Ilizarowa wykorzystane w próbach na kończynach psa: a) wszczepy kostne; b) przedłużki (dystanse); c) pierścienie; d) łączniki – pręty gwintowane Ø 5; e) podkładki; f) śruby z nawierconym otworem pod łbem; f) śruby z nacięciem pod łbem; h) nakrętki M5.

FIG. 4. Ilizarov apparatus elements used on dog's limbs tests: a) bone implants; b) extensions; c) rings; d) connectors – screwed rods \emptyset 5; e) pads; f) bolts with a drilled aperture under the head; f) bolts with an indentation under the head; h) nuts M5.



RYS. 5. Połączone dwa pierścienie aparatu za pomocą prostej modyfikacji Cattaneo Catagni. FIG. 5. Two apparatus rings joined by a simple modification Cattaneo Catagni.

Pewnym ewenementem w zastosowaniu aparatu w weterynarii było jego użycie w leczeniu wrodzonej wady kondora z ogrodu zoologicznego dokonanego przez zespół pod kierownictwem A. Ziętka z Akademii Medycznej w Gdańsku (RYS. 2).

Podążając za powyższymi pionierskimi poczynaniami podjęto w latach 2011÷2012 w Katedrze Mechaniki Doświadczalnej i Biomechaniki Politechniki Krakowskiej prace studialne nad modernizacją i aplikacją aparatu Ilizarowa in vitro u psa. Modernizacja aparatu polegała na zminiaturyzowaniu, odpowiednio do wielkości pacjenta (30 kg owczarek niemiecki) wymiarów elementów aparatu oraz zmniejszeniu jego masy poprzez zastosowanie lżejszych materiałów kompozytowych. Na RYS. 3 przedstawiono półpierścienie i łączniki zaś na RYS. 4 inne elementy zminiaturyzowane stosownie do wymiarów małych zwierząt. W trakcie prac laboratoryjnych dokonano racjonalizacji instrumentarium oraz procedury zakładania aparatu stosownie do odmiennej anatomii zwierząt. RYS. 5 przedstawia oryginalną konstrukcję zestawu dwóch pierścieni o różnych średnicach, używanego w przypadku kości udowej kończyny miednicznej psa. Zakres badań laboratoryjnych obejmował montaż aparatu na wyizolowanych kościach piszczelowej i łokciowej, a także na przedniej i tylnej kończynie martwego psa. Dwa przykłady założonych aparatów na kończynie miedniczej i piersiowej owczarka niemieckiego przedstawia RYS. 6.

Szczegóły przeprowadzonego eksperymentu zaprezentowano w 2013 roku na Majówce Młodych Biomechaników w Szczyrku [12]. A special case of the apparatus application in veterinary medicine was the case of the treatment of a congenital anomaly of a zoo park condor, performed by the team of A. Ziętek from the Medical University of Gdańsk (FIG. 2).

Following the above pioneer undertakings, in 2011÷2012, at the Department of Experimental Mechanics and Biomechanics of the Cracow University of Technology, works were initiated on the modernization and in vitro application of the Ilizarov apparatus in the case of a dog. The apparatus modernization consisted in the appropriate minimization of its elements according to the size of the patient (30 kg German Shepherd) and a reduction of its weight by way of using lighter composite materials. FIG. 3 shows the half rings and the connectors, whereas FIG. 4 presents the other elements miniaturized according to the sizes of small animals. During the laboratory tests, rationalization of the instrumentarium was performed, as well as the procedure of installation according to the different animal anatomies. FIG. 5 shows the original construction of a set of two rings of different diameters used in the case of a dog's femur hind leg. The laboratory tests included the application of the apparatus on a dog's dissected bones (tibia bone and elbow bone) and on the limbs of the dog. Two examples of the apparatus were installed on a pelvis bone and breastbone of a German shepherd dog are presented in FIG. 6.

The details of the performed experiment were presented at the May Day Picnic of Young Biochemists in Szczyrk, in 2013 [12].



RYS. 6. Aparaty Ilizarowa założone na: a) kości piszczelowej; b) kości łokciowej; c) kończynie miedniczej; d) kończynie piersiowej. FIG. 6. Ilizarov apparatus models on: a) a tibia bone; b) an elbow bone; c) a pelivs bone; d) a breastbone.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania potwierdziły możliwości aplikacji aparatu w weterynarii. Zmodyfikowana konstrukcja spełniła oczekiwane wymagania. Z uwagi na znaczną rozpiętość wielkości leczonych zwierząt (od małych psów i kotów do koni i bydła) wymagana będzie poszerzona skala typoszeregu aparatu uzupełniona badaniami wytrzymałościowymi elementów nośnych konstrukcji. Celowym będzie również w przypadku małych zwierząt zastosowanie jeszcze lżejszych materiałów kompozytowych.

W szerszym stosowaniu tej metody w weterynarii celowym również będzie podobnie jak w przypadku zastosowań klinicznych u ludzi – organizowanie kursów szkoleniowych dla lekarzy weterynarii.

Results and Discussion

The performed tests confirmed the potential of the apparatus in the field of veterinary medicine. The modified construction met the expected requirements. Due to the significant range of the animals sizes (from small dogs and cats to horses and a bull), it will be necessary to expand the scale of the series of types of the apparatus, which should be supplemented by strength tests of the construction bearing elements. It will be advisable to apply even lighter composite materials in the case of small animals.

In a broader application range in veterinary medicine, organization of training courses for veterinary doctors will be worth considering, similarly to the cases of clinical applications in humans. Z dokonanego przeglądu doniesień o stosowaniu metody Ilizarowa w przypadkach traumatologicznych i terapeutycznych u zwierząt wynika, iż była i jest ona stosowana za granicą. W Polsce podejmowane są nieliczne próby jej wykorzystania, co nie stawia nas w czołówce krajów w tym zakresie. Stosowanie tej metody w weterynarii wymaga modyfikacji konstrukcji oraz metodyki zakładania aparatu, jak również poszukiwanie nowych, lżejszych materiałów.

Z doniesień literaturowych wynika jednoznacznie duża przydatność tej metody oraz jej skuteczność w leczeniu skomplikowanych złamań otwartych, a w przypadku leczenia stawów rzekomych stabilizator ten jest nierzadko metodą z wyboru.

Czynnikami ograniczającymi jej powszechne stosowanie jest być może stosunkowo duża pracochłonność, wymagane wysokie kwalifikacje operatora oraz relatywnie wysoka cena aparatu [9,10].

Osobnym zagadnieniem jest wykorzystanie tej metody do zwierząt dużych, jak koń czy krowa. Doniesienia literaturowe na ten temat są nieliczne. Z pewnością wymagać to będzie odniesienia się do zagadnień wytrzymałości, nośności i sztywności przy modernizacji typowego aparatu, jak również trudnych do przewidzenia procedur przedoperacyjnych, jak i samej operacji i postępowań pooperacyjnych.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować lek. wet. J. Bakowskiemu z lecznicy weterynaryjnej Amavet w Krakowie za życzliwe i cenne uwagi oraz pomoc przy realizacji badań.

Conclusions

From the performed review of the reports on the applications of the Ilizarov method in traumatological and therapeutical animal cases, it can be concluded that it is and has been applied abroad. In Poland, only few attempts of the Ilizarov method have been reported. Application of this method in veterinary medicine requires a modification of the construction and methodology of the apparatus installation, as well as the development of new lighter materials.

From the reports and the literature, we can conclude that this method is highly useful and effective in the treatment of complicated open fractures, and in the case of pseudoarthritis treatment, the use of the stabilizer is often recommended.

The factors limiting its common application are perhaps the relatively high labour consumption, the required high operator's qualifications and the relatively high price of the apparatus [9,10].

Another aspect is the application of the method in the case of larger animals, such as a horse or a cow. The literature reports concerning this issue are but few. It will certainly be necessary to refer to the aspects of strength, load capacity and rigidity when modernizing the typical apparatus, as well as to the, hard to predict, pre-operational procedures, the surgery itself and the post-operational steps.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Veterinary Surgeon J. Bakowski, from the Amavet Veterinary Clinic in Kraków, for the kind and valuable advice and assistance in the implementation of the research.

Piśmiennictwo

[1] Tęsiorowski M., Zarzycka M.: Podstawowe zasady wydłużania kończyn. Wydawnictwo Kasper, Kraków, 1998.

[2] Ferretti A.: Il metodo di Ilizarov in ortopedia e traumatologia del cane e del gatto, "In Atti del 5th Incentro di Aggiornamento Permanente dei Veterinari per Animali da Compagnia, St. Vincente 27/28 Febbrairo – 1", marzo 1987, 216-219.

[3] Ferretti A.: Ilizarov method in orthopedics and traumatology at the dog and cat. Proceeding of XIII World Congress of the World Small Animal Veterinary Association", Barcelona, October 6-9 1988, 479-484.

[4] Ferretti A., Faranda C., Monalli M.: Il metodo di Ilizarov: Un nuovo trotta mento delle deviazione e della dismetria del radio e ulna. Veterinaria Italiana Journal (1987) 57-60.

[5] Russian Scientific Center of Restorative Traumatology and Orthopaedics; Transosseous osteosynthesis in animal, treatment – www.llizarov in animals – e.htm

[6] Latte Y.: Application de la méthode d'Ilizarov en chirurgie orthopédique vétérinaire. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp. 29 (1994) 545-570. [7] Farese J.P., Lewis D.D., Cross A.R., Collins K.E., Anderson G.M., Halling K.B.: Use of IMEX SK-circular external fixator hybrid constructs for fracture stabilization in dogs and cats. J Am Anim Hosp Assoc 38 (2002) 279-289.

[8] Bilgili H.: Circular External Fixation System of Ilizarov. Veteriner Cerrahi Degrisi 10 (1-2) (2004) 75-89.

[9] Szponder T., Silmanowicz P.: Zastosowanie stabilizatora Ilizarowa u małych zwierząt. Życie Wet. 8 (1998) 307-330.

[10] Szponder T.: Leczenie złamań otwartych kości przedramienia podudzia u małych zwierząt przy użyciu stabilizatora okrężnego Ilizarowa. Magazyn Weterynaryjny 10 (2001) 61.

[11] Zadura P., Krzemiński M.: Zastosowanie metody Ilizarowa w leczeniu złamań kości podudzia powikłanego stawu rzekomego psa. Med. Wet. 54, 3 (1998) 201-209.

[12] Siwecki M., Mazurkiewicz S.: Zastosowanie aparatu Ilizarowa w leczeniu małych zwierząt, mat. Majówki Młodych Biomechaników, Szczyrk 2013, Politechnika Śląska w Gliwicach

References

.

BIODEGRADOWALNE POLIURETANOWE NOŚNIKI CITROPINY - OTRZYMYWANIE, BADANIA FIZYKOCHEMICZNE I BIOLOGICZNE

URSZULA PIOTROWSKA¹, MARCIN SOBCZAK^{2*}, CEZARY DĘBEK³

 ¹ Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
 ² Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny w Radomiu, Katedra Chemii, Zakład Chemii Organicznej, ul. Chrobrego 27, 26-600 Radom
 ³ Instytut Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 55, 87-100 Toruń

* E-MAIL: MARCIN.SOBCZAK@WP.PL

Streszczenie

Poważnym problemem współczesnej medycyny jest rosnąca lekooporność mikroorganizmów. W związku z powyższym, w ostatnich latach technologia polimerowych materiałów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych jest jednym z najszybciej rozwijających się obszarów farmacji i inżynierii biomedycznej. Biomateriały te są stosowane w wielu aplikacjach, szczególnie w urządzeniach medycznych oraz technologii systemów dostarczania leków. Peptydy stanowią perspektywiczną grupę związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które mogą być stosowane w technologii wspomnianych materiałów. W niniejszej pracy, otrzymano nowe porowate poliuretanowe nośniki citropiny (CT). Nietoksyczne biodegradowalne poliuretany (PU) zsyntetyzowano przy użyciu dioli poli(ɛ-kaprolaktonu), polilaktydu i poli(adypinianu etylenu) oraz 1,6-diizocyjanianu heksametylenu i butano-1,4-diolu. Otrzymane PU zostały scharakteryzowane za pomocą technik ¹H i 13C NMR. Wyznaczono masę cząsteczkową i właściwości mechaniczne zsyntetyzowanych biomateriałów. Przeprowadzono badania uwalniania CT z porowatych PU w warunkach in vitro. Stwierdzono, że wszystkie otrzymane matryce PU są nietoksyczne w stosunku do bakterii luminescencyjnych V. fischeri oraz pierwotniaków S. ambiguum i T. termophila. Procent uwolnionej CT z uzyskanych porowatych PU, w ciągu 8 tygodni procesu biodegradacji, wynosił od 29% do 79%. Ponadto, wykazano dobrą korelację pomiędzy kinetyką uwalniania CT z matryc a ubytkiem masy porowatych PU. Podsumowując, można stwierdzić, że szybkość uwalniania CT z porowatych materiałów zależy głównie od rodzaju poliolu użytego w syntezie PU. Uzyskane wstępne wyniki badań sugerują, że otrzymane układy stanowią nowe, obiecujące biomateriały jako potencjalne systemy kontrolowanego uwalniania substancji przeciwdrobnoustrojowych.

Słowa kluczowe: poliuretany biodegradowalne, citropina, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, polimery przeciwbakteryjne, kontrolowane uwalnianie substancji przeciwbakteryjnych

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 29-35]

.

BIODEGRADABLE POLYURETHANE CARRIERS OF CITROPIN - PREPARATION, PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION

URSZULA PIOTROWSKA¹, MARCIN SOBCZAK^{2*}, CEZARY DĘBEK³

 ¹ MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY, DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY, UL. BANACHA 1, 02-097 WARSAW, POLAND
 ² KAZIMIERZ PULASKI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY AND HUMANITIES IN RADOM, CHAIR OF CHEMISTRY, DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY, UL. CHROBREGO 27, 26-600 RADOM, POLAND
 ³ INSTITUTE FOR ENGINEERING OF POLYMER MATERIALS AND DYES, UL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUŃ, POLAND
 * E-MAIL: MARCIN.SOBCZAK@WP.PL

Abstract

Particularly problematic of the present medicine are more and more growing drug-resistant microorganisms. Therefore, in the recent years technology of polymeric materials with antimicrobial activity represents one of the most rapidly advancing areas in pharmacy and biomedical engineering. These biomaterials are used in many fields, particularly in medical devices and technology of drug delivery systems. One of the perspective group of antimicrobial substances, which could be used in technology of these materials, are peptides. New porous polyurethane carriers of citropin (CT) were obtained. Non-toxic biodegradable polyurethane (PU) were synthesized from poly(*ɛ*-caprolactone), polylactide or poly(ethylene adipate) diols, 1,6-hexamethylene diisocyanate and butanediol. The obtained PU was characterized by ¹H and ¹³C NMR techniques. The molecular weight and mechanical properties of the obtained biomaterials were reported. The controlled release of CT from porous PU was studied in vitro. It was found that all prepared PU matrices are non toxic to the luminescent bacteria V. fischeri and two ciliated protozoa S. ambiguum and T. termophila. The percentage of CT released from prepared porous PU was 29% to 79% after 8 weeks. Moreover, the results directly comparing CT release with mass loss of obtained porous PU studies follow the same trend. Summing up, the release rates of the CT from porous materials were shown to be directly dependent on the nature of polyol used in the synthesis of PU. The preliminary results suggest that these novel biomaterials are promising for application as antimicrobial substance delivery systems.

Keywords: biodegradable polyurethanes, citropin, peptides with antimicrobial activity, antibacterial polymers, antibacterial substances controlled release

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 29-35]

30 Wprowadzenie

Materiały poliuretanowe (PU) wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową znajdują szerokie zastosowanie w aplikacjach biomedycznych, zwłaszcza w systemach kontrolowanego uwalniania substancji leczniczych, produktach ochrony zdrowia, higieny lub technologiach urządzeń medycznych [1-5]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania peptydami o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (AMP) [1]. Technologie wykorzystujące materiały polimerowe jako nośniki AMP, są jednymi z najszybciej rozwijających się gałęzi farmacji stosowanej i medycyny.

Biodegradowalne poliuretany stanowią interesujące biomateriały, co jest związane z ich właściwościami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi. PU są stosowane w inżynierii tkankowej tkanek miękkich i systemach kontrolowanego uwalniania substancji leczniczych [6-8]. PU zawierają w swojej strukturze segmenty giętkie (np. jednostki poliestrowe lub poliwęglanowe) oraz segmenty sztywne (jednostki uretanowe i fragmenty tzw. przedłużacza łańcucha). Jako składniki diizocyjanianowe stosowane są 1,4-diizocyjanian tetrametylenu, 1,6-diizocyjanian heksametylenu, diizocyjanian izoforonu, diizocyjanian 4,4'-dicykloheksametylenu i diizocyjanian L-lizyny [6]. Diole poliestrowe i poliwęglanowe są zazwyczaj syntetyzowane w reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia prowadzonej w obecności katalizatorów kationowych, anionowych, koordynacyjnych oraz enzymatycznych. Alternatywnie, PU mogą być otrzymywane metodą bezizocyjanianową, polegającą na reakcji pięcioczłonowych cyklicznych węglanów z diaminami [9,10].

Citropina (CT) (sekwencja aminokwasów: Gly-Leu-Phe-Asp-Val-IIe-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Val-IIe-Gly-Gly-Leu-NH₂) jest jednym z najbardziej aktywnych AMP, wykazującym szerokie spektrum działania antybakteryjnego. Naturalna citropina 1.1 jest produkowana zarówno przez gruczoły podbródkowe, jak i grzbietowe zielonej żaby drzewiastej Litoria citropa [11].

W niniejszej pracy opisano metodę otrzymywania porowatych biodegradowalnych poliuretanów jako nośników CT. Mamy nadzieję, że otrzymane materiały znajdą zastosowanie w systemach kontrolowanego uwalniania AMP.

Materiały i metody

Materiały

3,6-Dimetylo-1,4-dioksan-2,5-dion (98%, rac-laktyd, rac-LA, Aldrich Polska) krystalizowano z mieszaniny suchego toluenu z heksanem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. ε-Kaprolakton (99%, 2-oksepanon, CL, Aldrich Polska) i toluen (POCh Polska) przed użyciem suszono i destylowano znad CaH₂ pod zmniejszonym ciśnieniem. 2-etyloheksanian cyny (II) (95%, oktanian cyny, SnOct₂, Aldrich Polska), dichlorometan (CH2CI2, POCh Polska), metanol bezwodny (POCh Polska), 1,6-diizocyjanian heksametylenu (98%, HDI, Aldrich Polska), poli(adypinian etyleno)diol (PEAD diol, M_n = 1000 Da, Aldrich Polska), butano-1,4-diol (98%, BD, Fluka Polska), 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (99%, DABCO, Aldrich Polska), etanol (POCh Polska), izopropanol (POCh Polska), dimetylosulfotlenek (99%, DMSO, Aldrich Polska) użyto bez oczyszczania. Citropinę (CT) zsyntetyzowano (w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym) metodą Fmoc (9-fluorenylometoksykarbonyl) w reaktorze mikrofalowym na nośniku polistyrenowym (żywica polistyrenowa modyfikowana linkerem Rink-amidowym) [12].

Introduction

Polyurethane (PU) materials with antimicrobial activity are used in many biomedical fields, particularly in drug delivery systems, health care products, hygienic applications or medical device technology [1-5]. The last years have seen growing interest in the investigation of peptides with antimicrobial activity (AMP) [1]. Technology of polymeric materials as AMP carriers represents one of the most rapidly advancing areas in pharmacy or medicine.

Biodegradable polyurethanes are very interesting biomaterials which characterize physical, chemical and biological properties. PU has been used e.g. in soft tissue engineering and controlled drug delivery systems [6-8]. PU consists of soft segments (e.g. polyester, polycarbonate units) and hard segments (urethanes and chain extender units). As diisocyanate components are used 1,4-butane diisocyanate, 1,6-hexamethylene diisocyanate, isophorone diisocyanate, 4,4'-dicyklohexamethylene diisocyanate and L-Lysine ethyl ester diisocyanate [6]. Moreover, the polyester or polycarbonate diols are usually prepared by ring-opening polymerization in the presence of cationic, anionic, enzymes or coordination catalysts. Alternatively, PU can be prepared by non-isocyanate methods, if five-membered cyclic carbonate groups are reacted with diamines [9,10].

Citropin (CT) (amino acid sequence: Gly-Leu-Phe-Asp-Val-IIe-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Val-IIe-Gly-Gly-Leu-NH₂) is one of the most active AMP, which shows significant broad-spectrum antibacterial activity. Natural citropin 1.1 is produced by both the dorsal and submental glands of the green tree frog Litoria citropa [11].

In this paper, we describe the synthesis of a series of porous biodegradable polyurethanes as CT carriers. We believe that the obtained biomaterials can find practical applications as effective AMP delivery systems.

Materials and Methods

Materials

3.6-Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (rac-lactide, rac-LA, Aldrich 98%) was crystallized from a mixture of dry toluene with hexane and dried under vacuum. ε-Caprolactone (2-oxepanone, 99%, CL, Aldrich Poland) and toluene (POCh Poland) were dried and distilled over CaH₂ at reduced pressure before use. Stannous octoate (tin (II) 2-ethylhexanoate, SnOct₂, Aldrich 95%), dichloromethane (CH₂Cl₂, POCh Poland), anhydrous methanol (POCh Poland), 1,6hexamethylene diisocyanate (HDI, 98%, Aldrich Poland), poly(ethylene adipate) diol (PEAD diol, M_a = 1000 Da, Aldrich Poland), 1,4-butanediol (BD, 98%, Fluka Poland), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, 99%, Aldrich Poland), ethanol (POCh Poland), isopropanol (POCh Poland), dimethyl sulfoxide (DMSO, 99%, Aldrich Poland) were used without further purification. Citropin (CT) was synthesized (in Medical University of Gdansk) in a microwave reactor using the Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) chemistry on polystyrene resin modified by Rink Amide linker [12].

Synthesis and characterization of polyols

Polyols (PLA, PCL) were synthesized by ring opening polymerization of CL or rac-LA in the presence of SnOct₂ as an initiator and BD as a co-initiator. Monomers (CL, rac-LA, 100 mmol), SnOct₂ and BD were placed in a 20 mL glass ampoules under argon atmosphere. The reaction vessel was then kept standing in a thermostated oil bath at 140°C for 24 h. When the reaction time was completed, the reaction product was dissolved in CH2Cl2, then precipitated from cold methanol using diluted hydrochloric acid (5% aqueous solution) and finally dried under vacuum for one week.

Synteza i charakterystyka polioli

Poliole (PLA, PCL) syntetyzowano metodą polimeryzacji z otwarciem pierścienia CL lub *rac*-LA w obecności SnOct₂ jako inicjatora i BD jako koinicjatora. Monomery (CL, *rac*-LA, 100 mmol), SnOct₂ i BD umieszczano w szklanych ampułkach o pojemności 20 mL w atmosferze argonu. Następnie ampułki termostatowano w łaźni olejowej w temp. 140°C przez 24 godz. Po zakończeniu reakcji, polimer rozpuszczano w CH₂Cl₂, a następnie wytrącano z zimnego metanolu z dodatkiem rozcieńczonego kwasu solnego (5% roztwór wodny). Finalny produkt suszono przez około tydzień w temp. pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Analiza NMR PCL

¹H NMR (CDCl₃, δ, ppm): 4.03 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-], 3.70 [2H, t, -CH₂OH, grupa końcowa], 2.27 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 1.61 [4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 1.36 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-]; ¹³C NMR (CDCl₃, δ, ppm): 173.3 [-C(O)O-], 63.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-], 33.8 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 28.1 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 25.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 24.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-].

Analiza NMR PLA

¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 5.17 [1H, q, -OC**H**(CH₃)C(O)O-], 4.39 [1H, q, -C**H**(CH₃)OH, grupa końcowa], 1.50 [3H, q, -CH(CH₃)C(O)O-]; ¹³C-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 169.6 [-**C**(O)O-], 69.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 67.1 [-C**H**(CH₃)OH, grupa końcowa], 20.9 [-CH(CH₃)C(O)OH], 17.1 [-OCH(CH₃)C(O)O-].

Synteza i charakterystyka poliuretanów

Poliuretany syntetyzowano metodą dwuetapową. Przed reakcją wszystkie reagenty (HDI, poliole, BD) suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 2 godz. w temp. 60°C. W pierwszym etapie, otrzymane poliole (PLA, PCL), HDI, DABCO i bezwodny toluen wprowadzano do trójszyjnej kolby okrągłodennej (o pojemności 150 ml) z mieszadłem magnetycznym. Prepolimer otrzymywano w temp. 80°C przez 4 godz. Następnie, BD w roztworze izopropanolu dodawano powoli do układu reakcyjnego w temp. 40°C przez 3 godz. Poliuretan oczyszczano przez wytrącanie prowadzone przy użyciu mieszaniny toluen/etanol i suszono do stałej masy pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej.

Analiza NMR PU

¹H NMR (DMSO-d₆, δ, ppm): 6.86 [1H, s, -OC(O)NH-], 5.15 (1H, q, -OCH(CH₃)C(O)O-), 4.32 [4H, t, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH-], 3.90 [2H, t, -NHC(O)OCH₂-], 3.75-3.65 [4H, m, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH- i 4H, t, -C(O)OCH₂CH₂O-], 3.15 [2H, t, -CH₂NHC(O)O-], 2.30-2.25 [2H, t, CH₂CH₂COO-], 1.60-1.50 [2H, m, -CH₂CH₂NHC(O)Oi 4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO- i 3H, q, -CH(CH₃)C(O)O-], 1.40-1.30 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂NHC(O)Oi 2H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-]; ¹³C NMR (DMSO-d₆, δ, ppm): 173.2 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)O-], 169.5 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 156.0-156.5 [-NHC(O)O-], 63.4 [-OC(O)CH₂-], 68.8 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 33.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 29.3 [-CH₂NHC(O)O-], 28.6 [-NHC(O)NHCH2-], 24.9-25.9 [-CH2-], 20.8 [-CH(CH₃)C(O)OH], 17.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-];

¹H NMR (CDCl₃, δ, ppm): 4.03 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-], 3.70 [2H, t, -CH₂OH, end group], 2.27 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CQO-], 1.61 [4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CCO-], 1.36 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CCO-]; ¹³C NMR (CDCl₃, δ, ppm): 173.3 [-C(O)O-], 63.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-], 33.8 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CCO-], 28.1 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO-], 25.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO-], 24.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO-];

NMR data of PLA ¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 5.17 [1H, q, -OC**H**(CH₃)C(O)O-], 4.39 [1H, q, -C**H**(CH₃)OH, end group], 1.50 [3H, q, -CH(C**H**₃)C(O)O-]; ¹³C-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 169.6 [-**C**(O)O-], 69.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 67.1 [-C**H**(CH₃)OH, end group], 20.9 [-CH(**C**H₃)C(O)OH], 17.1 [-OCH(**C**H₃)C(O)O-];

Synthesis and characterization of polyurethanes

PU was synthesized by two-step method. Before reaction all reactants (HDI, polyols, BD) were dried in vacuum for 2 h at 60°C. First, the obtained polyols (PLA, PCL), HDI, DABCO and anhydrous toluene were added into a 150 ml three-neck round-bottomed flask with magnetic stirrer. The prepolymer was obtained at 80°C for 4 h. Next, BD dissolved in isopropanol, was added into reaction system slowly for chain extension at 40°C for 3 h. The PU was purified through co-precipitation of toluene/ethanol and vacuum dried to constant weight at room temperature.

NMR data of PU

NMR data of PCL

¹H NMR (DMSO-d₆, δ, ppm): 6.86 [1H, s, -OC(O)NH-], 5.15 (1H, q, -OCH(CH₃)C(O)O-), 4.32 [4H, t, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH-], 3.90 [2H, t, -NHC(O)OCH2-], 3.75-3.65 [4H, m, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH- and 4H, t, -C(O)OCH₂CH₂O-], 3.15 [2H, t, -CH₂NHC(O)O-], 2.30-2.25 [2H, t, CH₂CH₂COO-], 1.60-1.50 [2H, m, -CH₂CH₂NHC(O)Oand 4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO- and 3H, q, -CH(CH₃)C(O)O-], 1.40-1.30 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂NHC(O)Oand 2H, m, -CH2CH2CH2CH2CH2COO-]; ¹³C NMR (DMSO-d₆, δ, ppm): 173.2 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)O-], 169.5 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 156.0-156.5 [-NHC(O)O-], 63.4 [-OC(O)CH₂-], 68.8 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 33.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 29.3 [-CH₂NHC(O)O-], 28.6 [-NHC(O)NHCH₂-], 24.9-25.9 [-CH₂-], 20.8 [-CH(CH₃)C(O)OH], 17.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-];

Preparation of polyurethane carriers of citropin

PU was first dissolved in DMSO at a concentration of 20% (w/v). Next, the PU solution was mixed with NaCl (0.2 g of NaCl crystals per 1 g of PU). The PU/salt mixture was poured into mould. Next, the material was dried under vacuum at 50°C for 48 h. The samples were washed for 24 h in distilled water to remove the salt crystals. Next, PU samples were later dried in a vacuum for at room temperature for about two week.

CT was incorporated into the PU by immersing the material into CH_2Cl_2 solution of peptide (of known concentration). The solution was pulled into the pores of the PU by repeated 5 cycles of vacuum/argon. PU was dried under vacuum at room temperature until the weight of impregnated materials remained unchanged.

Otrzymywanie poliuretanowych nośników citropiny

Poliuretan początkowo rozpuszczano w DMSO (stężenie ok. 20% wag./obj.). Uzyskany roztwór mieszano z NaCl (0,2 g soli na 1 g PU). Mieszaninę PU/sól przenoszono do formy. Następnie, materiał suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 50°C przez 48 godz. Próbki przemywano wodą destylowaną przez 24 godz. w celu usunięcia soli. Następnie, PU suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej przez około 2 tygodnie.

CT wprowadzano do matrycy PU poprzez zanurzenie materiału w roztworze CH₂Cl₂ zawierającym peptyd (o znanym stężeniu). Następnie, wykonano 5 kolejnych cykli - próżnia/argon. Nośnik PU suszono do stałej masy pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej.

Uwalnianie citropiny z nośników poliuretanowych w warunkach in vitro

Poliuretanowe nośniki CT zostały poddane inkubacji w roztworze PBS (pH 7,4, w stosunku 25 mg polimeru: 1 ml buforu), w temp. 37°C. Zawartość kolby poddawano ciągłemu mieszaniu, a następnie próbki pobierano w odpowiednich sekwencjach czasowych, stosując metodę całkowitej wymiany buforu. Ilość uwolnionej CT wyznaczano w oparciu o krzywą wzorcową sporządzoną na podstawie pomiarów wykonanych metodą spektrofotometrii UV-VIS (λ_{max} = 266 nm). Próbki PU (próbki kontrolne), poddano procesowi biodegradacji w warunkach analogicznych, jakie zastosowano w przypadku poliuretanowych nośników CT. Stopień degradacji PU został oceniony na podstawie zmian wartości lepkościowo średniej masy cząsteczkowej (M_{v}) i ubytku masy próbki (WL).

Metody badań

Widma ¹H i ¹³C NMR polioli i PU zostały wykonywane przy użyciu spektrometru Varian 300 MHz stosując CDCl₃ lub DMSO-d₆ jako rozpuszczalnik.

Średnią masę cząsteczkową i rozkład masy cząsteczkowej polioli oznaczano wykorzystując chromatograf żelowy (GPC Max + TDA 305Viscotek), wyposażony w kolumny Jordi DVB Mixed Bed (jedna osłona) w temp. 30°C, w dichlorometanie (HPLC, Sigma Aldrich Polska), przy szybkości przepływu 1 ml/min z detekcją RI i kalibracji opartej na wąskich standardach PS (ReadyCal Set, Fluka). Wyniki opracowano za pomocą oprogramowania OmniSEC (ver. 4.7).

Lepkościowo średnią masę cząsteczkową PU wyznaczano na podstawie równania Marka-Houwinka dla następujących stałych: K = 6,80 x 10⁻⁵ dl/g i α = 0,86. Lepkość PU mierzono w N,N-dimetyloformamidzie (w temp. 30°C) za pomocą wiskozymetru Stabinger Viscometer SVM 3000 [13].

Testy cytotoksyczności PU oraz liczbę hydroksylową polioli przeprowadzono zgodnie z metodykami opisanymi we wcześniejszych doniesieniach [14,15].

Właściwości mechaniczne (wytrzymałość na rozciąganie (*FS*), naprężenie przy wydłużeniu o 100% (S_{100}), wydłużenie przy zerwaniu (E_b) oraz twardość Shore'a A (*ShH*)) mierzono przy użyciu testera Zwick model 1445. *FS*, S_{100} i E_b wyznaczano zgodnie norma PN-ISO 37:2007. *ShH* została zmierzona zgodnie z normą PN-80/C-04238.

Gęstość i porowatość PU oznaczono metodą wypierania cieczy [16].

Ilość uwolnionej CT z nośników PU oznaczano za pomocą spektrofotometru UV (Shimadzu UV-1202). Pomiar absorbancji powtarzano trzykrotnie przy długości fali 266 nm. Stężenie CT obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Wartość WL obliczano według równania:

 $WL = [(W - W_1)/W] \times 100 (\%),$

gdzie: W - masa pierwotnej próbki polimeru (przed degradacją), W_{τ} - masa próbki polimeru po degradacji.

In vitro citropin release from polyurethane carriers

The CT-loaded PU was incubated in a PBS (pH 7.4) in the ratio of 25 mg of polymer: 1 ml of buffer at 37°C. The mixture was stirred under constant agitation and a sample was removed at selected intervals followed by fresh buffer replacing. The quantity of the released CT was determined (at the λ_{max} value of 266 nm) from the calibration curve previously obtained under the same conditions and analyzed by means of UV-Vis spectrophotometer. The PU (control samples) were formed and run under the same experimental conditions as reported in the CT release the from CT-loaded PU analysis. The degree of the PU degradation was evaluated by change of viscosity average molecular weight (M_v) and their weight loss (*WL*).

Measurements

 ^1H and ^{13}C NMR spectra of polyols and PU were obtained on Varian 300 MHz spectrometer using CDCl_3 or DMSO-d_6 as solvent.

The molar mass and molar mass distributions of the polyols were determined using GPC instrument (GPC Max + TDA 305, Viscotek), equipped with Jordi DVB Mixed Bed columns (one guard and two analytical) at 30°C in dichloromethane (HPLC grade, Sigma-Aldrich), at flow rate of 1 ml/min with RI detection and calibration based on narrow PS standards (ReadyCal Set, Fluka). Results were processed with OmniSEC software (ver. 4.7).

The viscosity average molecular weight of PU was calculated from the Mark–Houwink equation using the following constants: K = 6.80 x 10⁻⁵ dL/g and α = 0.86. PU viscosity was measured in *N*,*N*-dimethylformamide (at 30°C) on Stabinger Viscometer SVM 3000 [13].

The toxicity tests of PU and the hydroxyl number of polyols were carried out according to the procedures described in our early papers [14,15].

Mechanical properties (tensile strength (*FS*), stress at 100% elongation (S_{100}), elongation at break (E_b) and Shore'a A hardness (*ShH*)) were measured using an Zwick model 1445 tester. *FS*, S_{100} and E_b were determined according to national standard PN-ISO 37:2007. *ShH* was determined according to national standard PN-80/C-04238.

The density and porosity values of the PU were measured by liquid displacement method [16].

The amount of CT released from the PU was analyzed using a UV spectrophotometer (UV-1202 Shimadzu). The absorbance was determined in triplicate at 266 nm. The calibration curves for CT release were created in PBS as a control.

The WL was calculated according to the equation:

 $WL = [(W - W_1)/W] \times 100 (\%),$

where: W - the weight of dry polymer sample before degradation, $W_{\rm 1}$ – the weight of dry polymer sample after degradation.

Results and Discussions

In the first step, PCL and PLA diols were obtained by the ring-opening polymerization of corresponding cyclic esters in the presence of SnOct₂ as an initiator and BD as a co-initiator. The molar ratio of CL(or rac-LA) /BD/SnOct₂ was 50 : 2 : 1 (PCL-1, PLA-1) and 100 : 2 : 1 (PCL-2, PLA-2). The structure of the obtained products was characterized by ¹H-NMR or ¹³C-NMR spectroscopy (experimental section). The molecular weight (M_n) values of polyols determined by the GPC method were 2400 g/mol for PCL-1, 2300 g/mol for PLA-1, 4600 g/mol for PCL-2 and 4300 g/mol for PLA-2, respectively. Moreover, the M_n values calculated from hydroxyl number were 2600 g/mol for PCL-1, 2400 g/mol for PLA-1, 4200 g/mol for PCL-2 and 3900 g/mol for PLA-2.

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie, otrzymywano diole PCL i PLA w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia odpowiednich cyklicznych estrów. Proces prowadzono w obecności SnOct₂ jako inicjatora oraz BD jako koinicjatora reakcji. Stosunek molowy CL(lub rac-LA)/BD/SnOct₂ wynosił 50:2:1 (PCL-1, PLA-1) oraz 100:2:1 (PCL-2, PLA-2). Struktura otrzymanych produktów polireakcji została potwierdzona za pomocą spektroskopii ¹H i ¹³C NMR (cześć eksperymentalna). Liczbowo średnia masa cząsteczkowa (M_n) polioli wyznaczona za pomocą techniki GPC wynosiła odpowiednio 2400 g/mol dla PCL-1, 2300 g/mol dla PLA-1, 4600 g/mol dla PCL-2 i 4300 g/mol dla PLA-2. Z kolei, wartość M_n obliczona na podstawie oznaczonej liczby hydroksylowej wynosiła 2600 g/mol dla PCL-1, 2400 g/mol dla PLA-1, 4200 g/mol dla PCL-2 i 3900 g/mol dla PLA-2.

W kolejnym etapie, zsyntetyzowano serie PU stosując diole PCL, PLA oraz komercyjny PEAD jako składniki segmentów giętkich oraz HDI i BD jako składniki segmentów sztywnych. Jako katalizator poliaddycji zastosowano DAB-CO (TABELA 1). PU otrzymywano metodą dwuetapową w toluenie jako medium reakcyjnym. Stosunek HDI:BD:PCL (lub) PLA:PEAD był stały i wynosił 2,5:1,3:0,6:0,6, co odpowiada tzw. indeksowi izocyjanianowemu na poziomie 1,05.

Otrzymano PU-1, PU-2, PU-3, PU-4 o wartości M_v odpowiednio około 74 000, 79 000, 64 000 i 71 000 g/mol (TABELA 1). Przeprowadzono badania wytrzymałości na rozciąganie (FS), naprężenia przy wydłużeniu o 100% (S₁₀₀), wydłużenia przy zerwaniu (E_b) oraz twardości Shore'a A (ShH) zsyntetyzowanych PU. Otrzymane PU charakteryzowały się FS w zakresie 11,2-14,1 MPa i ShH w zakresie 32-37°ShA. PU-1 i PU-2 cechowały się wydłużeniem przekraczającym 360 %, podczas gdy PU-3 i PU-4 wykazywały wydłużenie poniżej 310%. Podobnie, FS PU zbudowanych z jednostek PCL-1 lub PCL-2 była większa niż w przypadku PU otrzymanych z dioli PLA-1 i PLA-2.

Porowate biodegradowalne poliuretany (Bio-PU) (Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3, Bio-PU-4) zostały otrzymane w procesie mieszania odpowiednich PU i NaCl (0,2 g soli na 1 g PU). Gęstość Bio-PU wynosiła odpowiednio 0,211 (Bio-PU-1), 0,221 (Bio-PU-2), 0,193 (Bio-PU-3) i 0,201 (Bio-PU-4) g/cm³. Z kolei, porowatość Bio-PU była zbliżo-na i wynosiła 61, 64, 58, 59% odpowiednio dla Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3 i Bio-PU-4. Poliuretanowe nośniki CT zostały otrzymane przez zanurzanie materiału w roztworze CH_2CI_2 zawierającym peptyd o znanym stężeniu (zawartość peptydu w każdym Bio-PU wynosiła ok. 1% wag.).

TABELA 1. Charakterystyka zsyntetyzowanych poliuretanów.

TABLE 1. Characterization of synthesized poly-
urethanes.

In the second step, PU was synthesized using PCL, PLA and PEAD diols as a soft segment, and HDI and BD as components of the hard segment. DABCO was used as the polyaddition catalysts (TABLE 1). A two-step polymerization procedure was employed to this process (in toluene as medium). The HDI:BD:PCL (or) PLA:PEAD molar ratio was always 2.5:1.3:0.6:0.6, which corresponds to the so called isocyanate index equal 1.05.

As shown in TABLE 1, the PU were obtained with the M_{ν} of about 74 000, 79 000, 64 000 and 71 000 g/mol for PU-1, PU-2, PU-3 and PU-4, respectively. Tensile strength (FS), stress at 100% elongation (S₁₀₀), Shore hardness (ShH) and stress at 100% elongation at break (E_b) of obtained PU were determined. The obtained PU showed FS in the range of 11.2-14.1 MPa and ShH in the range of 32-37 Shore'a degrees. It was found that PU-1 and PU-2 have better elongations with more than 360% while PU-3 and PU-4 showed an elongation of below 310%. Similarly, FS for PU-based PCL-1 or PCL-2 units are higher values than for PU-based PLA-1 or PLA-2 units.

Porous biodegradable polyurethanes (Bio-PU) (Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3, Bio-PU-4) were created by mixing the mixture of PU and NaCl (0.2 g of NaCl crystals per 1 g of PU). The density values of Bio-PU were 0.211 (Bio-PU-1), 0.221 (Bio-PU-2), 0.193 (Bio-PU-3) and 0.201 (Bio-PU-4) g/cm³. In parallel, porosity of Bio-PU was 61, 64, 58 and 59% for Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3 and Bio-PU-4, respectively. CT was incorporated into the PU by immersing the material into CH_2Cl_2 solution of peptide of known concentration (the contain peptide in Bio-PU was about 1% wt/wt).

The cytotoxic tests of obtained Bio-PU were carried out. Luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoa *S. ambiguum* and *T. termophila* [14] were used as biosensors. It was found that obtained Bio-PU are non toxic to all test bionts, both bacteria and protozoa. It was found that all prepared biomaterials are non-toxic (TABLE 2).

CT was immobilized via incorporation into porus PU matrices. CT content in the PU carriers was about 3 wt%. In vitro CT release from the Bio-PU was carried out in PBS buffer at 37°C for 8 weeks. The kinetic rates of CT released from biomaterials were shown in FIG. 1. It has been found that namely the kind of polyol and M_n of polyol used in PU synthesis influence the release of CT from the obtained materials. The percentage of CT released after 8 weeks of incubation was about 29% for the Bio-PU-1 and 38% for the Bio-PU-2. For comparison, the percentage of CT released after 8 weeks of incubation was about 58% for the Bio-PU-3 and 79% for the Bio-PU-4. Near zero-order release of CT from the obtained matrices was observed. This is very interesting result, because zero order or constant rate release of active substance is desirable in order to minimize swings in released peptide concentration. Peptide release is probably result of a combination of erosion and diffusion mechanisms.

| Nr No. | Poliuretan Polyurethane | Reagenty Reagents | M _v [g/mol] | FS [MPa] | S ₁₀₀ [MPa] | Е _ь [%] | ShH [Shore A] |
|-----------|----------------------------|----------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|------------------|
| 1. | PU-1 | HDI/PEAD/PCL-1/BD | 73 900 | 13.8±0.7 | 5.3±0.3 | 368±16 | 35±3 |
| 2. | PU-2 | HDI/PEAD/PCL-2/BD | 79 600 | 14.1±0.9 | 5.7±0.3 | 392±18 | 37±3 |
| 3. | PU-3 | HDI/PEAD/PLA-1/BD | 64 100 | 11.2±0.6 | 4.1±0.2 | 291±13 | 32±2 |
| 4. | PU-4 | HDI/PEAD/PLA-2/BD | 71 400 | 11.9±0.8 | 4.6±0.3 | 308±11 | 34±2 |

PCL-1 (M_n = 2600 g/mol), PCL-2 (M_n = 4200 g/mol), PLA-1 (M_n = 2400 g/mol), PLA-2 (M_n = 3900 g/mol); M_n - obliczona na podstawie liczby hydroksylowej; M_v - obliczona na podstawie równania Marka-Houwinka dla następujących stałych: K = 6.80 x 10⁻⁵ dL/g i α = 0.86; FS - wytrzymałość; S₁₀₀ - wytrzymałość przy wydłużeniu o 100%; E_b - wydłużenie przy zerwaniu; ShH - twardość Shore'a.

 M_n - calculated from hydroxyl number; M_v - calculated from the Mark-Houwink equation using the following constants: K = 6.80 x 10⁻⁵ dL/g and α = 0.86; FS - tensile strenght; S_{100} - stress at 100% elongation; E_b - elongation at break; ShH - Shore A hardness; TABLE 2. Cytotoxicity of the obtained polyurethanes.

| | Spir (24 | otox h) | Microtox (15 min) | | Protoxkit F (24 h) | | |
|---|-------------|------------|----------------------|----|-----------------------|----|--|
| Stężenie Concentration (mg ml ⁻¹) | 0.5 | 1 | 0.5 | 1 | 0.5 | 1 | |
| Bio-PU-1 | NT | NT | 5 | 11 | NT | NT | |
| Bio-PU-2 | NT | NT | 3 | 7 | NT | NT | |
| Bio-PU-3 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | |
| Bio-PU-4 | NT | NT | 11 | 17 | NT | NT | |
| Próbka jest nietoksyczna, jeżeli procent efektu toksycznego jest wyższy niż 20, NT – nie toksyczna; The sample is toxic when the percent of a toxicity effect is higher than 20; NT - not toxic; | | | | | | | |

Dokonano oceny cytotoksyczności otrzymanych Bio-PU. Jako biosensory zastosowano bakterie luminescencyjne *V. fischeri* oraz dwa pierwotniaki z grupy orzęsków *S. ambiguum* i *T. termophila* [14]. Okazało się, że wszystkie badane biomateriały są nietoksyczne (TABELA 2).

Jak już wspomniano, CT została zainkorporowana w porach otrzymanych matryc PU. Zawartość CT w nośnikach PU wynosiła około 3% wagowych. W dalszej części pracy, przeprowadzono testy uwalniania CT z otrzymanych Bio-PU w warunkach in vitro, w buforze PBS, w temp. 37°C, w czasie 8 tygodni. Na RYS. 1 przedstawiono profile uwalniania CT z badanych biomateriałów. Stwierdzono, że rodzaj i wartość M_n zastosowanego w syntezie PU poliolu ma wpływ na uwalnianie CT z otrzymanych nośników. Ilość uwolnionej CT, po 8 tygodniach inkubacji, wynosiła około 29% dla Bio-PU-1 oraz 38% dla Bio-PU-2. Dla porównania, po 8 tygodniach inkubacji, ilość uwolnionej CT wynosiła około 58% dla Bio-PU-3 oraz 79% dla Bio-PU-4. Zaobserwowano, że CT uwalnia się z otrzymanych matryc według kinetyki zbliżonej do kinetyki zerowego-rzedu. Jest to bardzo interesujący wynik, biorac pod uwagę fakt, że stałe uwalnianie substancji aktywnej jest korzystne z farmakologicznego punktu widzenia i zmniejsza zjawisko wahań stężenia uwolnionego peptydu. Uwalnianie peptydu odbywa się prawdopodobnie według mechanizmu mieszanego (erozji i dyfuzji). Szczegółowa dyskusja na temat modelu kinetycznego uwalniania peptydu będzie możliwa po zakończeniu wszystkich prowadzonych przez nas badań. Jak powszechnie wiadomo, proces degradacji zależy również od porowatości matryc i procentowego udziału porów otwartych. Ich struktura i rozkład mogą także mieć istotny wpływ na dyfuzję uwalnianego peptydu.

Stopień degradacji nośników CT (w warunkach in vitro) był oceniany poprzez zmiany M_v PU i ubytek masy (WL) Bio-PU (RYS. 2 i 3). Testy degradacji PU i Bio-PU oraz badania kinetyki uwalniania CT z poszczególnych nośników prowadzono w tych samych warunkach. Stwierdzono, że spadek wartości M_v dla otrzymanych PU wynosił od 4 do 13% po 8 tygodniach degradacji. Odnotowano, że PU-3 i PU-4 degradują szybciej w porównaniu do PU-1 i PU-2. Spadek wartości M_v wynosił 4% dla PU-1, 7% dla PU-2, 10% dla PU-3 oraz 13% dla PU-4. Ponadto, wartość WL dla Bio-PU-3 i Bio-PU-4 wynosiła odpowiednio 11 i 15% po 8 tygodniach procesu degradacji. Z kolei, dla Bio-PU-1 i Bio-PU-2 wartość WL wynosiła odpowiednio 4 i 7% (po 8 tygodniach procesu degradacji).

Podsumowując, można stwierdzić, że wyniki kinetyki uwalniania CT dobrze korelują ze spadkiem wartości M_v poszczególnych PU oraz ubytkiem masy (WL) odpowiednich Bio-PU.







RYS. 2. Zmiana wartości M_v PU podczas procesu biodegradacji.

FIG. 2. Change of M_v of PU during biodegradation process.



RYS. 3. Ubytek masy Bio-PU podczas procesu biodegradacji. FIG. 3. Mass loss of Bio-PU during biodegradation

process.

However, detailed discussion of CT release model will be able after finished all our studies. As commonly known, the degradation process also depend on the porosity of matrices and on the contribution of the open pores. Pore structure and connectivity may also have a profound effect on release by diffusion.

In vitro degradation of the obtained Bio-PU was controlled by the change of M_v of PU and mass loss (WL) of Bio-PU (FIGs. 2 and 3). The degradation tests of the obtained PU or Bio-PU and the kinetic rates of CT released from carriers were conducted under the same conditions. The decrease of M_v for the obtained PU was about 4-13% after 8 weeks. It was found that PU-3 and PU-4 were degraded faster in comparison to PU-1 and PU-2. The decrease of M_v was 4% for PU-1, 7% for PU-2, 10% for PU-3 and 13% for PU-4. Moreover, the WL values of Bio-PU-3 and Bio-PU-4 were 11 and 15% after 8 weeks of degradation, respectively. However, for Bio-PU-1 and Bio-PU-2 the WL was 4 and 7% (after 8 weeks).

The results directly comparing CT release with change of the M_v of PU or mass loss (*WL*) of Bio-PU studies follow the same trend.

Wnioski

Otrzymano nowe biodegradowalne porowate poliuretanowe nośniki (Bio-PU) citropiny (CT) stosując diole poli(ε-kaprolakton)u, polilaktydu, poli(adypinianu etylenu) oraz 1,6-diizocyjanian heksametylenu i butano-1,4-diol. Stwierdzono, że szybkość uwalniania CT z Bio-PU zależy głównie od rodzaju poliolu zastosowanego w syntezie poliuretanu (PU). Kluczową rolę odgrywa tu prawdopodobnie szybkość degradacji segmentów giętkich PU. Otrzymane Bio-PU stanowią interesujące materiały dla systemów kontrolowanego uwalniania CT.

Podziękowania

Praca powstała w ramach projektu badawczo rozwojowego pt: "Zastosowanie efektywnych biocydów, w tym peptydów przeciwdrobnoustrojowych, jako biobójczych komponentów tworzyw i materiałów powłokowych w celu polepszenia właściwości środków ochrony przed skażeniami" (Nr OR 0000 25 12), finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Składamy serdeczne podziękowania Panu Prof. Wojciechowi Kamyszowi (Gdański Uniwersytet Medyczny) za syntezę citropiny, prof. Grzegorzowi Nałęcz-Jaweckiemu (Warszawski Uniwersytet Medyczny) za testy cytotoksyczności oraz Pani Violettcie Kowalskiej (Warszawski Uniwersytet Medyczny) za pomiary spektroskopowe.

Piśmiennictwo

[1] Sobczak M., Dębek C., Olędzka E., Kozłowski R.: Polymeric Systems of Antimicrobial Peptides-Strategies and Potential Applications. Molecules 18 (2013) 14122-14137.

[2] Chen C.Z., Cooper S.L.: Recent advances in antimicrobial dendrimers. Advanced Materials 12 (2000) 843-846.

[3] Kenawy E.R., Worley S.D., Broughton R.: The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. Biomacromolecules 8 (2007) 1359-1384.

[4] Palermo E.F., Kuroda K.: Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. Applied Microbiology and Biotechnology 87 (2010) 1605-1615.

[5] Munoz-Bonilla A., Fernadez-Garcia M.: Polymeric materials with antimicrobial activity. Progress in Polymer Science 37 (2012) 281-339.

[6] Liu Q., Jiang L., Shi R., Zhang L.: Synthesis, preparation, in vitro degradation, and application of novel degradable bioelastomers - A review. Progress in Polymer Science 37 (2012) 715-765.

[7] Son J.S., Lee S.H., Lee B., Kim H.J., Ko J.H., Park Y.H., Chun H.J., Kim C.H., Kim J.H., Kim M.S.: Polyurethanes for biomedical application. Tissue Engineering & Regenerative Medicine 6 (2009) 427-431.

[8] Santerre J.P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R.S.: Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. Biomaterials 26 (2005) 7457-7470.

[9] Labet M., Thielemans W.: Synthesis of polycaprolactone: A review. Chemical Society Reviews 38 (2009) 3484-3504.

Conclusions

New biodegradable porous polyurethane carriers (Bio-PU) of citropin (CT) were successfully prepared with poly(ϵ -caprolactone), polylactide or poly(ethylene adipate) diols, 1,6-hexamethylene diisocyanate and butanediol. The release rates of the CT from Bio-PU were shown to be directly dependent on the nature of polyol used in the synthesis of polyurethane (PU). Degradation rate of soft segment PU may play a main role. The obtained Bio-PU are interesting materials for the controlled release of CT.

Acknowledgments

Funding: This work was funded by the Ministry of Science and Higher Education in Poland (Project number OR 0000 25 12 "Application of effective biocides including antimicrobial peptides, an antimicrobial components at polymers and coating materials for improving them against contamination").

We would like to thank Prof. Wojciech Kamysz (from Medical University of Gdansk) for synthesis of citropin, Prof. Grzegorz Nałęcz-Jawecki (from Medical University of Warsaw) for cytotoxic measurements and Violetta Kowalska (from Medical University of Warsaw) for the spectroscopy measurements.

References

[10] Albertsson A.C., Varma I.K.: Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. Biomacromolecules 4 (2003) 1466-1486.

[11] Sikorska E., Greber K., Rodziewicz-Motowidło S., Szulika L., Łukasiak J., Kamysz W.: Synthesis and antimicrobial activity of truncated fragments and analogs of citropin 1.1: The solution structure of the SDS micelle-bound citropin-like peptides. Journal of Structural Biology 168(2) (2009) 250-258.

[12] Fields G.B., Noble R.L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 35 (1990) 161-214.

[13] Gorna K., Gogolewski S.: In vitro degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on E-caprolactone and Pluronics1 with various hydrophilicities. Polymer Degradation and Stability 75 (2002) 113-122.

[14] Sobczak M., Nałęcz-Jawecki G., Kołodziejski W.L., Gos P., Żółtowska K.: Synthesis and study of controlled release of ofloxacin from polyester conjugates. International Journal of Pharmaceutics 402 (2010) 37-43.

[15] Kuran W., Sobczak M., Listoś T., Debek C., Florjanczyk Z.: New route to oligocarbonate diols suitable for the synthesis of polyurethane elastomers. Polymer 41 (2000) 8531-8541.

[16] Asefnejad A., Khorasani M.T., Behnamghader A., Farsadzadeh B., Bonakdar S.: Manufacturing of biodegradable polyurethane scaffolds based on polycaprolactone using a phase separation method: physical properties and in vitro assay. Journal of Nanomedicine 6 (2011) 2375-2384.

BADANIA WŁASNOŚCI MECHANICZNYCH WARSTW SiO₂ PRZEZNACZONYCH NA IMPLANTY STOSOWANE W UKŁADZIE KRWIONOŚNYM

WITOLD WALKE*, MARCIN BASIAGA, ZBIGNIEW PASZENDA

Katedra Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych, Wydział Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Śląska, ul. Generała Charlesa de Gaulle'a 72, 41-800 Zabrze * E-Mail: witold.walke@polsl.pl

Streszczenie

Jednym ze sposobów zwiększania hemokompatybilności powierzchni biomateriałów tytanowych jest wykorzystanie metody zol-żel dla wytworzenia cienkich powłok tlenkowych na bazie takich pierwiastków jak: Ti i Si. Takie warstwy są bardziej hemokompatybilne. co znacznie ogranicza ryzyko komplikacji związanej chociażby z procesem wykrzepiania. Oprócz poprawy hemokompatybilności istotnym zagadnieniem związanym z wytwarzaniem warstw jest również odpowiedni zespół własności mechanicznych. Zaletą tej metody jest niska temperatura otrzymywania powłoki, co gwarantuie niezmienność własności mechanicznych podłoża metalowego. Dlatego też w pracy przeprowadzono badania własności mechanicznych warstw krzemionkowych naniesionych na powierzchnię próbek z tytanu Grade4 oraz stopu Ti-6AI-7Nb. Próbki poddano obróbce powierzchniowej obejmującej następujące procesy: polerowanie mechaniczne oraz naniesienie warstwy SiO, metodą zol-żel. Ocenę własności mechanicznych przeprowadzono w oparciu o badania nanotwardości oraz przyczepności warstwy do podłoża. Pomiary nanotwardości przeprowadzono metodą Olivera & Pharra z wykorzystaniem wgłębnika Berkovicha. Z kolei badania przyczepności przeprowadzono metodą zarysowania – scratch test. Do badań wykorzystano platformę otwartą Micro-Combi-Tester firmy CSM Instruments. Przeprowadzone badania wykazały, że warstwa krzemionkowa wytworzona zarówno na powierzchni tytanu Grade4, jak i na stopie Ti-6AI-7Nb posiada identyczne własności mechaniczne. Dodatkowo stwierdzono, że uzyskane wyniki badań adhezji wskazują na małą przyczepność warstwy SiO₂ do podłoża zarówno z tytanu Grade 4 oraz stopu tytanu Ti-6AI-7Nb. W obu przypadkach nie wystąpił sygnał emisji akustycznej, co świadczy o niskiej energii wiązania warstwy z podłożem.

Słowa kluczowe: Ti, Ti-6AI-7Nb, metoda zol-żel, scratch test, nanotwardość

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 36-41]

TESTS OF MECHANICAL PROPERTIES OF SiO₂ LAYERS FOR IMPLANTS USED IN VASCULAR SYSTEM

WITOLD WALKE*, MARCIN BASIAGA, ZBIGNIEW PASZENDA

DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND MEDICAL ENGINEERING DEVICES, FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, UL. GENERAŁA CHARLESA DE GAULLE'A 72, 41-800 ZABRZE, POLAND * E-MAIL: WITOLD.WALKE@POLSL.PL

Abstract

One of the ways how to increase haemocompatibility of the surface of titanium biomaterials is an application of sol-gel method in order to create thin oxide layers on the base of such elements as Ti and Si. Such layers are more haemocompatible, which reduces substantially the risk of complications connected with, for example, coagulation process. Apart from improvement of haemocompatibility, an important issue connected with creation of those layers is also proper selection of their mechanical properties. An advantage of that method is low temperature at which the layer is obtained, what guarantees stability of mechanical properties of metallic substrate. Therefore, this study presents tests of mechanical properties of silicone layers applied on titanium Grade4 and Ti-6AI-7Nb alloy surface. Samples were subjected to surface treatment: mechanical polishing and then SiO₂ layer was applied by means of sol-gel method. Evaluation of mechanical properties was realized by the tests of nano-hardness and adhesion of the layer to the substrate. Nano-hardness tests were made with application of Oliver & Pharr method and Berkovich intending tool while adhesion tests were performed with application of scratch test. For the tests Micro-Combi-Tester Open platform was used. The results showed that silicone layer created both on titanium Grade4 and Ti-6AI-7Nb alloy surface features similar mechanical properties. Obtained results show low adhesion of SiO₂ layer to the substrate made of titanium Grade 4 and titanium alloy Ti-6AI-7Nb. In both cases there was no acoustic emission signal, which proves low bonding energy between the layer and the substrate.

Keywords: Ti, Ti-6AI-7Nb, sol-gel method, scratch test, nano-hardness

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 36-41]

Wprowadzenie

Tytan i jego stopy znalazły zastosowanie jako materiał implantacyjny do kontaktu z krwią. Z tego typu biomateriałów wytwarzane są przede wszystkim pierścienie protez zastawek serca. Implanty stosowane w układzie krwionośnym nie powinny ulegać degradacji, adsorbować składników krwi oraz powinny minimalizować zjawiska odkładania się zakrzepów. Początkowe własności powierzchni są następstwem wyboru biomateriału, z którego wykonany został implant w połączeniu z warunkami jego wytwarzania. Cały problem bezpośredniego kontaktu implantu ze środowiskiem krwi dotyczy jego stanu powierzchni. Coraz więcej uwagi poświęca się więc zmianie powierzchni z "tradycyjnej" metalowej na taką, która będzie bardziej hemokompatybilna i przyjazna dla organizmu, nie powodując przy tym pogorszenia jego cech biomechanicznych. Duża chropowatość powierzchni jest szczególnie atrakcyjna dla makrofagów. Oprócz znanych metod zmniejszenia chropowatości powierzchni (polerowanie chemiczne lub elektrochemiczne), czy zmiany składu chemicznego warstwy wierzchniej poprzez pasywację chemiczną lub anodyzację coraz częściej stosuje się próby nanoszenia rozmaitych powłok. Osłona powierzchni powłokami znacznie ogranicza ryzyko komplikacji związanej chociażby z procesem wykrzepiania, jednakże prowadzi do innych, m.in. niekontrolowanego rozrostu tkanki, która ogranicza z kolei przepływ krwi [1]. Jednym ze sposobów zwiekszania hemkompatybilności powierzchni tytanu i jego stopów jest wykorzystanie metody zol-żel dla wytworzenia cienkich powłok tlenkowych na bazie Si. Zaletą tej metody jest niska temperatura otrzymywania powłoki, co gwarantuje niezmienność własności mechanicznych podłoża metalowego. Ponadto metoda ta zapewnia homogeniczność zolu, możliwość regulacji cząstek polikondensatów, dużą liczbę związków metaloorganicznych i nieorganicznych soli metali służących jako prekursory oraz możliwość otrzymywania powłok wieloskładnikowych o wysokiej czystości na różnych podłożach. Dane literaturowe wskazują jednak na szereg niezdefiniowanych zjawisk towarzyszących wytwarzaniu powłok tlenkowych z udziałem krzemu na powierzchniach biomateriałów metalowych [2-4]. Wciąż nierozwiązanym problemem pozostaje dobór odpowiednich parametrów wytwarzania powłok, jak i kompleksowych badań pokazujących pełną charakterystykę ich zachowania w warunkach implantacji oraz długotrwałego kontaktu ze środowiskiem tkankowym podczas użytkowania implantu. Niewielu badaczy uwzględnia również proces sterylizacji, który jest niezbędnym etapem obróbki wykańczającej w istotny sposób wpływającym na jakość finalną powierzchni implantu. Aktualnie również brak jest doniesień na temat stosowania powłok na bazie krzemu na implantach metalowych stosowanych w chirurgii naczyń krwionośnych. Szczątkowe badania prowadzone w tym zakresie w wiekszości nie obeimuja analizy odkształceń jakie towarzyszą tego typu implantom podczas wszczepiania czy też użytkowania. Autorzy prac, równie często pomijają zagadnienia związane z wpływem parametrów technologicznych metody zol-żel na własności fizykochemiczne i mechaniczne powłok krzemionkowych, ich adhezję czy odkształcalność [5-10]. Dlatego też w pracy podjeto próbe analizy własności mechanicznych warstw SiO₂ naniesionych metodą zol-żel na powierzchnie tytanu Grade4, jak i stopu Ti-6Al-7Nb w określonych warunkach technologicznych.

Introduction

Titanium and its alloys turned out to be useful as a material for implants in contact with blood. This type of biomaterials is most of all used for production of heart valve prosthesis. Implants used in blood and vascular system should not undergo degradation, adsorb blood components and they should minimise the phenomenon of clotting. Initial properties of the surface result from the choice of biomaterial the implant was made of, in connection with conditions of its production. The whole problem of direct contact of the implant with blood environment refers to the condition of the surface. More and more attention is devoted then to the change of the surface from "traditional" metallic one into such that will be more haemocompatible and organism-friendly, without causing at the same time deterioration of its biomechanical properties. High surface roughness is especially attractive for macrophages. Apart from well-known methods of decreasing surface roughness (chemical or electrochemical polishing), or the change of chemical composition of the upper layer through chemical passivation or anodisation, attempts to apply various coatings which are used more and more frequently. Protecting the surface with coatings limits to a great extent the risk of complications connected with, for example, coagulation process, however, it leads to other processes, among other things uncontrolled hyperplasia of tissue that in turn limits blood flow [1]. One of the ways how to increase haemocompatibility of the surface of titanium and its alloys is application of sol-gel method in order to create thin oxide layers based on silicon. An advantage of that method is low temperature at which the layer is obtained, which guarantees stability of mechanical properties of metallic substrate. Moreover, that method ensures homogeneity of sol, possibility of regulation of polycondensate particles, large number of metaloorganic compounds and non-organic metallic salts used as precursors and possibility to obtain multi-component, high-purity layers on various substrates. Literature data show a number of unidentified phenomena, though, that accompany creation of oxide layers with participation of silicone on the surface of metallic biomaterials [2-4]. A still unsolved problem is the selection of proper parameters of layers production process as well as of complex tests presenting full characteristics of their behaviour under conditions of implantation and long-term contact with tissue environment during the time implant is used. Few researchers also take into consideration sterilisation process, which is an indispensable stage of finishing, influencing significantly final quality of the implant surface. Currently, there is also no information about application of layers on the base of silicone on metallic implants used in blood and vascular system surgery. Residual tests performed in this area mostly do not cover the analysis of strain that accompanies that type of implants during implantation or usage. The authors of that research as frequently omit the issue connected with the influence of sol-gel method parameters on physico-chemical and mechanical characteristic of silica layers, their adhesion or formability [5-10]. Therefore, this study is an attempt to analyse mechanical properties of SiO₂ layers applied with sol-gel method on the surface of titanium Grade4, and Ti-6AI-7Nb alloy under specific technological conditions.

BIOMATERIALS

38 Materiały i metody

Materiał do badań stanowił tytan Grade 4 oraz stop tytanu Ti-6AI-7Nb o składzie chemicznym przedstawionym w TABELI 1 oraz własnościach mechanicznych przedstawionych w TABELI 2. Skład chemiczny oraz własności mechaniczne były zgodne z wymaganiami norm [11,12].

Próbki poddano obróbce powierzchniowej (polerowanie mechaniczne, Ra = 0,12 µm), a następnie naniesiono warstwę SiO₂ metodą zol-żel (v = 3,0 cm/min, T = 430°C, t = 60 min). Stosowanym w badaniach prekursorem krzemionki był tetraetoksysilan Si(OC₂H₅)₄ tzw. TEOS, i tetramethoxysilane Si(OCH₃)₄ tzw. TMOS. Pozostałe składniki wyj-

| Rodzaj materiału Type of material | С | N | 0 | Fe | н | Al. | Nb | Та | Ti |
|--------------------------------------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|----------------|
| Tytan / Titanium Grade 4 | 0.05 | 0.03 | 0.4 | 0.4 | 0.005 | - | - | - | reszta rest |
| Stop / Alloy Ti-6Al-7Nb | 0.008 | 0.03 | 0.08 | 0.22 | 0.003 | 6.24 | 6.84 | 0.37 | reszta rest |

TABLE 1. Chemical composition of titanium Grade 4 and Ti-6AI-7Nb alloy.

TABELA 1. Skład chemiczny tytanu Grade 4 oraz stopu Ti-6AI-7Nb.

ściowe zawierały alkohol etylowy (EtOH) i wodę. Jako katalizator zastosowano kwas solny (HCI). W ramach oceny własności mechanicznych warstwy przeprowadzono badanie przyczepności do podłoża oraz pomiar twardości.

Badania przyczepności i oznaczanie innych symptomów uszkodzenia mechanicznego przeprowadzono metodą zarysowania (scratch test) przy użyciu platformy otwartej wyposażonej w Micro-Combi-Tester firmy CSM zgodnie z normą [13-16]. Test polegał na wykonaniu rysy z wykorzystaniem penetratora - stożka diamentowego Rockwella przy stopniowym wzroście siły normalnej obciążającej ten penetrator - RYS. 1. Siła krytyczna, będąca miarą adhezji, to najmniejsza siła normalna powodująca utratę adhezji powłoki z podłożem. Do oceny wartości siły krytycznej Lc posłużył zapis zmian sygnałów emisji akustycznej, siły tarcia i współczynnika tarcia oraz obserwacje mikroskopowe wykonane na mikroskopie świetlnym stanowiącym integralną część platformy. Emisja akustyczna AE, zwana emisją fali naprężeniowej, jest zdefiniowana jako sprężysta fala generowana przez uwalnianie wewnętrznie zmagazynowanej energii w strukturze materiału. Detekcja AE może być rejestrowana w czasie scratch - testu pod warunkiem, że energia wiązania między powłoką a podłożem jest wystarczająco wysoka. W wyniku formowania się uszkodzeń i ich propagacji podczas trwania scratch testu powstaje uderzenie fali naprężeniowej wywołujące emisję widma sygnału, którego amplituda koresponduje z uszkodzeniami powstającymi w obszarze międzyfazowym powłoka - podłoże. Tak więc, sygnał akustyczny zawiera informacje o rozmiarach i liczbie uszkodzeń. Badania wykonano przy narastającej sile obciążającej od 0,03÷30 N i przy następujących parametrach pracy: szybkość obciążania 100 N/min, prędkość przesuwu stolika 10 mm/min, długość rysy ~3 mm.



RYS. 1. Efekt oddziaływania na podłoże wgłębnika w metodzie scratch test. FIG. 1. Scratch test principles.

TABELA 2. Własności mechaniczne tytanu Grade 4 oraz stopu Ti-6AI-7Nb. TABLE 2. Mechanical properties of titanium Grade 4 and Ti-6AI-7Nb alloy.

| Rodzaj materiału | Własności mechaniczne Mechanical properties | | | | | | |
|-----------------------------|--|----------------------------|--------------|-----|----------|--|--|
| Type of material | E [GPa] | Rp _{0,2} [MPa] | Rm, [MPa] | ΗV | A [%] | | |
| Tytan / Titanium Grade 4 | 108 | 568 | 640 | 220 | 30 | | |
| Stop / Alloy Ti-6Al-7Nb | 105 | 1013 | 1098 | 338 | 18 | | |

Samples were subjected to surface treatment (mechanical polishing, Ra = 0.12 µm), and then SiO₂ layer was applied by means of sol-gel method (v = 3.0 cm/min, T = 430°C, t = 60 min). Silicon precursors used in the tests was tetrae-thyl orthosilicate Si(OC₂H₅)₄ (TEOS), and tetramethoxysilane Si(OCH₃)₄ (TMOS). The rest of initial components included ethyl alcohol (EtOH) and water. Hydrochloric acid (HCI) was used as a catalyst. As a part of evaluation of mechanical properties of the layer, the adhesion to the substrate test and hardness tests were performed.

Adhesion test and determination of other symptoms of mechanical damage were performed with scratch test with application of Open Platform equipped with Micro-Combi-Tester according to the standard [13-16]. The test consisted in making a scratch with penetrator - Rockwell diamond taper - with gradual increase of axial force acting on that penetrator - FIG. 1. Critical force which is the measure of adhesion is the smallest axial force that causes loss of layer adhesion to the substrate. Records of changes of acoustic emission signal, friction force and friction factor and microscopic observations performed on optical microscope which is an integral part of the Platform, were used for evaluation of critical force Lc. Acoustic emission AE, called the emission of stress wave, is defined as elastic wave generated by release of internally stored energy in the structure of the material. Detection of AE can be registered during scratch test, providing that bond energy between the layer and the substrate is high enough. Created defects and their propagation during scratch test result in stress wave impact which induces emission of signal spectrum, the amplitude of which corresponds to defects that form in the interfacial area: layer - substrate. Therefore, acoustic signal contains information about sizes and number of defects. The tests were performed with constantly increasing load from 0.03÷30 N and the following working parameters: loading rate 100 N/min, stage travelling speed 10 mm/min, scratch length ~3 mm.

Materials and Methods

Material used for tests was titanium Grade 4 and titanium alloy Ti-6AI-7Nb with chemical composition presented in TABLE 1 and mechanical properties presented in TABLE 2. Chemical composition and mechanical properties were in accordance with the requirements of standards [11,12]. Pomiary nanotwardości oraz modułu Younga naniesionej warstwy SiO₂ przeprowadzono metodą Olivera & Pharra z wykorzystaniem wgłębnika Berkovicha (ostrosłup o podstawie trójkąta). W celu zapewnienia wykonania prawidłowego pomiaru i usunięcia wpływu podłoża na twardość naniesionych warstw zagłębienie penetratora podczas badań nie powinno przekraczać 10% grubości powłoki. W przypadku analizy badanych próbek wartość zagłębienia penetratora wynosiła 20 nm. Szybkość narastania siły obciążającej i odciążającej wynosiła 5 mN/min. Pomiar nanotwardości warstwy zmierzono na platformie otwartej Micro-Combi-Tester firmy CSM Instruments. Wartość siły obciążającej wgłębnik w tym przypadku była wynikowa i wynosiła 0,2 mN.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki badań wskazują na małą przyczepność warstwy SiO₂ do podłoża z tytanu Grade 4 oraz stopu tytanu Ti-6AI-7Nb. Świadczą o tym małe wartości poszczególnych parametrów określonych na podstawie przeprowadzonych pomiarów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w przypadku analizowanej warstwy naniesionej na tytan Grade 4, krytyczna wartość siły, która spowodowała delaminację warstwy, rozwarstwienia na zewnątrz i wewnątrz wynosiła Lc = 6,9 N (RYS. 2). Z kolei w przypadku podłoża ze stopu Ti-6AI-7Nb wartość ta wynosiła Lc = 5,8 N (RYS. 3). Niezależnie od materiału podłoża podczas badania nie wystąpił sygnał emisji akustycznej, co świadczy o tym, że energia wiązania między powłoką a podłożem była zbyt niska.

Measurements of nano-hardness and Young's modulus of the applied SiO_2 layer were made by means of Oliver & Pharr method with application of Berkovich intending tool (Triangular base pyramid). In order to ensure proper measurement and get rid of the substrate influence on the hardness of applied layers, the pit of the penetrator during the tests should not exceed 10% of layer thickness. When tested samples were analysed the depth into which penetrator was inserted was 20 nm. Rate of loading and unloading force increase was 5 mN/min. Measurement of the layer nano-hardness was made on the open platform Micro-Combi-Tester by CSM Instruments. The value of the loading force of the penetrator was in that case resultant and equalled 0.2 mN.

Results and Discussion

Obtained results show low adhesion of SiO₂ layer to the substrate made of titanium Grade 4 and titanium alloy Ti-6AI-7Nb. It is proved by low values of the respective parameters determined on the ground of performed measurements. Based on the results it was concluded that for the analysed layer applied on titanium Grade 4, critical value of the force which caused delamination of the layer, external and internal delamination was Lc = 6.9 N (FIG. 2). Next, as far as substrate made of Ti-6AI-7Nb alloy is concerned, that value was Lc = 5.8 N (FIG. 3). Irrespective of the material of the substrate, there was no acoustic emission signal during the test, which proves that bond energy between the layer and the substrate was not high enough.



RYS. 2. Wyniki badań adhezji dla warstwy SiO₂ naniesionej metodą zol-żel wytworzonej na tytanie Grade 4 (Ft – siła tarcia, Fn – siła obciążająca, Pf – profil powierzchni, Pd – głębokość penetracji, μ - współczynnik penetracji). FIG. 2. Results of adhesion test for the SiO₂ layer applied with sol-gel created on titanium Grade 4 (Ft – friction force, Fn – loading force, Pf – surface profile, Pd – penetration depth, μ - penetration coefficient).

BI MATERING OF



RYS. 3. Wyniki badań adhezji dla warstwy SiO₂ naniesionej metodą zol-żel wytworzonej na stopie Ti-6Al-7Nb (Ft-siła tarcia, Fn-siła obciążająca, Pf-profil powierzchni, Pd-głębokość penetracji, μ -współczynnik penetracji). FIG. 3. Results of adhesion tests for the layer SiO₂ applied with sol-gel method created on Ti-6Al-7Nb alloy (Ft – friction force, Fn – loading force, Pf – surface profile, Pd – penetration depth, μ - penetration coefficient).

W ramach badań własności mechanicznych analizowanych warstw SiO₂ przeprowadzono również pomiary nanotwardości oraz modułu Younga. Wyniki przeprowadzonych pomiarów przedstawiono w TABELI 3. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że niezależnie od materiału podłoża (tytan Grade 4, stop Ti-6AI-7Nb) twardość naniesionej warstwy SiO₂ była identyczna i wynosiła 25 HV. Dodatkowo przeprowadzono również pomiary twardości podłoża, które wynosiły 220 HV dla tytanu Grade 4 oraz 338 HV dla stopu Ti-6AI-7Nb. Stwierdzono również, iż warstwa SiO₂ naniesiona na tytan Grade 4 charakteryzowała się porównywalnym modułem Younga. As a part of mechanical properties tests of the analysed SiO_2 layers, measurements of nano-hardness and Young's modulus were also made. Results are presented in TABLE 3 and they enable to conclude that irrespective of substrate material (titanium Grade 4, alloy Ti-6Al-7Nb), hardness of the applied SiO_2 layer was identical and equalled 25 HV. In addition, tests of substrate hardness were performed, and their results were 220 HV for titanium Grade 4 and 338 HV for Ti-6Al-7Nb alloy. It was also proved that SiO_2 layer applied on titanium Grade 4 featured a comparable Young's modulus.

TABELA 3. Zestawienie wyników pomiarów twardości i modułu Younga dla warstw SiO₂ wytworzonych na tytanie Grade 4 oraz stopie Ti-6AI-7Nb.

TABLE 3. Table of results of measurement of Young's modulus for SiO_2 layers created on titanium Grade 4 and Ti-6AI-7Nb alloy.

| Rodzaj podłoża Type of | h _{max} [nm] | Wartość mierzona Measured | | N | Wartość średnia | Odchylenie standardowe | | | |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----|-----|--------------------|---------------------------|-----|-------|-----------|
| substrate | | value | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | value | deviation |
| Tytan / Titanium Grade 4 | 20 | HV | 24 | 28 | 26 | 25 | 24 | 25 | 1.67 |
| | | E [GPa] | 5.2 | 4.9 | 4.3 | 4.2 | 4.7 | 4.7 | 0.41 |
| Stop / Alloy | 20 | HV | 28 | 27 | 25 | 20 | 25 | 25 | 3.08 |
| Ti-ĠAl-7NĎ | 20 | E [GPa] | 4.8 | 4.2 | 4.5 | 4.6 | 5.1 | 4.6 | 0.33 |

Wnioski

Jednym ze sposobów poprawienia hemokompatybilności powierzchni biomateriałów tytanowych jest wykorzystanie metody zol-żel dla wytworzenia cienkich powłok tlenkowych na bazie takich pierwiastków jak: Ti i Si. Zaletą tej metody jest niska temperatura otrzymywania powłok, co gwarantuje niezmienność własności mechanicznych podłoża metalowego. Modyfikacja powierzchni stopów tytanowych nie może powodować zmian składu elektrolitu, nieodwracalnych uszkodzeń struktury białek, uwalniania składników upostaciowionych krwi, jak też nie powinna inicjować procesu wykrzepiania, reakcji toksycznych i immunologicznych [17]. W celu ograniczenia tych niekorzystnych zjawisk ustalono warunki wytwarzania warstwy krzemionkowej na powierzchni zaproponowanych biomateriałów tytanowych. Naniesienie warstwy SiO₂ poprzedziło polerowanie elektrolityczne. Przeprowadzone badania wykazały dobre własności mechaniczne warstwy SiO₂ naniesionej na powierzchnię zarówno tytanu Grade 4 jak i stopu Ti-6Al-7Nb. Twardość w obydwu przypadkach była identyczna. Ponadto pomiary wykonane na różnych głębokościach od powierzchni wykazały, że warstwa ta ma charakter jednorodny. Taki rodzaj warstwy sprzyja odkształcaniu implantu chociażby podczas montażu płatków mechanicznej zastawki serca. Jedynie są różnice w krytycznych wartościach siły, która spowodowała delaminację warstwy. W obu przypadkach nie wystąpił sygnał emisji akustycznej, co świadczy o niskiej energii wiązania warstwy z podłożem.

Podziękowanie

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr 2011/03/B/ST8/06499.

Piśmiennictwo

[1] M. Rachwalik, D. Biały, M. Wawrzyńska: Mechaniczne protezy zastawek serca – historia i rozwój technologii. Acta Bio-Optica et Informatica Medica 16 (2010) 265-267.

[2] S. Areva, V. Aaritalo, S. Tuusa, M. Jokinen, M. Linden, T. Peltola: Sol-Gel-derived TiO_2 – SiO_2 implant coatings for direct tissue attachment. Part I & II: design, preparation and characterization. Journal of Materials Science: Materials Medicine 18 (2007) 1863-1873, 1633-1642.

[3] W. Zhao, J. Chang, J. Wang, W. Zhai, Z. Wang: In vitro bioactivity of novel tricalcium silicate ceramics. Journal of Materials Science: Materials Medicine 18 (2007) 917-923.

[4] B. Surowska, J. Bienias, M. Walczak, K. Sangwal, A. Stoch: Microstructure and mechanical properties of ceramic coatings on Ti and Ti-based alloy. Applied Surface Science 238 (2004) 288-294.
[5] C. Brinker, G. Scherer: Sol-gel science. Academic Press, Inc. San Diego 1990.

[6] S. Ni, J. Chang, L. Chou: In vitro studies of novel CaO-SiO₂-MgO system composite bioceramics. Journal of Materials Science: Materials Medicine 19 (2008) 359-367.

[7] S. Shibli, S. Mathai Development and bio-electrochemical characterization of a novel TiO_2 -SiO₂ mixed oxide coating for titanium implants. Journal of Material Science 19 (2008) 2971-2981.

[8] R. Gvishi: Fast sol–gel technology: from fabrication to applications. Journal Sol-Gel Science Technology 50 (2009) 241-253.
[9] P. Karasiński: Influence of technological parameters on the properties of sol-gel silica films. Optica Applicata 26 (2005) 253-263.

Conclusions

One of the ways how to improve titanium biomaterials surface haemocompatibility is application of sol-gel method for creation of thin oxide layers on the base of Ti and Si. An advantage of that method is low temperature at which the layer is obtained, what guarantees stability of mechanical properties of metallic substrate. Modification of the surface of titanium alloys cannot bring about changes in electrolyte composition, irreversible damage to protein structure, release of blood morphotic elements, and it should not trigger coagulation process, toxic nor immunological reactions, though [17]. In order to limit those unfavourable phenomena, conditions of production of silicone layer on the surface of suggested titanium biomaterials were determined. Application of SiO₂ layer was preceded with electrolytic polishing. Results showed good mechanical properties of SiO₂ layer applied on the surface of both titanium Grade 4 and Ti-6AI-7Nb alloy. Hardness was identical in both cases. Moreover, measurement made on different depths from the surface showed that layer is homogeneous. Such type of layer fosters deformation of the implant, for example during assembly of cusps of mechanical heart valve. The only slight differences were observed for critical values of force that caused layer delamination. In both cases there was no acoustic emission signal, which proves low bond energy between the layer and the substrate.

Acknowledgements

The project was funded by the National Science Centre allocated on the basis of the decision No. 2011/03/B/ ST8/06499.

References

 [10] D. Bogdanski, M. Epple, S. Esenwein, G. Muhr, V. Petzoldt, O. Prymak, et al.: Biocompatibility of calcium phosphate-coated and of geometrically structured nickel–titanium (Ni-Ti) by in vitro testing methods. Materials Science Engineering A378 (2004) 527-531.
 [11] ISO 5832-2:1999 Implants for surgery - Metallic materials - Part 2:

Unalloyed titanium.

[12] ISO 5832-11:2007 Implants for surgery - Metallic materials - Part 11: Wrought titanium 6-aluminium 7-niobium alloy.

[13] PN-EN 1071-3:2007, Techniczna ceramika zaawansowana - Metody badania powłok ceramicznych Część 3: Oznaczanie adhezji i innych mechanicznych rodzajów uszkodzeń w próbie zarysowania.

[14] J. Bull, D.S. Rickery: Multi-Pass Scratch Testing as a model for abrasive wear. Thin Solid Films 181 (1989) 545.

[15] Von Stebut, J., Multi-mode scratch testing – a European standards, measurements and testing study. Surface. Coating Technology 200 (2005) 346-350.

[16] I. Efeoglu, R.D. Arnell: Multi-pass sub-critical load testing of titanium nitride coatings. Thin Solid Films 346 (2000) 377-378.
[17] Z. Paszenda: Kształtowanie własności fizykochemicznych stentów wieńcowych ze stali CrNiMo do zastosowań w kardiologii zabiegowej. Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej, Mechanika z. 150, nr 1667, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2005.

.



STUDIA PODYPLOMOWE Biomateriały – Materiały dla Medycyny 2014/2015

| Organizator: | Adres: |
|--|---|
| Akademia Górniczo-Hutnicza | 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 |
| im. Stanisława Staszica w Krakowie | Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 |
| Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki | tel. 12 617 44 48; fax. 12 617 33 71 |
| Katedra Biomateriałów | email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl |
| Kierownik: | http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/stu- |
| Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH | dia-podyplomowe/biomaterialy-materialy-dla-medycyny/ |

Charakterystyka:

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: *in vitro* i *in vivo*). 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.

Sylwetka absolwenta:

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 biozgodności materiałów.

Zasady naboru:

Termin zgłoszeń: od 20.09.2014 do 20.10.2014 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej

Opłaty: 2 600 zł

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) dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (tel. 12 617 47 44, e-mail: krok@agh.edu.pl)

Czas trwania:

| ozao a mamar | |
|--|--|
| 2 semestry (od XI 2014 r. do VI 2015 r.) | |

Informacje dodatkowe:

Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.

.