

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW  
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW  
I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 63-64  
Numer 63-64

Volume X  
Rok X

SEPTEMBER-  
DECEMBER 2007  
WRZESIEŃ-  
GRUDZIEŃ 2007

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:  
WYDAWCA:

Polish Society  
for Biomaterials  
in Cracow  
Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

EDITORIAL  
COMMITTEE:  
KOMITET  
REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief  
Redaktor naczelny  
Jan Chłopek

Secretary of editorial  
Sekretarz redakcji  
Katarzyna Trała

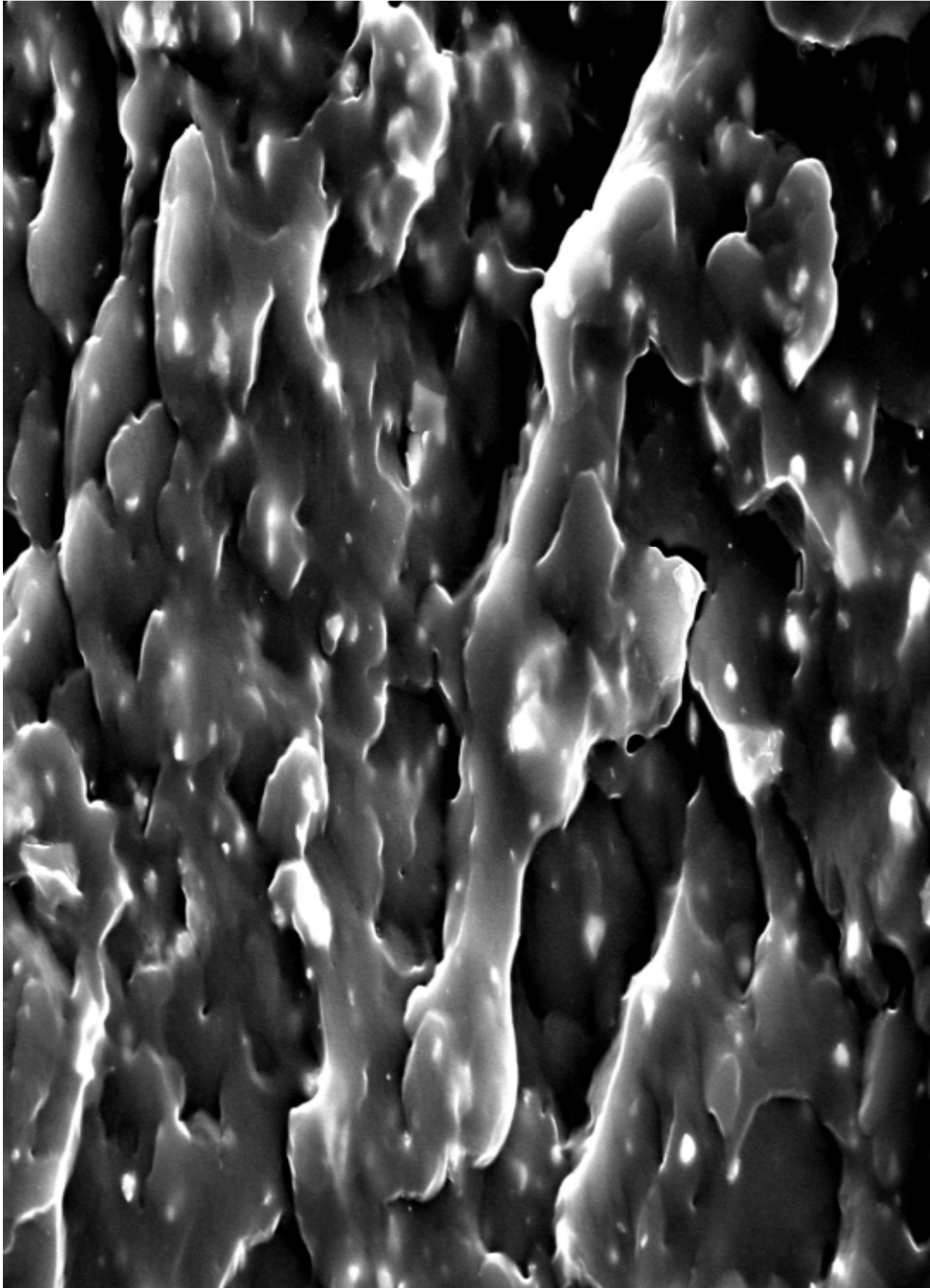
Design  
Projekt  
Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF  
EDITORIAL OFFICE:  
ADRES REDAKCJI:

UST-AGH  
al. Mickiewicza 30/A3  
30-059 Cracow, Poland  
Akademia  
Górnictwo-Hutnicza  
al. Mickiewicza 30/A-3  
30-059 Kraków

Issue: 200 copies  
Nakład: 200 egz.

Scientific Publishing  
House AKAPIT  
Wydawnictwo Naukowe  
AKAPIT  
e-mail: wn@akapit.krakow.pl



# STUDIA PODYPLOMOWE

## Biomateriały – Materiały dla Medycyny

2007/2008

<b>Organizator:</b> Akademia Górniczo-Hutnicza Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	<b>Adres:</b> 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 108 lub 107 tel. 12 617 44 48, 12 617 34 41; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl stodolak@agh.edu.pl http://www.agh.edu.pl/stpodypl/studium.php?id=39
<b>Kierownik:</b> Dr inż. Elżbieta Pamuła	
<b>Charakterystyka:</b> Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
<b>Sylwetka absolwenta:</b> Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.	
<b>Zasady naboru:</b> Termin zgłoszeń: do 1 lutego 2008 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 108 lub 107 Osoby przyjmujące zgłoszenia: Dr inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Dr inż. Ewa Stodolak (tel. 12 617 34 41, e-mail: stodolak@agh.edu.pl)	
<b>Czas trwania:</b> Semestr letni 2007/08	<b>Opłaty:</b> 2 000 PLN
<b>Informacje dodatkowe:</b> Zajęcia: 7 zjazdów (soboty-niedziele) co 2 tygodnie. Przewidywana liczba godzin: 120. Przewidywana data rozpoczęcia: 01.03. 2008.	



### *INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD / MIĘDZYKRAJOWY KOMITET REDAKCYJNY*

- Iulian Antoniac - University Politehnica of Bucharest, Romania*  
*Lucie Bacaková - Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*  
*Romuald Będziński - Politechnika Wrocławska / Wrocław University of Technology, Poland*  
*Marta Błażewicz - Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland*  
*Stanisław Błażewicz - Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland*  
*Maria Borczuch-Lączka - Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland*  
*Tadeusz Cieślak - Śląska Akademia Medyczna / Medical University of Silesia, Poland*  
*Jan Ryszard Dąbrowski - Politechnika Białostocka / Białystok Technical University, Poland*  
*Andrzej Górecki - Akademia Medyczna w Warszawie / Medical University of Warsaw, Poland*  
*Robert Hurt - Brown University, Providence, USA*  
*James Kirkpatrick - Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany*  
*Małgorzata Lewandowska-Szumiel - Akademia Medyczna w Warszawie / Medical University of Warsaw, Poland*  
*Jan Marciniak - Politechnika Śląska / The Silesian University of Technology, Poland*  
*Sergey Mikhailovsky - University of Brighton, Great Britain*  
*Stanisław Pielka - Akademia Medyczna we Wrocławiu / Wrocław Medical University, Poland*  
*Jacek Składzień - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków/Jagiellonian University, Collegium Medicum, Cracow, Poland*  
*Anna Ślósarczyk - Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland*  
*Tadeusz Trzaska - Akademia Wychowania Fizycznego, Poznań / University School of Physical Education, Poznań, Poland*  
*Dimitris Tsipas - Aristotle University of Thessaloniki, Greece*

XVII Conference on

**BIOMATERIALS  
IN MEDICINE  
AND  
VETERINARY  
MEDICINE**

October, 11-14, 2007,  
Hotel „Perla Poludnia”, Rybro

<http://galaxy.uci.agh.edu.pl/~apowroz/biomat/>

## SPIS TREŚCI

MEDIASTENITIS AS COMPLICATION OF ACUTE DENTAL INFECTION O.P.CHUDAKOV, A.Z.BARMUTZKAYA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA	1
THE ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF UHMWPE MODIFICATION ON THE WEAR RESISTANCE R. SEDLACEK, J. VONDROVA	2
STRUCTURE AND PROPERTIES OF CERAMIC GRAFTING MATERIAL T.M.ULYANOVA, L.V.TITOVA, V.L.EVTUKHOV	4
STATIC FINITE ELEMENT ANALYSIS OF LOWER LIMB L.ZACH, S.KONVICKOVA, P.RUZICKA	6
CLINICAL AND HISTOLOGICAL RESULTS OF ACUPUNCTURE INFLUENCE ON ACUTE PYO- INFLAMMATORY PROCESSES DEVELOPEMENT IN SOFT TISSUES. EXPERIMENTAL CASE Y.M.KAZAKOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, E.I.PARHOVTCHENKO	8
RESULTS OF LASER ACUPUNCTURE INFLUENCE ON LOCAL CLINICAL AND LABORATORY INDICES AFTER DENTAL IMPLANTATION IN EXPERIMENT A.P.PILIPENKO, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA	9
RESULTS OF ACUPUNCTURE IN COMPLEX THERAPY FOR PATIENTS WITH ACQUIRED DETTECTS OF LOWER JAW ON THE ORAL FLUID MICROCRYSTALLIZATION FINDINGS I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, A.O.SAKADYNETZ	11
PROGNOSTIC CRITERIA FOR DEVELOPMENT OF CHRONIC ODONTOGENOUS SINUSITIS OF MAXILLARY SINUS I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, A.V.SURIN	12
THE STRUCTURE AND IMMOBILIZATION ACTIVITY OF POLYVINYLPIRROLIDONE CROSS-LINKED COPOLYMERS O.SUBERLYAK, V.SKOROKHODA, N.SEMENYUK	14
NANO-SIZED MICELLES FORMED BY SELF- ASSEMBLING OF POLYLACTIDE/POLY- (ETHYLENE GLYCOL) BLOCK COPOLYMERS IN AQUEOUS SOLUTIONS L.YANG, Z.ZHAO, J.WEI, S.LI	16
HIGH-HYDROPHILIC MEMBRANES FOR DIALYSIS AND HEMODIALYSIS O.SUBERLYAK, J.MELNYK, N.BARAN	18

*STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS  
 ABSTRACTED IN APPLIED MECHANICS REVIEWS*

## CONTENTS

MEDIASTENITIS AS COMPLICATION OF ACUTE DENTAL INFECTION O.P.CHUDAKOV, A.Z.BARMUTZKAYA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA	1
THE ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF UHMWPE MODIFICATION ON THE WEAR RESISTANCE R. SEDLACEK, J. VONDROVA	2
STRUCTURE AND PROPERTIES OF CERAMIC GRAFTING MATERIAL T.M.ULYANOVA, L.V.TITOVA, V.L.EVTUKHOV	4
STATIC FINITE ELEMENT ANALYSIS OF LOWER LIMB L.ZACH, S.KONVICKOVA, P.RUZICKA	6
CLINICAL AND HISTOLOGICAL RESULTS OF ACUPUNCTURE INFLUENCE ON ACUTE PYO- INFLAMMATORY PROCESSES DEVELOPEMENT IN SOFT TISSUES. EXPERIMENTAL CASE Y.M.KAZAKOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, E.I.PARHOVTCHENKO	8
RESULTS OF LASER ACUPUNCTURE INFLUENCE ON LOCAL CLINICAL AND LABORATORY INDICES AFTER DENTAL IMPLANTATION IN EXPERIMENT A.P.PILIPENKO, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA	9
RESULTS OF ACUPUNCTURE IN COMPLEX THERAPY FOR PATIENTS WITH ACQUIRED DETTECTS OF LOWER JAW ON THE ORAL FLUID MICROCRYSTALLIZATION FINDINGS I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, A.O.SAKADYNETZ	11
PROGNOSTIC CRITERIA FOR DEVELOPMENT OF CHRONIC ODONTOGENOUS SINUSITIS OF MAXILLARY SINUS I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, A.V.SURIN	12
THE STRUCTURE AND IMMOBILIZATION ACTIVITY OF POLYVINYLPIRROLIDONE CROSS-LINKED COPOLYMERS O.SUBERLYAK, V.SKOROKHODA, N.SEMENYUK	14
NANO-SIZED MICELLES FORMED BY SELF- ASSEMBLING OF POLYLACTIDE/POLY- (ETHYLENE GLYCOL) BLOCK COPOLYMERS IN AQUEOUS SOLUTIONS L.YANG, Z.ZHAO, J.WEI, S.LI	16
HIGH-HYDROPHILIC MEMBRANES FOR DIALYSIS AND HEMODIALYSIS O.SUBERLYAK, J.MELNYK, N.BARAN	18

*WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI  
 I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO  
 EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE  
 AND HIGHER EDUCATION*

**IMMOBILIZATION OF COLLAGEN –  
AN EFFECTIVE METHOD OF IMPROVING CELL  
ADHESION ON POLYMERIC MATERIALS**

E.PAMUŁA, A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA

20

**WPŁYWU ŻELU WYBIELAJĄCEGO Z NAD-  
TLENKIEM MOCNIKA NA POWIERZCHNIĘ  
SZKLIWA - BADANIA ZA POMOCĄ  
MIKROSKOPU SIŁ ATOMOWYCH (AFM)**

D.KOŚCIELNIAK, E.PAMUŁA

24

**DŁUGOCZASOWA KOROZJA STOPÓW REX 734  
I PANACEA P558 W ROZTWORACH**

0.5 M NACI I TYRODE'A

B.BURNAT, T.BŁASZCZYK, A.LENIART, H.SCHOLL, L.KLIMEK

28

**WPŁYW PROSZKÓW WĘGLOWYCH  
NA LUDZKIE KRWINKI BIAŁE**

K.BĄKOWICZ-MITURA, M.CZERNIAK-RECZULSKA, Z.BAJ

32

**STRUKTURA WARSTW WĘGLOWYCH  
WYTWORZONYCH NA STOPACH NiTi  
WYKAZUJĄCYCH PAMIĘĆ KSZTAŁTU**

J.LEŁĄTKO, T.GORYCZKA, E.RÓWIŃSKI, P.PĄCZKOWSKI,  
A.DRDZEŃ, H.MORAWIEC

34

**DYNAMIKA ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI  
POWIERZCHNIOWYCH POD WPŁYWEM  
ROZTWORU FIZJOLOGICZNEGO**

W BIOSZKŁACH OTRZYMANYCH Z ŻELU

S.SZARSKA, A.WÓJCIK, B.BARWIŃSKI

37

**WARSTWA PLATYNOWA DLA OCHRONY TAŚM  
STOPU NiTiCu WYKAZUJĄCEGO EFEKT  
PAMIĘCI KSZTAŁTU**

T. GORYCZKA, J.LEŁĄTKO, Z.PASZENDA

40

**REAKCJE BIOLOGICZNE NA GRANICY  
IMPLANT-ORGANIZM**

B.ŚWIECZKO-ŻUREK

43

**BIORESORBOWALNE TERPOLIMERY  
LAKTYDU, GLIKOLIDU I TRIMETYLOWĘGLANU  
OBDARZONE WŁASNOŚCIĄ**

ZAPAMIĘTYWANIA KSZTAŁTU

P.DOBRZYŃSKI, J.KASPERCZYK, M.BERO,  
M.SCANDOLA, E. ZINI

45

**POLIMERY Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU – BADANIE  
MIKROSTRUKTURY ŁAŃCUCHA TERPOLIMERÓW  
LL-LAKTYDU, GLIKOLIDU**

I TRIMETYLENOWĘGLANU

K.GĘBAROWSKA, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI,  
M.SCANDOLA, E.ZINI

48

**ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII  
W PODCZERWIENI DO BADAŃ POLIMERÓW  
Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU**

B.KACZMARCZYK, P.DOBRZYŃSKI, J.KASPERCZYK, M.BERO

51

**ANALIZA TOPOGRAFII POWIERZCHNI  
MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH,  
STOSOWANYCH JAKO PODŁOŻA DO  
HODOWLI CHONDROCYTÓW TECHNIKĄ AFM**

J.SZCZERBA, A.ORCHEL, K.JELONEK, J.KASPERCZYK,  
J.JURUSIK, P.DOBRZYŃSKI, I.BIELECKI, Z.DZIERŻEWICZ

55

**IMMOBILIZATION OF COLLAGEN –  
AN EFFECTIVE METHOD OF IMPROVING CELL  
ADHESION ON POLYMERIC MATERIALS**

E.PAMUŁA, A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA

20

**AN ATOMIC FORCE MICROSCOPY STUDY  
ON THE EFFECT OF CARBAMIDE  
PEROXIDE BLEACHING GEL  
ON ENAMEL SURFACE**

D.KOŚCIELNIAK, E.PAMUŁA

24

**LONG-TIME CORROSION OF REX 734  
AND PANACEA P558 ALLOYS IN 0.5 M NACI  
AND TYRODE'S SOLUTIONS**

B.BURNAT, T.BŁASZCZYK, A.LENIART, H.SCHOLL, L.KLIMEK

28

**INFLUENCE OF CARBON POWDER PARTICLES  
ON HUMAN NEUTROPHILS**

K.BĄKOWICZ-MITURA, M.CZERNIAK-RECZULSKA, Z.BAJ

32

**STRUCTURE OF THE CARBON  
LAYERS ON NiTi SHAPE  
MEMORY ALLOY**

J.LEŁĄTKO, T.GORYCZKA, E.RÓWIŃSKI, P.PĄCZKOWSKI,  
A.DRDZEŃ, H.MORAWIEC

34

**SURFACE DYNAMIC PROPERTIES  
UNDER PHYSIOLOGICAL SOLUTION  
INFLUENCE OF GEL-DERIVED BIOGLASS**

S.SZARSKA, A.WÓJCIK, B.BARWIŃSKI

37

**PLATINUM LAYER FOR NiTiCu SHAPE  
MEMORY STRIP PROTECTION**

T. GORYCZKA, J.LEŁĄTKO, Z.PASZENDA

40

**THE BIOLOGICAL REACTIONS ON THE  
IMPLANT-ORGANISM BORDER**

B.ŚWIECZKO-ŻUREK

43

**BIORESORBABLE LACTIDE/GLYCOLIDE/  
TRIMETHYLENE CARBONATE TERPOLYMERS  
WITH SHAPE RECOVERY PROPERTIES**

P.DOBRZYŃSKI, J.KASPERCZYK, M.BERO,  
M.SCANDOLA, E. ZINI

45

**SHAPE-MEMORY POLYMERS – INVESTIGATION  
OF LL-LACTIDE, GLYCOLIDE AND TRIMETHYLENE  
CARBONATE TERPOLYMER'S CHAIN**

MICROSTRUCTURE

K.GĘBAROWSKA, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI,  
M.SCANDOLA, E.ZINI

48

**APPLICATION OF INFRARED  
SPECTROSCOPY IN SHAPE MEMORY  
POLYMERS STUDY**

B.KACZMARCZYK, P.DOBRZYŃSKI, J.KASPERCZYK, M.BERO

51

**ANALYSIS OF THE SURFACE TOPOGRAPHY  
OF POLYMERIC SUBSTRATA FOR  
CHONDROCYTE CULTURE USING  
THE AFM TECHNIQUE**

J.SZCZERBA, A.ORCHEL, K.JELONEK, J.KASPERCZYK,  
J.JURUSIK, P.DOBRZYŃSKI, I.BIELECKI, Z.DZIERŻEWICZ

55

# MEDIASTENITIS AS COMPLICATION OF ACUTE DENTAL INFECTION

O.P. CHUDAKOV, A.Z. BARMUTZKAYA,  
I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA

BELARUSSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS,  
BELARUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS  
PUSHKIN AV. 33-239; PO BOX 190; 220092 MINSK, BELARUS  
E-MAIL: IP-C@YANDEX.RU

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 1-2]

Quantity of patients with pyoinflammatory processes of odontogenic etiology underwent treatment in Clinic for Maxillofacial diseases in 2000 – 2005 in 2<sup>nd</sup> Department of Cranio-maxillofacial Surgery of «City Clinic №9» remains considerable and composes 2520 patients. At the same time, quantity of patients with serious extended phlegmons of head and neck increases. Inflammatory processes affected some cellular spaces, 32 patients had complications of odontogenous mediastinitis. In 30 cases it was anterior cephalic neck mediastinitis. Inflammatory process spreading on the neck that in anterior mediastinum we observed during extended phlegmons of mouth floor and root of tongue sequent the break of internal layer of neck fascia overcoming barrier of hyoid bone and inflammatory exudation penetrating in near trachea cellular tissue of neck between parietal and visceral layers of 4<sup>th</sup> fascia. Pyoinflammatory process was spreading in anterior mediastinum by fissure between trachea and fascia sheath of neurovascular fascicle of neck for some patients. Pyoinflammatory process spreading from anterior near pharynx space into its posterior part along artery and nerves through diaphragm Geonesko was also observed. When patients had posterior mediastinitis, inflammatory process was spreading into posterior mediastinum from neck trachea cellular tissue what was accompanied with extended tissue necrosis as well as fascia. That is why purulent exudation having broken integrity of visceral layer of 4<sup>th</sup> fascia of neck, was spread on periesophageal fiber and posterior mediastinum fiber was also involved into pyoinflammatory process. We had one case when pyoinflammatory process spread from peritanzilar space into near pharynx space, pterygomandibular space and into posterior mediastinum finally by prevertebral cellular spaces.

Odontogenous contact mediastinitis characterize not only by hard development, but different symptoms with distinctive anatomic and physiological features of mediastinum. At the beginning of disease patients felt ill and were seating in forced position with head turned down. Some patients were in euphoria at the beginning because of intoxication. Common state was not appreciated adequately neither by patient nor by doctor. Patients with contact mediastinitis had temperature 39 - 40°C, pulsation was 140 – 150 beating per minute and was arrhythmic. Breathlessness was typical syndrome. Quantity of respiratory movements consisted 45 – 50 per minute. Respiration was superficial, breath too much short, outward breath longer in 2-3 times. Typical mediastinal symptom as retrosternal pain becoming stronger when patient turned down head and they tapot chest (Gerke's symptom). Pain appears when neurovascular fascicle shifts to the top of the neck (Ivanov's symptom). Jugular cavity becomes drawn when breathing (Ravitch-Tzerbo's symptom). Permanent tussiculation because of pharynx, larynx, mouth floor edema and hypersecretion of slime due to vagus nerve irritation and violation of catchment of bronchial tree (Popov's symptom). Increase of retrosternal pain, breath-

lessness and dysphagy at the time of passive trahea removal (Rutenburg-Revutsky's symptom). Pulsing pain in thorax, irradiating into interscapular region and increasing when to press on the spinous process of thoracic vertebra is characteristic for posterior mediastinitis (Tcherbo-Shteinberg's symptom). Rigidity of long muscle of back with reflex trait (RavitchTcherbo-Shteinberg's symptom). Very often inflammatory process passes from soft tissues of maxillofacial region and neck to the mediastinum without symptoms. It is necessary to pay attention that 2-3 or 6-7 days at maximum pass from the beginning of the disease (tooth treatment or its extraction). At that patients had no dense infiltration and symptoms of fluctuation in soft tissue of mouth floor and neck. Inflammatory edemas were spreading from cell space of maxillofacial area on the neck and mediastinum then. If first surgical d-bridement of suppurative focus was unequal, we saw supposed amelioration of patient when he felt better. Diagnosing odontogenic mediastinitis it is necessary to take into consideration indices by O.P. Chudakov (1979), indicating that 2 days after phlegmon of oral cavity development there is change of cellular tissue mediastinum typical for serous mediastinitis. So, all patients with spread phlegmon of the mouth floor and neck had radiation examination of neck and mediastinum in three projections in order to diagnose disease in earlier terms. Having a little of symptoms of mediastinitis, patients underwent computer tomography (KT) of neck and mediastinum. Examination was done twice and third time when it was necessary. KT semiotics of acute mediastinitis depended on process localization, its spread level and degree of development. Inflammatory infiltration of near gullet cellular tissue had round form and unequal contour of fluid density. Abscess of mediastinum had round or oval form with unequal or careless contours of fluid density and gas inclusions (FIG.1).

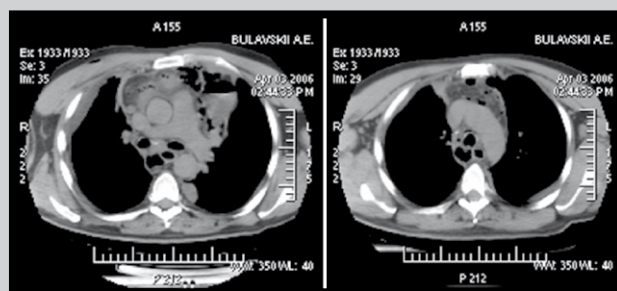


FIG.1. KT of patient with total inflammatory mediastinitis.

It gave to diagnose acute odontogeniz mediastinitis in earlier terms for all patients, do first adequate surgical treatment of suppurative focus with front top-neck mediastinotomy by V.I.Razumovskiy and catchment of mediastinum with system of active tube drainage (FIG.2). When patients had posterior mediastinitis, we reached posterior mediastinum through the neck doing mediastinotomy operation by Nassilov [4]. At the same time, maxillofacial specialists meet the problem when trachea intubations are hampered. Patients individual characteristics and pyoinflammatory processes with apparent intoxication could cause it. There is a risk of general anesthesia for those patients [2,3]. The main problem for anaesthetist is to provide patency of airways because every anesthetic provokes relaxation of cross-striated muscle. It is not possible to make lower jaw to take necessary position because of its inflammatory contracture. Not always the airway helps to cope with patency of airways violation. Situation could be complicated by real tissue edema intensity that it was determined when examination of patient's fauces, superficies of submandibu-



**FIG.2. Patient after first surgical treatment of suppurative focus of neck and front mediastinotomy by V.I.Razumovskiy.**

lar region and neck. When patient is in consciousness and has spontaneous breathing, relatively successful breathing and respiratory metabolism can become worse suddenly at the beginning of general anesthesia course and stopping of independent breathing. Compensated patency of airways violation turns into critical breathing disorder. Patient's status becomes worse rapidly. Trachea intubations can be ineffective in result of pharynx edema and entering into larynx. Direct laryngoscopy or fiber-optic bronchoscope application is impossible [1]. In those cases critical hypoxia expects tracheotomy application immediately what is also difficult due to increase of neck tissues edema. It is necessary to take into consideration that augmentation of laryngopharyngeal reflexes is independent from process localization in an anatomy region and can provoke laryngospasm. Reflexes of vagus nerve, larynx and trachea irritation combined with hypoxemia can lead to heart rate violation: extrasystole, ventricle fibrillation, asystole. In this connection, first we performed tracheostomy and intubations through it. Intubations were done under loco-regional anesthesia with fiber-optical control for 12 patients. Standard therapy course was performed postoperatively combined with rheology of blood. 29 patients left clinic 30-40 days after operation for out-patient treatment.

## Conclusion

It is evident clinical outcome of mediastinitis depends on its diagnostic in earlier terms, adequate first surgical treatment, optimal anesthesia, complex treatment combined with modern methods.

## References

- [1] Bogdanov A.B. Intubations of trachea. Publ. house: Dialekt, MEDpress, 2004.- 183 p.
- [2] Pohodenko-Chudakova I.O., Yanovitch G.V., Rudaya E.V. Optimization of intubation for patients with pyoinflammatory processes in maxillofacial region//Bul. of articles «Medicine of critic states. Perspectives, problems, decisions». Ekaterinburg: MZ Sverdlovskoy obl., NPRZ «Bonum», 2006.- P. 111 – 115.
- [3] Savva D. Prediction of difficult trachea intubation //Brit. J. Anaesth. 1994.- Vol.73.- P. 149 – 153.
- [4] Surgical infections: guideline /Under red. I.A.Erohin, B.R.Gelfand, S.A.Shliapnikov. STp: Piter, 2003.- 864 p.

# THE ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF UHMWPE MODIFICATION ON THE WEAR RESISTANCE

R. SEDLACEK, J. VONDROVA

CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
LABORATORY OF BIOMECHANICS, PRAGUE, CZECH REPUBLIC  
RADEK.SEDLACEK@FS.CVUT.CZ

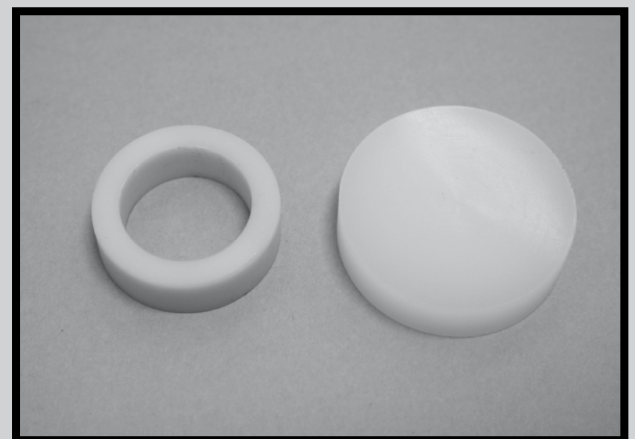
[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 2-4]

## Introduction

No known surgical implant material has ever been shown to be completely free of adverse reactions in the human body. However, long-time clinical experience of use of the biomaterials has shown that an acceptable level of biological response can be expected, when the material is used in appropriate applications. This article deals with very specific wear resistance testing of the bio-compatible and bio-stable materials used for surgical implants. This type of testing is very important for appreciation of new directions at the joint replacement design (for example in total knee replacement). The aim of this work is to evaluate the influence of modification of UHMWPE (Ultra High Molecular Weight Polyethylene) on the wear resistance. The special experiments were carried out in collaboration with company MEDIN ORTHOPAEDICS Inc. - developing and producing bone-substitute biomaterials and implants.

## Materials and methods

The special wear resistance tests, called "Ring On Disc", were completely carried out with a lot of pairs (FIG.1) of different biomaterials. The experiments were executed according to ISO 6474:1994(E). This International Standard deals with evaluation of properties of biomaterials used for production of bone replacement. The standard requires a long-time mechanical testing at which a complete volume of worn material is evaluated. The test conditions, requirements on the testing system and specimens' preparation are closely determined. For the specimens treatment and their evaluation, a procedure is assessed which ensures the testing objectivity.



**FIG.1. One pair of tested specimens.**

The method is based on loading and rotating two pieces from biomaterials. The FIGURE 2 shows the schematic diagram of the test. A ring is loaded onto a flat plate from different material. The axial load that is applied on the ring is all the time constant and equal  $1500 \pm 10$  N. The ring is rotated through an arc of  $\pm 25^\circ$  at a frequency of  $(1 \pm 0.1)$  Hz for a given period of time  $(100 \pm 1)$  hours. There is distilled water using as the surrounding medium.

The special jigs were used for fixing both specimens during testing. These jigs have to be able to undergo oscillatory rotation of the ring specimen about fixed axis using a sinusoidal or near-sinusoidal rate of change of angle. The disc-holding device is equipped with the especial joint to ensure the plane of the disc surface coincides with the plane of the ring surface at all times during the test. To control the test, a program was developed using the TestWare software, which, according to set limit values, reacts immediately on their reaching, or crossing, by an action selected in advance. The control program stores, in the data files, data concerning the time, the pressing force, the piston vertical position, the rotation angle, the torque, the number of cycles and the distilled water temperature. During the test, it comes, due to the specimen's friction, to heating and evaporation of water. Therefore, to supply the liquid into the space of the make-up piece, the PCD 21 peristaltic pump, adjusted to a minimum velocity for reaching dosing of about 0.025 ml/min, was used.

As a measure of wear resistance is determined and used volume of the wear track on the disc. The wear track cross-sectional area is analysed from measured profile for each disc alone. The volume is calculated from this area. After that the average volume is calculated for one group of specimens. The profile measurements of the tested specimens (FIG.4) were carried out using a specially adapted assembly. To determine the vertical position of points on the disc was used the digital drift sight MAHR EXTRAMESS 2001, with the sensitivity of  $0.2 \mu\text{m}$ , placed in a sufficiently stiff stand. A positioning cross-table (ZEISS), containing a make-up piece (in which the disc was inserted), served for the disc shifting. The cross-table is movable in two axes by means of two micrometric screws. The shifting sensitivity is  $0.01 \text{ mm}$ . Measured data were registered in a table prepared in advance.

The Experiments were carried out on the top quality testing system MTS 858 MINI BIONIX placed in "Laboratory of Biomechanics" at the Czech Technical University in Prague, Faculty of Mechanical Engineering, Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics.

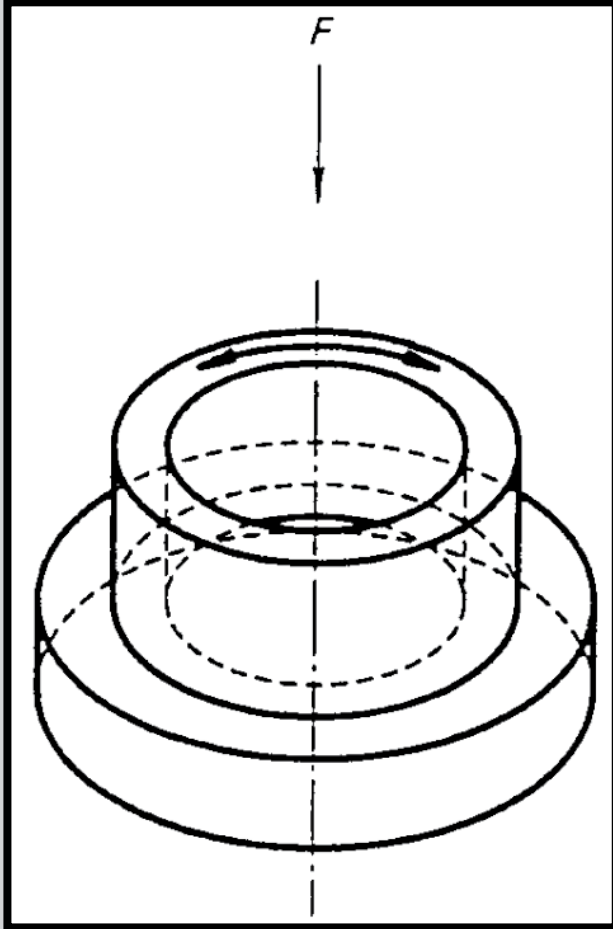


FIG.2. Schematic diagram.

The outer diameter of the ring is 20 mm, inner diameter is 14 mm. Thickness of the ring is 6 mm. The diameter of the disc is 25 mm and thickness is 6 mm. There is the geometry of ring and disc test pieces with definition of necessary dimensions on the picture (FIG.3).

**Results**

The evaluation of the wear resistance was addict on the pertinence of different type of biomaterials and modification of UHMWPE. Totally the tests were executed in "Laboratory of Biomechanics" with 6 groups of specimens from different materials. There were 5 tested pairs in each group (means  $5 \times 5 \times 100$  hours of testing). The final parameters obtained in these tests - the wear volumes - were calculated

(TABLE.1). The comparison of different combinations of biomaterials used for implants can be implemented from this analysis.

**Conclusions**

We obtained the objective information about wear resistance for 6 combinations of different biomaterials and their modifications. The resulting wear volume indicates the amount of elements that are loosening during loading of the bone substitute implant in human body and describes one from the mechanical properties.

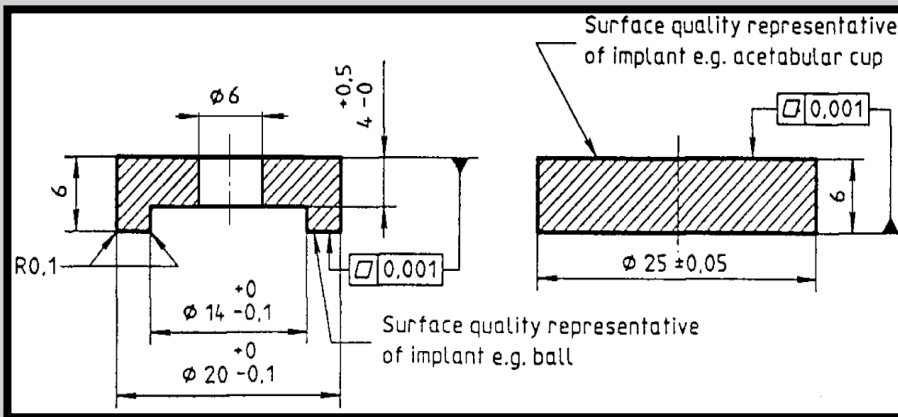
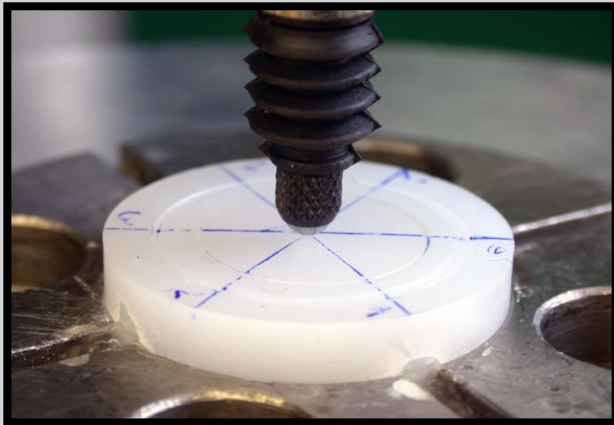


FIG.3. Geometry of ring and disc test pieces with dimensions.





**FIG.4.** The UHMWPE disc No. 1 after finishing the test.

Material of RING	Material of DISC	Wear volume [mm <sup>3</sup> ]
Zirconia ceramics (Y-TZP)	Alumina ceramics	0.16
Vitalium alloy (Co-Cr-Mo)	Irradiated UHMWPE (crosslink) – 100 kGy	4.78
Vitalium alloy (Co-Cr-Mo)	UHMWPE (no crosslink)	5.51
Alumina ceramics (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Pressed UHMWPE	5.62
Titanium alloy (Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V) with DLC	UHMWPE	6.61
Zirconia ceramics (Y-TZP)	PEEK (PolyEtherEther-Ketone)	7.59

**TABLE 1.** Final parameters of mechanical testing.

We found out the worn volume on the UHMWPE modified by crosslink is less than on the UHMWPE without modification and less than other combinations of biomaterials too. The results show the modification by crosslink is for UHMWPE material useful. Only wear resistance of combination ceramics x ceramics is better, but this combination is only theoretical and is used for comparison. For next development it is purposeful to finish tests with other bone-substitute materials and increase the database with wear resistance evaluation.

## Acknowledgements

*This research has been supported by the Ministry of Education of Czech Republic project No. MSM 6840770012.*

## References

- [1] Sedlacek, R., Rosenkrancova, J.: In: Bioceramics - 16, International Society for Ceramics in Medicine (ISCM), Porto, Portugal, 2003, p. 703.
- [2] Sedlacek, R., Rosenkrancova, J.: In: 13th Biennial Conference for the Canadian Society for Biomechanics, Canadian Society for Biomechanics, Halifax, Nova Scotia, Canada, 2004, p. 178.
- [3] Sedlacek, R., Rosenkrancova, J.: In: 20th Danubia-adria Symposium on Experimental Methods in Solid Mechanics, Scientific Society of Mechanical Engineering, Győr, Hungary, 2003, 164.
- [4] Sedlacek, R. Vondrova, J.: In: Proceedings of the 5th European Symposium on Biomedical Engineering, Patras, Greece, 2006, p. 08.

# STRUCTURE AND PROPERTIES OF CERAMIC GRAFTING MATERIAL

T.M. ULYANOVA<sup>1</sup>, L.V. TITOVA<sup>1</sup>, V.L. EVTUKHOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF GENERAL AND INORGANIC CHEMISTRY, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, MINSK, BELARUS

<sup>2</sup> BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS

E-MAIL: ULYA@IGIC.BAS-NET.BY

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 4-5]

## Introduction

The problem on developing bone substitutes consists in difficult imitation of a chemical composition, micro- and macrostructure as well as in provision of physical-mechanical, electrical, and other properties of a material that would promote the renewal of normal metabolism processes in living cells. At present endoprosthetics uses various materials but their properties much differ from those of the bone [1, 2]. Use of the bone tissue itself as an implant is not always possible because of the protein biocompatibility. As a result of this, the transplanted implant is rejected and loses its mechanical properties [3]. However, a new approach is possible to search and develop an artificial implant. It means the preparation of a biocompatible, slowly resolved material and its replacement by the living bone tissue due to natural regeneration of the cells of bone substance. Optimal compositions and the structure of such materials are being sought at the Research Centers of some countries and Belarus too. The present work is devoted to preparing a porous grafting ceramic material and to performing medical-biological experiments on it.

## Methods

Samples of porous implants were fabricated from natural compounds containing calcium and phosphate as well as magnesium phosphate and calcium carbonate admixtures. Heat treatment was made within a special step-by-step regime involving isothermal annealing. Moulding and mechanical processing were conducted at certain stages. For the influence of the heat treatment temperature on the structure and properties of porous ceramics to be studied, the implant samples were annealed in air over the temperature range 300-1400°C, their crystal and porous structures as well as the physicochemical and mechanical properties were examined. The X-ray and IR spectroscopic methods were adopted to investigate the phase composition. The morphology of the sample surface was studied with the use of the scanning electron microscope and the sections of the bone and muscle tissue dyed with hematoxylin and eosin, with the use of the optical microscope. The physicochemical and mechanical properties were determined by the standard methods.

## Results

As observed in the IR spectroscopic and X-ray phase analysis, the porous ceramic material annealed at 1000°C is a complex calcium-phosphate compound containing OH-groups. When thermally treated, the porous structure of calcium-phosphate ceramics and its properties change. After heat treatment of the material within 300-700°C the

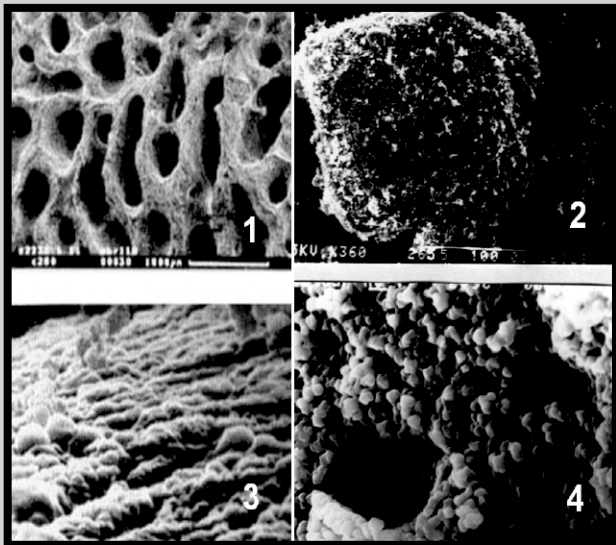
pore sizes are 500-1000  $\mu\text{m}$ , and as the annealing temperature increases up to 1200-1400°C they decrease up to 40-300  $\mu\text{m}$ . The porous structure of the dividing walls between the macropores changes, too. The electron microscopic study of the microstructure of the material surface shows that deep micropores are present in the dividing walls between the macropores of the samples having an annealing temperature of 700°C. At 900°C the spherical particles, i.e. globules are formed, followed by the formation of micropores. As the temperature elevated up to 1000°C the globules sintered into elongated conglomerates and the macropores were formed. After 1200°C annealing the material represented the sintered particles with a developed surface and slotted pores.

The mechanical and physical-chemical properties of the material changed depending on the heat treatment temperature (500-1100°C). The density increased from 1.0 to 2.0  $\text{g}/\text{cm}^3$ , the strength under compression increased 3.5-4 times while the porosity decreased from 70 to 45% and specific surface - from 52 to 1.5  $\text{m}^2/\text{g}$ , respectively.

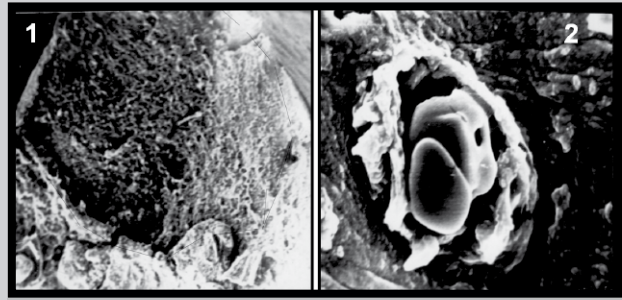
To perform medical-biological studies the porous calcium-phosphate samples were chosen, from which experimental implants were fabricated in the form of 6x4x2 mm plates, whose strength was not below 6-10 MPa and whose porosity amounted to 37-40%. The implant samples were transplanted into the defect places drilled in the rabbit's mandible. In control group the bone defects were filled with blood clot. In 7, 14, 21, 30 days and 6 months the animals were taken out of experiment, and bone and soft tissue near and inside the defects were examined.

## Discussion

The obtained results have revealed that the implant is characterized by two levels of pores: macropores 300-400  $\mu\text{m}$  in size in the material volume as well as by micro- and transient pores up to 100 nm located over the material surface of the dividing walls. The experiments have supported that in 14-21 days at the implant - cortical or spongy bone boundary the muscle and bone tissue gradually germinates into the implant holes.



**FIG.1. Microstructure of block material - 1, granule - 2, wall between macropores in block - 3 and in granule - 4, (SEM images: 1 and 2 – 500x, 3 and 4 – 10000x).**



**FIG.2. The porous implant into bone defect (dark part in center) - 1, and protein substance into macropore of implant - 2. (SEM-images: 1 – 75x, 2 – 1000x).**

The formation of protein substance in the samples of the calcium-phosphate implants being in contact with the bone for 21 days developed so intensely that it was impossible to separate the implant from the bone, not disturbing its completeness. New formations on the ceramic material side and vessel fragments were seen on the bone side. After decalcification some part of the implant dissolved, the albuminous substance and forming trabeculas of the bone were preserved on the implant surface and in its porous volume. The study of the samples transplanted into the rabbit's mandible and being there for 30 days pointed not only to the presence of contact but also to the formation of a new bone at a place where the implant is transplanted. No inflammation at the contact place of the bone and the implant was observed for all experimental times. In 6 months, a new bone tissue was formed in the rabbit's mandible at the defect place, and the implant was resolved partially. This fact was confirmed by the results of the visual and microscopic investigations.

## Conclusions

The developed grafting material is compatible and promotes the bone regeneration process.

## Acknowledgements

*This work was supported by the Byelorussian Republic Fund of Fundamental Researches, project No X07K-063.*

## References

- [1] Williams D.F., Rouf R.: Implants in Surgery. Moscow: Medicine, (1978).
- [2] Knets J.V., Bonina L.V., Filipenkov V.V.: Ultra-high molecular polyethylene and hydroxyapatite based materials for replacing bone tissue. J. Mech. Composite Materials, 29, (1993), 240-250.
- [3] Lopatto Yu.S.: Carbon - based implants, in book: Modern Problems of Biological Systems in Pathological States. Riga: Zinatne, (1998), 106-134.

# STATIC FINITE ELEMENT ANALYSIS OF LOWER LIMB

LUKAS ZACH, SVATAVA KONVICKOVA, PAVEL RUZICKA

LABORATORY OF BIOMECHANICS  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, CTU IN PRAGUE  
TECHNICKA 4, 166 07 PRAHA 6, CZECH REPUBLIC  
LUKAS.ZACH@FS.CVUT.CZ

## Abstract

*This paper deals with a simulation by means of finite element method of a natural lower limb after a knee joint arthroplasty in a full extension. Our last static model serving as a starting point for our future dynamic analysis is presented now. Aside a total knee endoprosthesis Medin Modulár provided by MedinOrthopedics, a.s., two long bones, femur and tibia were used. Compared with our former results, this model gives reduced stress and contact pressures values which were given by more realistic ankle and hip joint definition. Their distributions also correspond better the experimental findings.*

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 6-7]

## Introduction

In this paper we publish our last finite element model dealing with a total knee joint replacement under a load in a full extension (a one leg stance). It follows our previous published research [1-3].

Finite element (FE) is commonly used in mechanics but in biomechanics, using FEA means to undergo many compromises and simplifications. All these simplifications have to be reasonable and must take into account as many tissue characteristics as possible. With respect to this fact we are trying to set up a valuable finite element analysis serving for total knee joint development and verification. A next step is already to introduce a dynamic model driven by forces in main lower extremity muscles.

As for the presented work, some differences between the former and the current model are evident. The first one is a replacement size and the second one is changes in boundary conditions. These modifications are necessary due to our goal to create a complex model of a lower limb with the implanted total knee replacement [4]. This complex model would serve to analyze the current knee replacements and also to keep on development of zirconia femoral component already designed, implanted and tested (even *in vivo* experiences have been made) [5].

## Materials and methods

For our nonlinear static analyses, solved in Abaqus CAE, a size 76 of a knee endoprosthesis Medin Modulár (produced by Medin Orthopedics, a.s.) have been chosen to fit the best a femoral and a tibial bone of a male cadaver reconstructed from CT scans provided by a National Library of Medicine, Visible Human Project [4,6]. For future analyses we also implemented into the model a pelvic bone. It has been taken from a model library of the BEL Repository, managed by the Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna, Italy [7]. The collected model served for designing the mechanical axis of the leg. It was positioned regarding positions of several anatomic points (FIG.1). This assembly served for a mesh generation in presented model.

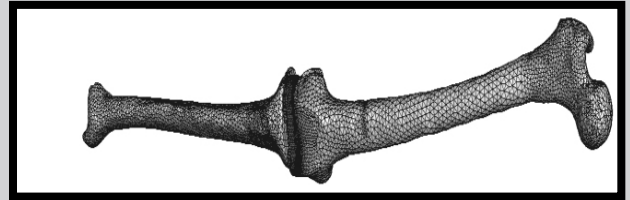


FIG.1. Lower limb geometric model.

The Medin Modulár endoprosthesis itself is made up of several parts to cover several operation demands but for our model we used only its three main components, i.e. a metal femoral component and a tibial component, which consists of a plastic tibial plateau and a metal tibial tray (FIG.2).

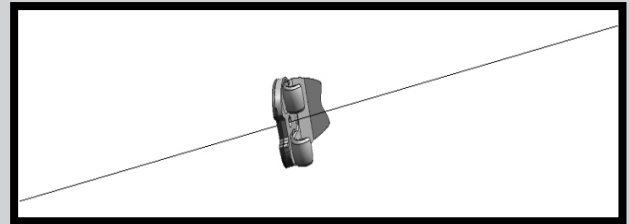


FIG.2. Analyzed assembly of the TKR.

Position of the TKR on the corresponding bones has been made on the basis of the formerly designed mechanical axis. We respected producer's recommendations to a surgeon concerning an endoprosthesis implantation which arise in fact from the mechanical axis direction.

Having already the replacement well positioned on the mechanical axis as well as on the bones we used the mechanical axis for a load application.

Despite of some mechanical tests made in our laboratory with all common materials used for the TKR production, former isotropic homogenous material models remain the same as before [1-3] in order to be able to see the difference between the analyses results (TABLE 1). The metal components behave according to Hook's law; the tibial plateau is defined as an ideal elasto-plastic material.

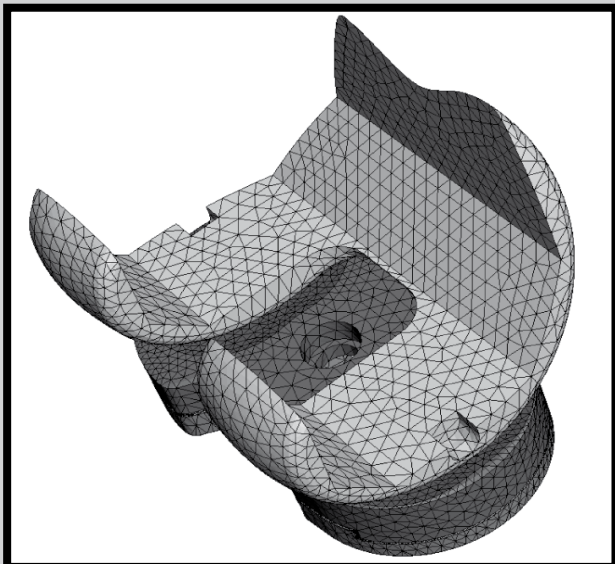
As mentioned above, some changes were applied in case of boundary conditions. The main modification compared to previous models is a use of so called reference points which were placed approx. in centers of a hip joint and an ankle, lying on the mechanical axis. These points allowed a more realistic definition of boundary conditions. Aside the proximal-distal shift allowed already in former models, there was allowed the rotation of the femoral component around the antero-posterior axis going through the reference point in the center of the femoral head and the rotation around the mechanical axis, the tibial component could rotate around the mediolateral axis defined in the center of the ankle. Since there were not yet implemented muscles and ligaments into the current FE analysis, the mechanical axis (represented by both reference points defined on its proximal and lateral end) served also for a load direction definition; the force of 2100 N was applied in a center of a "femoral head", in the reference point in fact, already specified.

There was defined only one contact in the analysis. Between the both articulating parts of the knee joint replacement the contact was solved as a "hard-contact" with a coefficient of friction equaled to 0.1. There was defined in fact another contact; it was the one between the tibial plateau and the tibial tray which was supposed to be a tied contact.

Entity	Young's modulus / elasto-plastic model definition [MPa] / [MPa] [%]	Poisson's ratio
Femoral component	113000	0,342
Tibial plateau	820/ $\sigma=21... \epsilon=0, \sigma=35... \epsilon=3$	0,44
Tibial tray	113000	0,342
Bones	14000	0,36

**TABLE 1. Material properties.**

A mesh was created semi-automatically using tetrahedral elements. See a FIGURE 3 for detailed view of the TKR assembly.



**FIG.3. Detailed view of the mesh of the TKR assembly.**

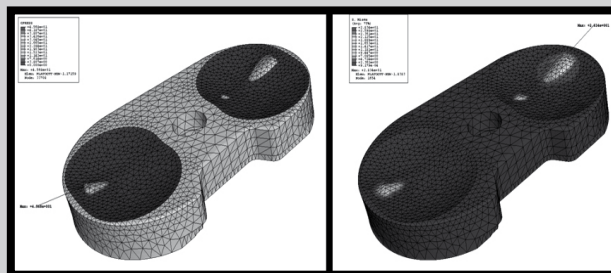
## Results

As the weakest part of the endoprosthesis using UH-MWPE plateau is the plateau itself, only results for a tibial plateau are published; it means contact pressure between tibial and femoral component and stress field on the plateau are presented. Magnitudes of contact pressures and stresses and even their distributions can significantly change a lifespan of the replacement.

Firstly, the contact pressure results between a femoral and a tibial component can be seen in the FIG.4. As for a magnitude, maximum value of approx. 46 MPa occurred on a medial side. The value corresponds with our experimental findings (using special contact films). In comparison to our former analyses, this magnitude is lower due to different boundary conditions matching better the reality.

In the matter of stress values and distributions (FIG.5), the highest value (28.5 MPa), slightly under the contact surface, was calculated under an impact of a lateral condyle, but as well as for the contact stress there is not a big difference between the results on the lateral and the medial side. The maximal values on both condyles are slightly under the contact surface.

At first glance, the contact area which occurred on the medial side of the lateral condyle could seem quite strange but a specially designed shape of the contact surface in this region (as well as the lateral area of the medial condyle) serves for better stabilization of the artificial knee lacking some important natural ligamentous stabilizers.



**FIG.4. Contact pressure results between the femoral component and the tibial plateau [MPa].**

**FIG.5. Stress distribution (HMH) on the surface.**

## Conclusions

Since Laboratory of Biomechanics participates among others on a development of a zirconia knee joint endoprosthesis, already constructed and even implanted, our aim is to introduce a valuable complex lower limb model serving for farther innovation of this implant.

Main advantages of a presented model are obvious. Since there are not yet any muscles and ligaments in the model, simplified model showed the right choice of a use of a mechanical axis for boundary condition definitions. A femoral and a tibial part could move around the corresponding reference points defined on both ends of the axis independently. These findings will be useful soon as well as results of the presented analysis. Dynamic model of the lower limb, taking into account the influence of muscles and ligaments is being prepared and it will be compared with these simpler models. In our opinion, no relevant comparison of the finite element analysis (FEA) results could be done with other authors analyzing the knee endoprosthesis by means of the FEA because of different design of the replacements.

## Acknowledgements

*This research is supported by a grant of Ministry of Education of the Czech Republic: MSM 6840770012.*

## References

- [1] L. Zach, S. Konvickova, P. Ruzicka, "FEM model of the total knee replacement – stress analysis (part 1)," in Proceedings of the Workshop of Applied Mechanics 2004, Prague, June 2004, pp. 360-368.
- [2] L. Zach, S. Konvickova, P. Ruzicka, "FEM model of the total knee replacement – stress analysis (part 2)," in Summer Workshop of Applied Mechanics - Book of Abstracts [CDROM], Prague, June 2005, pp. 149-155. ISBN 80-01-03200-0.
- [3] L. Zach, S. Konvickova, P. Ruzicka, "FEM model of the total knee replacement – stress analysis (part 3)," in Winter Workshop of Applied Mechanics - Book of Abstracts [CDROM], Prague, February 2006, pp. 26-28. ISBN 80-01-03455-0.
- [4] L. Zach, S. Konvickova, P. Ruzicka, L. Cheze "Geometrical model of Lower Extremity," in Summer Workshop of Applied Mechanics - Book of Abstracts [CDROM], Prague, October 2006, pp. 136-137. ISBN 80-01-03453-4.
- [5] L. Zach, S. Konvickova, P. Ruzicka, "Finite element analyses and other tests of ceramic knee joint replacement (WDM system)," in Proc. IFMBE [CDROM, Prague, 20-25 November 2005, vol. 11. ISSN 1727-1983.
- [6] National Library of Medicine, Visible Human Project [Online], [http://www.nlm.nih.gov/research/visible/visible\\_human.html](http://www.nlm.nih.gov/research/visible/visible_human.html)
- [7] Viceconti, "Visible Human Male - Bone surfaces," From The BEL Repository [Online], Available: <http://www.tecno.ior.it/VRLAB/>.

# CLINICAL AND HISTOLOGICAL RESULTS OF ACUPUNCTURE INFLUENCE ON ACUTE PYO-INFLAMMATORY PROCESSES DEVELOPEMENT IN SOFT TISSUES. EXPERIMENTAL CASE

Y.M. KAZAKOVA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA,  
E.I. PARHOVTCHENKO

BELARUSSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS,  
BELARUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS  
PUSHKIN AV. 33 – 239; PO BOX 190;  
220092 MINSK, BELARUS  
E-MAIL: IP-C@YANDEX.RU

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 8-9]

## Introduction

Last years, quantity of acute pyoinflammatory diseases in maxillofacial area is increasing, complications become more frequent, as a result specialized clinics functioning is very intensive [6]. This pathology consists 27,2%-61% of total amount of patients [3] and 10–20% of patients in specialized clinics [2,9]. According to the information presented by Chair of Cranio-Maxillofacial Surgery [4,5] they performed 5063 operations during 2000–2005 years, 78,7% operations performed in case of emergency. Considerable part of urgent operations was presented by phlegmons – 36% (mouth floor - 25%, peripharyngeal space - 5%, neck sides - 6%), mediastenitis - 1%. Augmentation of patients quantity with inflammatory complications is paradoxically when quantity of specialists in stomatology increases, conditions for working become better, quality of materials and toolware becomes better, new medicines and modern technologies are applying [7,8].

Last decades, acupuncture was acknowledged by physicians of different specialties and scientifically proved to be widely used by public health services as well as in cranio-maxillofacial surgery [1,10]. Acupuncture treatment is effective, harmless, can be complementary with other medicines or replace pharmacotherapy and physical therapy.

Facts above confirm is necessary detailed studying of acupuncture effects on pyoinflammatory diseases development in human organism and maxillofacial region particularly.

## Aim of research

is to analyse histological results of acupuncture application in complex treatment of acute pyoinflammatory processes of soft tissues in experiment.

## Objects and methods

Experimental model of pyoinflammatory processes of soft tissue after operation was formed on 20 guinea pigs of the same weight, sex and age divided into two groups. I group consisted of 10 animals, underwent antibacterial therapy course and was group of control. II group consisted of 10 guinea pigs underwent antibacterial therapy course combined with acupuncute treatment. First variant of brake method was used for acupoint GI4 irritation by needle

№5. Exposure time was 40 minutes and treatment course consisted of 10 sessions performed every day. Every day we were taking care of experimental animals and checking postoperative wounds conditions. Tests for histological examinations were taken 24 and 48 hours postoperatively, 3,7,21 days later.

## Results

According to the clinical state of the 1st group of animals, inflammatory process was significantly weaker and finished by 7-8 day. The same results were achieved by 3-4 day for the animals of the 2nd group. Wounds cicatrix of the animals in the 2nd group were better aesthetically by 21 day after operation, there was no eschar, inflammation finished. A the same time, 40% of animals of group of control had inflammatory processes and eschar of the wound had 20% of animals.

There was difference between results of examinations with microscope 3 days after operation for animals of the I (FIG.1a) and II groups. (FIG.1b).

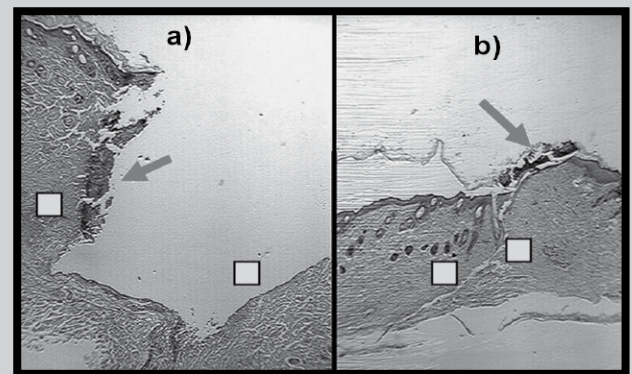


FIG.1. Morphological picture 3 days after operation. Stain with hematoxylin-eosin. Magnification x 125.

Wound chamber was cleaned from neucrotic dendrite, its edges were closer, a little of purulent discharge was found on the wound edges for the II-nd group of animals. Practically, there was no wound canal and it was a defect on the top part of the wound by 7 day for the II-nd group of animals. Scar tissue inside and epithalamus outside of the wound were forming (FIG.2a). Regarding the group of control, canal of the wound was reduced but its depth remained at the same time. Epithalamus was formed on the edges of the wound. There was a lot of neucrotic dendrite inside of the wound (FIG.2b).

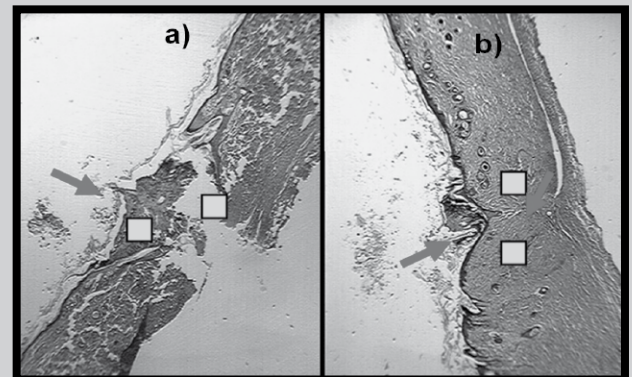
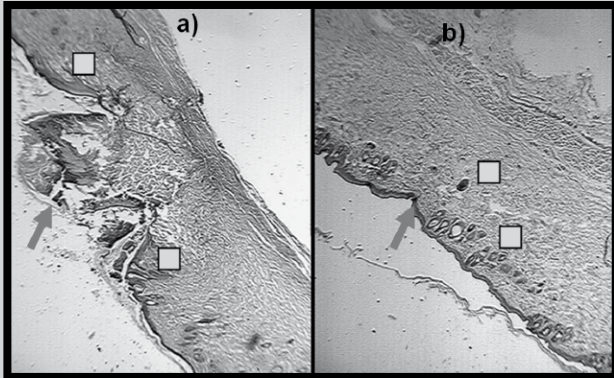


FIG.2. Morphological picture 7 days after operation. Stain with hematoxylin-eosin. Magnification x 125.

By the 21 day, wound canal was closed and epithalamus restored for the animals of the II group. There was no hair follicle at the place of the wound. The scar was not determined. At the place of the wound the coverlet was regenerated (FIG.3a). At the same period of time, the canal of wound was absent and epithalamus appeared on the wound edges in the group of control. Considerable quantity of neucrotic dendrite was on the surface of the wound, inflammatory reaction inside (FIG.3b).



**FIG.3. Morphological picture 21 days after operation. Stain with hematoxylin-eosin. Magnification x 125**

## Conclusion

Acupuncture has positive influence on the clinico-morphological characteristics of pyoinflammatory processes development in soft tissues. Acupuncture treatment could be advised for wide use in treatment of patients with septic complications in cranio-maxillofacial region.

## References

- [1] Avdeeva E.A. Examination of complex acupuncture treatment effectiveness in complex with rehabilitation procedures for patients with traumatic neuritis of trigeminus //Bul. Rus. med. university. Spec. issue «Math. Pirogovskaya stud. scient. conf.- 2004.- V.34.- №3.- P. 32.
- [2] Haritonov Y.M., Girko E.I. Kikov R.N. and oth. Pyoinflammatory and septic infection in maxillofacial area: diagnostics, treatment, complications prevention//Mat. of res. «Modern methods of prophylaxis, diagnostics and treatment of great diseases». Voronez, 1998.- P. 102-103.
- [3] Kubaev R.E., Shavazi N.M. Clinico-genialogical analyze of family tree of children with pyoinflammatory diseases of jaw //Med. scient. and stud.- method. journ.- 2001.- №3.- P. 152 – 158.
- [4] Pohodenko-Chudakova I.O., Kazakova Y.M. Frequency of pyoinflammatory complications of odontogenic etiology in soft tissues of lower jaw //Rus. stom. journ. – 2005.– №4.– P. 20–22.
- [5] Pohodenko-Chudakova I.O., Yanovitch G.V., Rudaya E.V. Optimization of intubation for patients with pyoinflammatory processes in maxillofacial region//Bul. of articles «Medicine of critic states. Perspectives, problems, decisions». Ekaterinburg: MZ Sverdlovskoy obl., NPRZ «Bonum», 2006.- P. 111–115.
- [6] Shargorodskiy A.G. Prophylaxis of inflammatory diseases of face and neck and complications meet in polyclinics //Works. VII Rus. Congr. of stomat. M., 2001. P. 126–128.
- [7] Supiev T.K. Pyoinflammatory diseases of maxillofacial area. M.: Ed «MEDpress», 2001, 160 p.
- [8] Surgical infections: guideline /Under red. I.A.Erohin, B.R.Gelfand, S.A.Shliapnikov. STp: Piter, 2003, 864 p.
- [9] Ushakov R.V., Tzarev V.N. Complex approach for antibacterial therapy in odontogenic pyoinflammatory diseases of maxillofacial area //Rus. stom. journ.- 2003.- №6.- P. 40–44.
- [10] Zivenko A.V., Zivenko E.A. Mechanisms of acupuncture influence on the coverlet regeneration and local thermomerty//Mat. III congress of maxillofacial surgeons of Belarus «Organization, prophylaxis, treatment and rehabilitation in maxillofacial surgery». Vitebsk: VGMU, 2007.- P. 84–87.

## RESULTS OF LASER ACUPUNCTURE INFLUENCE ON LOCAL CLINICAL AND LABORATORY INDICES AFTER DENTAL IMPLANTATION IN EXPERIMENT

A.P. PILIPENKO, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA

BELARUSSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS,  
BELARUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS,  
PUSHKIN AV. 33 – 239; PO BOX 190;  
220092 MINSK, BELARUS  
E-MAIL: IP-C@YANDEX.RU

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 9-10]

## Introduction

Last decades, method of dental implantation is widely used as well as other methods of special dental care applied by cranio-maxillofacial surgeons and orthopedist in Belarus [8,10]. Osteointegration is a process undergoing changes and not something stable [2]. Many factors influence on implant osteointegration: state of bone, implant characteristics, operation itself, quality of prosthesis in the future. In special medical literature they say that all processes taking place in head, neck regions, oral cavity influence on quantitative and qualitative indices of oral fluid [3,11,12]. Latrogenic injury of bone tissue has place during operation for dental implantation as well as aseptic inflammation which activate regeneration processes or can provoke tissue lyses [4,9]. Meanwhile, the longer and well-defined postoperative inflammatory process, the better direct and long-terms results for dental implantation operation [13]. At the same time inflammatory and destructive processes of the oral cavity influence on the change of pH level of biological medium of the oral fluid [5]. Achievements of modern medicine let to form more favorable conditions for broken bone tissue regeneration with medicines, treatment by laser and acupuncture [7,11]. But there is no information in special medical literature about results of laser acupuncture influence on pH of oral cavity after operation of dental implantation in experiment.

## Aim of the work

is to study laser acupuncture influence on pH of natural biological medium of oral cavity after dental implantation.

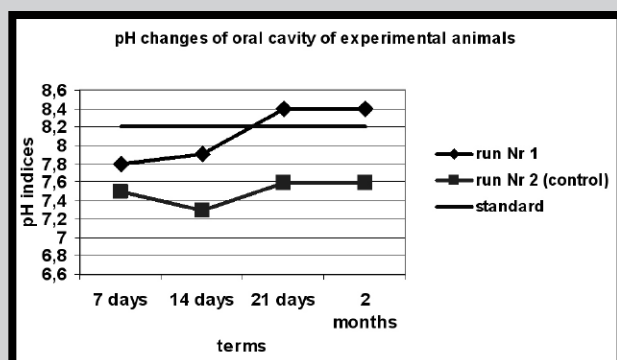
## Objects and methods

Rabbits were chosen for experimental model. We observed 40 males at the age 7-8 months, weight 2,8–3,2 kg. Experiment consisted of two runs, 20 animals per run. Dental implantation was performed after right central lower incisor extraction for all animals. Transplant bed was formed with drill point of increasing diameter in the alveolar socket of the extracted tooth. Drill point was cooled with salt solution. Than tap was screwed and titan implant Verline was fixed. The wound was treated with 0,05% solution of chlorhexidine bigluconate and closed with polyglycolipid 4-0 layer by layer. Sutures were treated with 1% solution of brilliant green. Operations were performed with general anesthesia application of 10% solution of thiopental sodium intra-abdominally and infiltration anesthesia applica-

tion in soft tissues of the operative field with Sol. Lidocaini 2% - 2 ml.). Animals underwent antibacterial therapy course with 30% lincomycine solution during 5 days postoperatively. Immediately after operation, they done injection of Analginum 50% - 2 ml. + Dimedrolum 1% - 1 ml. First run consisted of 21 animals. Antibacterial therapy treatment combined with laser acupuncture course by acupuncture needle (patent of Republic of Belarus № 924) which irritate acupoint and do mechanic influence at it at the same time was applied for animals. Acupoint LI4 was irritated. Acupuncture treatment course consisted of 10 sessions performed ever day. Consistence of luminous flux was no more than 5 mW/cm., time of exposure 10 seconds. Second run consisted of 21 rabbits received antibacterial therapy course only. It was run of control. pH level of habitat of oral cavity of experimental animals was examined with test-paper (Lachema, Prague). Test-paper was put into rabbit oral cavity for 30 seconds, than it was compared with standard (pH from 0 to 12). Examinations were performed before operation, 7,14,21 days and 2 months after operation.

## Results

We have studied normal pH level of oral fluid for rabbits immediately before operation. Indices of pH were in range between 7,5 - 9, average indices were  $8,2 \pm 0,2$ . Seven days later, rabbits of the first run had pH level  $7,8 \pm 0,3$ , rabbits of the control run had that indices as  $7,5 \pm 0,1$ . Rabbits of the control run had tissue inflammation in 100% of cases and 15% of tissue inflammation for rabbits of the first run. pH indices of oral fluid of the run of control were  $7,3 \pm 0,1$ , rabbits of the first run -  $7,9 \pm 0,2$  ( $p < 0,01$ ), by 14 days. But, graft rejection had place for 10% of rabbits of the control run and there was no rejections for the first run rabbits. That indices was  $7,6 \pm 0,2$  for rabbits of the control run and  $8,4 \pm 0,4$  ( $p < 0,05$ ) for the rabbits of the first run, 21 days postoperatively. That time, only 5% of rabbits of the first run had tissue inflammation. Graft rejection had place for 15% of the control run and there was no rejections for the first run rabbits by 21 days after operation. We received the same results two months later. Dynamics of pH of oral cavity for experimental animals see on the FIG.1.



**FIG.1. Dynamics of pH of oral cavity for experimental animals.**

Therapeutic effect after laser acupuncture application could be explained by common and local reactions of the human body. Increasing of nonspecific humor factors of protection, common leucocytes reaction, phagocytal activity of micro- and macrophage systems, stimulation of marrowy blood circulation consisted common effect. Local effect is influence of radiation on the main elements

of inflammatory reaction: exudation, alteration, proliferation, and on metabolism intensity, biosynthetic processes, cells resistance when damage. Laser acupuncture is positive for membrane structures, increase tissue ferments activity: acid and alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, L-glycerophosphatedehydrogenase; accelerate oxidation-reduction reactions, extend functional activity of protein, stimulate glycogen synthesis. Its activate process of injured tissues vascularization, provide tissues with nutrients and oxygen, prevent stagnation formation. Lymphoid tissue is activating, granulation is growing. Perifocal inflammation is becomes weaker, oxygen consumption increases. Those mechanisms correspond to the Ahmetov's (1991) and Naumovitch's (2000) works [1,6].

## Conclusion

Results we received confirm necessity and expediency for further study of laser acupuncture influence on homeostasis of oral cavity and osteofusion in the system jaw – dental implant in experiment and clinic.

## References

- [1] Ahmetov N.U. Mechanisms of treatment effects of eastern acupuncture.- Kazan, 1991.- 304 p.
- [2] Alejnikova E.V., Shabanovitch A.B. Modern conception of osteofusion of dental implants //Med. journ.- 2006.- Vol.18.- №4.- P. 26 – 28.
- [3] Kazakova Y.M. Oral fluid microcrystallization changes for patients with pyoinflammatory diseases in maxillo-facial area during standard treatment //Bull. scient. works «Young scientists researches». Mn.: BSMU, 2005.- P. 59 – 63.
- [4] Lehmann B., Bragger U., Hammerle C.H. et al. Treatment of an early implant failure according to the principles guided tissue regeneration //Clin. Oral Imp. Res.- 1992.- Vol.3.- №1.- P. 42 – 48.
- [5] Leontiev V.G., Galiulina M.V., Ganzina I.V and other. Change of structure characteristics of saliva when pH changes //Stomatology.- 1999.- Vol.78.- №2.- P. 22 - 24.
- [6] Naumotitch S.A., Dosta A.N. Experimental basis for CO<sub>2</sub>-laser application in compactostectomy //Thes. rep. intern. Scient-pract. conf. young scient «Actual questions of clinical and exoerimental medicine – 2000». Mn., 2000.- P. 233.
- [7] Naumovitch S.A. Complex treatment of teeth anomalies and deformations for formed bite with laser therapy //Bull. scient. works. «New technologies in modern medicine». Mn.: BelZNMi, 1999.- Iss. 3.- P. 299 – 303.
- [8] Naumovitch S.A., Homitch A.F., Sharanda V.A. Orthopedic treatment for patients with dental implants application: Teach. – metod. manual. Mn.: BSMU, 2005 – 36 p.
- [9] Ossipenko A.V., Tcherechnev V.A. Immune and biological mechanisms of tissue regeneration.- Ekaterinburg: RAS Uralskoe otd. Inst of ecology and genetics of microorganisms, 1997.- 130 p.
- [10] Paraskevitch V.L. Dental implantation: Basis for theory and practice: scient.-pract. manual. Mn.: OOO «Unipress», 2002.- 367 p.
- [11] Pohodenko-Chudakova I.O. Comparative appreciation of dynamics of oral fluid microcrystallization for patients with traumatic fractures of lower jaw underwent standard treatment and rehabilitation with acupuncture //Stom. for all.- 2005.- V.31.- №2.- P. 10 – 13.
- [12] Timofeeva A.A.. Crystallographic method for saliva study during odontogenic inflammatory diseases of jaw //Stomatology.- 1987.- V.60, №3.- P. 15 - 17.
- [13] Ushakov R.V., Tzarev V.N. Prophylaxis of postoperative inflammatory complications during intraosteal dental implantation with medicines Elugel, Eludril, Elgidium containing chlorhexidine //New in stomatology.- 2003.- №6.- P. 96 – 98.

# RESULTS OF ACUPUNCTURE IN COMPLEX THERAPY FOR PATIENTS WITH ACQUIRED DEFECTS OF LOWER JAW ON THE ORAL FLUID MICROCRYSTALLIZATION FINDINGS

I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, A.O. SAKADYNETZ

BELARUSSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS,  
BELARUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS,  
PUSHKIN AV. 33 – 239; PO BOX 190;  
220092 MINSK, BELARUS  
E-MAIL: IP-C@YANDEX.RU

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 11-12]

## Introduction

Last years quantity of traumatic fractures of lower jaw increased and is in range from 67,4% to 85% as well as quantity of that bone neoplasm [4,10]. In spite of successful crano-maxillofacial operations for tumor defects of lower jaw replacement with allogenic orthotopic transplants, problem of graft rejection while and after treatment and rehabilitation procedures, remain actual [1,8]. It deals with patients whose lower jaw was to be restored after gunshot wound and transplantation is to be performed when scars of soft tissue changed and blood flow is also changed. We found informations in special medical issues that human body resistance level is very important for effectiveness prophylaxis procedures of described above complications as well as patients providing with goods conditions for posttraumatic reparative bone tissue regeneration [11].

Ordinary treatment of pathology mentioned above is impossible because of allergization of population, increasing number of cardiovascular diseases, not wide application of physiotherapy procedures. So, is necessary to elaborate new system of rehabilitation procedures for those patients. Special medical literature says that acupuncture treatment could be used for normalization of homeostatic balance of human body for patients with somatic and crano-maxillofacial diseases [5,7].

Our days, great attention is paid for studying of human body medium (blood serum, oral fluid) in osteogenesis. According to different articles, microcrystallization of oral fluid is more informative index of homeostasis. Many researchers fixed that index change for patients with crano-maxillofacial diseases [2,9]. Facts above confirm subject of this research is important.

## Aim of research

is to study how microcrystallization indices of oral fluid for patients with acquired defects of lower jaw are changing while postoperative treatment combined with acupuncture.

## Objects and methods

We examined 35 patients at the age of 27-48 years old with acquired defects of lower jaw, the bone was broken.

All patients were subjected into plastic operation with allogenic transplant. Patients of the I group (18 patients) have got ordinary treatment course postoperatively. Postoperative treatment of the patients of the II group (17 patients) was combined with acupuncture procedures. Group of control consisted of 30 healthy persons at the same age. All patients have got treatment course with antibacterial and anesthetic medicines, had careful dental care. The wound was pricked all round with solution which consists of suspension of 30 mg hydrocortisone, 30% lincomycin solution – 2 ml, 2% lidocaine solution - 2 ml. Patients were treated with «Osteogenone» 7 days after operation. After intermaxillary rubber tie is taken off, mechanotherapy was applied for lower jaw and temporomandibular joint care. We have stimulated the following acupoints for the patients of the II group: 1) general acupoints - LI4, LI10, LI11, St36, TH1, TH5, GB20, GV14, GV20, GV25, GV26, CV24; 2) local acupoints – LI18, St5, St6, St7, St44, SI18, SI19, TH4, GB37, GB40, GV1, GV28 and extrameridional acupoint PC18 [6]. Acupuncture procedures were applied for: 1) anesthesia course during the operation; 2) postoperative acupuncture course consisted of 10-12 sessions performed every day. Second sedative method was used for acupoints stimulation. Microcrystallization level was performed by methods of P.A. Leus (1977) [3]. First examination was performed when patients went in clinic, 2-nd – during first day postoperatively, 3-rd - 7 days after operation, 4-th - 14 days after operation, 5-th – 21 days after operation, 6-th - 1 month later, 7-th – 6 months postoperatively. Indices we collected during examinations were processed with method of calculus of variations.

## Results

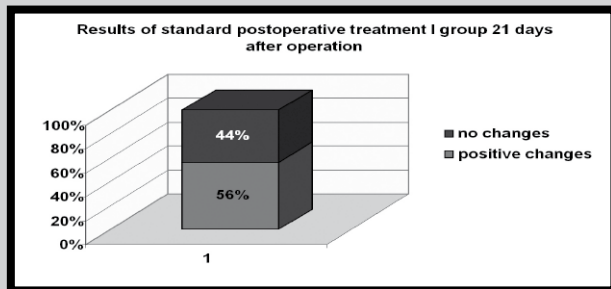
According to the received results we have concluded that indices of microcrystallization for patients of the I ( $2,2 \pm 0,2$ ) and II groups ( $2,1 \pm 0,1$ ) were different ( $p < 0,02$ ) from control indices ( $1,5 \pm 0,2$ ). Positive changes of indices  $1,8 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) were fixed by 21 day of treatment for 56% of patients receiving ordinary treatment course. There was no change of health for 44% of patients (FIG.1). Positive changes of indices of microcrystallization  $1,6 \pm 0,1$  ( $p < 0,001$ ) for II group patients was fixed by 14 days for 75 % of patients, by 21 days –  $1,52 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) it consisted 89% (FIG.2). Clinical tests confirmed marked indices.

First day after operation all patients had edema of soft tissue of cheek, parotid-masticatory and submandibular regions. We used drainage to get ichor from the wound. Bone and transplant mobility were not identified. Negative results had 44% of patients of the I group. These patients had tissue infiltration in the region of the wound by 7–10 days. There was ichor of big quantity in scar tissue than graft was rejected. Results were confirmed by indices of tests of microcrystallization in 100% of cases. Patients of the II group had no complications mentioned above what corresponded to indices of tests of microcrystallization in 89% of cases. These was no edema of soft tissue for that patients by 21 days and 1 month. Bone and transplant mobility were not identified.

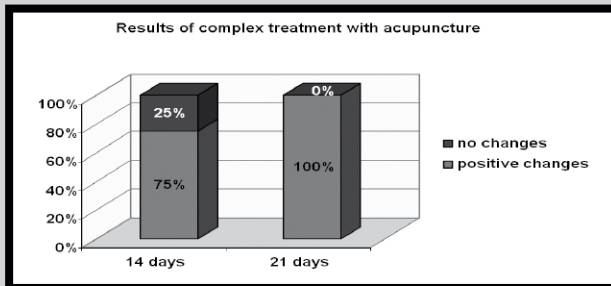
## Conclusion

Complex treatment including acupuncture stimulation is effective for patients with acquired defects of lower jaw after operation with allogenic orthotopic transplant. Acupuncture treatment could be advised for wide use in maxillofacial surgery.





**FIG.1. Ordinary postoperative treatment for patients of I group according to the microcrystallization indices of oral fluid by 21 days.**



**FIG.2. Postoperative treatment combined with acupuncture for patients of II group according to the microcrystallization indices of oral fluid by 14, 21 days.**

## References

- [1] Izmailov S.N., Lartzev Y.V. Treatment of skeleton bones fractures //Bulletin of traumatology and orthopedy by N.N.Pirogov.- 2001.- №3.- P. 33 - 35.
- [2] Kazakova Y.M. Oral fluid microcrystallization changes for patients with pyoinflammatory diseases in maxillofacial area during ordinary treatment //Bul. of scient. Research. «Researches of young scientists». Mn.: BSMU, 2005.- P. 59 - 63.
- [3] Leus P.A. Cliniko-morphological research of pathogeny and pathogenetic conservative therapy and caries prophylaxis: Abstract of thesis ... Dr of medicine: 14.00.21 /Mosc. med. stomat. Inst by N.A.Semachko.- M., 1977.- 30 p.
- [4] Ogundare B.O., Bonnick A., Bayley N. Pattern of mandibular fractures in an urban major trauma center //J. Oral. Maxillofac. Surg.- 2003.- Vol.61.- №6.- P. 713 - 718.
- [5] Pohodenko-Chudakova I.O. New fields for acupuncture application in maxillofacial surgery //Modern stomatology.- 2004.- V.28.- N3.- P. 25 - 26.[
- [6] Practical guide for acupuncture: Manual /D.M.Tabeeva.- 2-nd ed., corr. And add.- M.: MEDpress - inform, 2004.- 440 p.
- [7] Savtsova Z.D., Zaleskiy V.N., Orlovskiy A.A. Immunocorrective effect of lazer acupuncture for influenzal infection treatment in experiment //Mag. for microbiology, epidemiology and immunology.- 1990.- №1.- P. 75 - 80.
- [8] Soloviev M.M. Infectious and inflammatory complication for patients with lower mandible fractures and choice of optimal methods of fragments immobilization according to the biomechanical aspects: Abstracts. of thesis ... cand. of medicine: 14.00.21 /StPSMU by I.P.Pavlov.- StP., 2000.- 18 p.
- [9] Tchissov V.I., Konovalov A.N., Rechetov I.V. Tumours in cranio-maxillofacial region: new methods for surgical treatment and rehabilitation //Ros. oncol. mag.- 2002.- № 5.- P. 4 - 8.
- [10] Timofeeva A.A. Saliva during odontogenous inflammatory diseases of jaw studying by crystal method //Stomatology.- 1987.- V.60, №3.- P. 15 - 17.
- [11] Vovk V.E., Kadyseva I.V. Reasons of traumatic osteomyelitis development of lower jaw //Questions of stomatology.1992.- P.83.

## PROGNOSTIC CRITERIA FOR DEVELOPMENT OF CHRONIC ODONTOGENOUS SINUSITIS OF MAXILLARY SINUS

I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, A.V. SURIN

BELARUSSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS,  
BELARUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS,  
PUSHKIN AV. 33 - 239; PO BOX 190;  
220092 MINSK, BELARUS  
E-MAIL: IP-C@YANDEX.RU

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 12-13]

### Introduction

Last decades, diagnostics and treatment of odontogenous sinusitis of maxillary sinus are studying and improving. Aetiology, pathogeny, clinical characteristics and treatment methods are lighted well in medical literature. In spite of that quantity of patients with odontogenous sinusitis is not reducing. That disease makes up 3-7% of the total amount of surgical pathologies of maxillofacial area [8] and 5-12% of patients in stomatological surgical clinics [1]. Odontogenous sinusitis of maxillary sinus is its mucous tunic inflammation appearing from nidus of chronic odontogenous infection when patient has apex periodontium of upper bicuspid and bicuspid. Bone tissue is destroying for many patients with this disease and its layer between root apex of mentioned teeth and maxillary sinus become weak. Those circumstances as well as individual anatomic structure do the base for mouth floor perforation during operation on tooth extraction. Sometimes, they press the fang into maxillary sinus or under mucous tunic what form 33,1% of all sinusitis of maxillary sinus. I.O.Pohodenko-Chudakova and A.Z.Barmutskaya (2007) [7] analysed 146 cases histories for patients treated during 2005 - 2006 for iatrogenic complications. It is to underline foreign bodies of maxillary sinus were found for 81 patients. Filling material was found in 51,1% of cases, teeth and fangs - in 43,2%, implants - in 3,4%, drainage - in 2,3%. Infected foreign body in maxillary sinus causes chronic inflammatory process with polypus proliferation of mucous tunic in 54,4% of cases [9]. Sensitization of human body to the nidus of chronic odontogenous infection, allergic reaction and reducing of common body resistance provoke disease. At the same time, hard tooth tissues, maxillary bone tissue, soft mouth tissues are in dynamic balance with oral fluid. Arising and developing diseases of maxillofacial area can break human homeostasis what is confirmed by quantitative and qualitative indices of oral fluid, physical indices - microcrystallization. Many authors say about positive changes of microcrystallization indices during treatment of maxillofacial diseases [3,6]. In some manuscripts they say that test is informative for prediction of pyoinflammatory diseases development of odontogenous aetiology [2]. But there is no information regarding compative appreciation of effectiveness for integral leukocyte and microcrystallization indices application for prediction of development of chronic odontogenous sinusitis maxillary sinus.

## Aim of research

is to appreciate effectiveness of different methods prediction of chronic odontogenous sinusitis of maxillary sinus development.

## Objects and methods

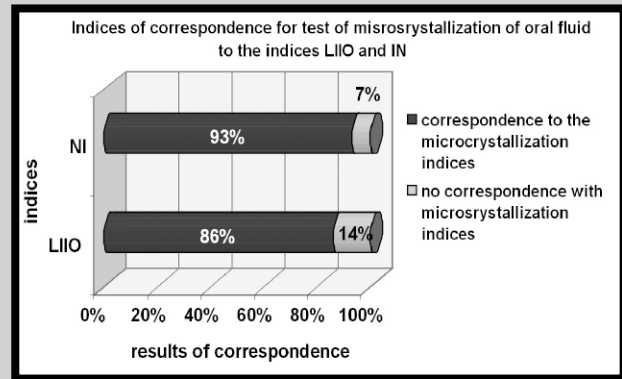
We have taken care of 60 patients at the age of 19 - 40 years old with chronic odontogenous sinusitis of maxillary sinus. Group of control consisted of 25 healthy persons of the same age. All patients had antiphlogistic course consisted of antibacterial, antihistaminic, nonsteroid antiphlogistic medicines, polyvitamins and physiotherapy courses. Doing examinations we have taken into consideration that common status of patients, some aspects of oral cavity could influence into biophysical indices of oral fluid. All patients had middle caries intensity, they had no diseases and traumas which demand rehabilitation course. There was no pathology of mucous tunic of oral cavity, palatine tonsil. Method by Leus (1977) [4] was used for specimens of oral fluid preparing. Leucocyte indices of intoxication by V.K.Ostrovskiy (LIIO) [5] and nuclear indices (NI) of intoxication G.A.Dashtajantz [10] were fixed for all patients. Those indices were studied in some examinations passed in different time: 1 examination — when patients went for the assistance; 2 examination — three days after beginning of treatment course; 3 examination — at the end of the treatment course. Method of variation statistics was used to check indices received during examinations.

## Results

Indices received during examinations showed authentic differences of integral leucocytes indices and indices of microcrystallization in respect of control. Stable positive changes were revealed during the treatment course for all indices. Changes of LIIO were authentic during 3<sup>rd</sup> examination  $2,2 \pm 0,1$  ( $p < 0,001$ ) to compare with initial indices  $3,1 \pm 0,2$ . Changes were also authentic of NI during 2<sup>nd</sup>  $0,1 \pm 0,01$  ( $p < 0,001$ ) and 3<sup>rd</sup> examinations  $0,07 \pm 0,02$  ( $p < 0,001$ ) in correspondence to the indices of the 1<sup>st</sup> examination  $0,15 \pm 0,01$ . The same indices were for microcrystallization of oral fluid for 2<sup>nd</sup>  $2,3 \pm 0,02$  ( $p < 0,001$ ) and 3<sup>rd</sup>  $2,1 \pm 0,1$  ( $p < 0,001$ ) examinations in correspondence with the initial indices  $2,5 \pm 0,06$ . Comparative appreciation of indices showed correlation of oral fluid indices microcrystallization and leucocytes indices of intoxication. No stable changes were evident for 24% of patients under examination after antiphlogistic therapy. Later those patients had radical surgery of maxillary sinus. Positive changes of microcrystallization of oral fluid were confirmed by LIIO for 12 patients (86%) and by results of NI for 13 patients (93%) during the 2<sup>nd</sup> examination (FIG.1).

## Conclusion

Test of microcrystallization of oral fluid is very informative for prediction of chronic odontogenous sinusitis development of maxillary sinus. That method is noninvasive, easy to be performed, cheap and is not necessary to have special knowledge, reproduced many times during the day long.



**FIG.1. Indices of correspondence for test of microcrystallization of oral fluid to the indices LIIO and NI.**

## References

- [1] Gubin M.A., Popkova N.A., Shevchenko L.V. Odontogenic sinusitis: diagnostics and treatment //Scient.-med. bulletin VMSA.- 2005.- №2.- P.3.- P. 12 – 15.
- [2] Kazakova Y.M. Changes of oral fluid microcrystallization for patients with purulent-inflammatory diseases in maxillofacial area during standard treatment course //Coll. scient. works «Researches of young scientists». Mn.: BSMU, 2005.— P. 59 – 63.
- [3] Larina M.V. Psychogenic factors of caries development risk for young people: Abstr. ... thesis. cand. of medicines, 14.00.21 – stomatology /GOU VPO «Bashkirskiy State Medical University of Federal Agency for health and social development». – 2006. – 22 c.
- [4] Leus P.A. Clinic and experimental research of pathogenesis and pathogenetic conservative therapy and caries prophylaxis: Abstract. thesis. ... doctor of medicine: 14.00.21 /Mosk. med. stom. inst named by N.A.Semachko.- M., 1977.- 30 c.
- [5] Ostrovskiy V.K., Svititch Y.M. Reductive formula of leucocytes index of intoxication for diagnostics of acute surgical diseases //Zdr. of Kazakhstan.- 1982.- №7.- P. 24.
- [6] Pohodenko-Chudakova I.O. Comparative appreciation of oral fluid microcrystallization changes for patients with traumatic fractures of lower jaw after standard treatment and after acupuncture treatment application //Stomalogie for all.- 2005.- V.31.- №2.- P. 10 – 13.
- [7] Pohodenko-Chudakova I.O., Barmutzkaya A.Z. Mistakes and complications during the treatment performed by dentists and maxillofacial surgeons our days //Works III Congress for cranio-maxillofacial surgeons of Belaruss. «Organization, prophylaxis, treatment and rehabilitation in cranio-maxillofacial surgery».- Vittebsk: VSMU, 2007.- P. 21 – 22.
- [8] Shulman F.I. Clinico-morphological basis of maxillary sinus treatment due to endodontic teeth treatment: Abstr. ... thesis. cand. of medicine, 14.00.21 – stomatology /Medical Academy for postgraduate education of St Petersburg. – 2003. – 19 p.
- [9] Supiev T.K. Pyoinflammatory diseases of cranio-maxillofacial region. M.: MEDpress, 2001.- 160 p.
- [10] Vasilkov V.G., Shikunova L.G., Kelina N.Y. and others. Systemic approach for analyzing physical state of patients and level of toxicosis postoperatively //Mat. of intern. conf. «Critical technologies in reanimation». M., 2003.— C. 13 - 15.

# THE STRUCTURE AND IMMOBILIZATION ACTIVITY OF POLYVINYLPIRROLIDONE CROSS-LINKED COPOLYMERS

OLEG SUBERLYAK, VOLODYMYR SKOROKHODA,  
NATALIYA SEMENYUK

LIVIV POLYTECHNIC NATIONAL UNIVERSITY  
BANDERA ST. 12, LVIV, UKRAINE;  
E-MAIL: SUBERLAK@POLYNET.LVIV.UA

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 14-15]

Relations between synthesis conditions, structure and sorption-desorption properties of polyvinylpyrrolidone cross-linked copolymers have been investigated.

The development of drugs prolonged and directed release systems is one of main directions in pharmaceutical and medical branches. Such systems allows to transfer medical substance directly to the active medium, as well as essentially reduces its one-time therapeutic doze [1]. Polymeric hydrogel carriers based on cross-linked copolymers of polyvinylpyrrolidone (PVP) with methacrylic esters, 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) namely, are used for above-mentioned purposes. They are able to swell in water and physical solutions but are insoluble in such media and have controlled sorption-desorption properties due to the presence of different functional groups in their structures.

There are two researching directions concerning development of drugs prolonged release systems based on polymeric hydrogels at Department of Chemical Technology of Plastics Processing of Lviv Polytechnic National University. The first direction is covering of solid parts by polymeric hydrogel envelope (capsulation). The second one is development of granular forms operating by the following scheme: sorption of drug by polymer – drug release in the organism.

Synthesized copolymers are cross-linked compounds consisting of PVP molecules with grafted polyHEMA chains. They have functional groups with different polarities: C=O and –OH groups of monomer and N–C=O group of PVP. Moreover, in aqueous media PVP chain links may be in ketonic forms or forms with nitrogen cationic atom. Depending upon structure of initial mixture and synthesis conditions hydrogel composition and structural parameters may be varied (TABLE 1) [2]. All mentioned factors affect the sorption and diffusive-transfer properties of synthesized (co)polymers.

	Initial mixture composition, mass parts		f, %	P, %	Copolymer composition, mass parts	
	HEMA	PVP			polyH	PVP
1.	90	10	53	5	94,7	5,3
2.	80	20	52	10	89,6	10,4
3*	80	20	53	11	89,4	10,6
4**	80	20	49	10	90,2	9,8
5.	70	30	38	11	88,6	11,4
6***	70	30	42	13	87,4	12,6

BP - benzoyl peroxide; f - PVP graft effectiveness; P - graft degree;  
\* - for T=343 K; \*\* - for T=353 K; \*\*\* - [BP]= 0,75 mass %.

TABLE 1. Graft parameters and copolymer compositions (T = 348 K, [BP] = 1 mass %).

Copolymers so synthesized in the form of membranes were effective capsulated agents of solid drugs. In dry state while storing they act as protective envelope but while operation they are able to swell in the physical solution and become permeable. The scheme of components transfer from capsulated particles is following: copolymer swelling, molecular diffusion inside the capsule, mass transfer through polymeric membrane and mass delivery into ambient solution (FIG.1).

Spent capsule is removed out of organism by natural way without detriment to it.

In order to forecast the duration of drug removal from capsulated particle, as well as its end concentration in the solution, the model of mass transfer from globular particle enveloped with polymeric hydrogel has been developed (FIG.2).

The thickness of hydrogel envelope while swelling will change by following dependence:

$$\delta = \delta_n [1 + \alpha_{\max} (1 - e^{-Kt})]$$

where:  $\delta_n$ ,  $\delta$  – thickness of dry and swelled hydrogel envelope, [m]; t – swelling time, [s]; K – swelling rate constant, [s<sup>-1</sup>];  $\alpha_{\max}$  – maximal value of swelling coefficient.

Concentration in the solution C is:

$$C = 4\pi(\rho_T - c_s)(r^3 - 3Rr^2 + 3R^2r^2)/3W$$

If  $r=R$ , then  $C = C_{\max} = 4\pi(\rho_T - c_s)R^3/3W$

The change of particle mass at  $\delta \ll R$  is equal to:

$$-dM/dt = 4\pi P^2(c_s - c_1)/(\beta^{-1} + rD_1^{-1} + \delta D_2^{-1})$$

where: M – particle mass, [kg];  $D_1, D_2$  – diffusion coefficients in the solution inside the capsule and polymer, respectively, [m<sup>2</sup>/s]; R – particle radius, [m];  $\rho_T$  – solid particle density, [kg/m<sup>3</sup>],  $c_s$  – concentration of the substance over the particle surface, [kg/m<sup>3</sup>]; r – reduction of particle radius;  $\beta$  – mass-transfer coefficient, [m/s]; W – liquid volume, [m<sup>3</sup>].

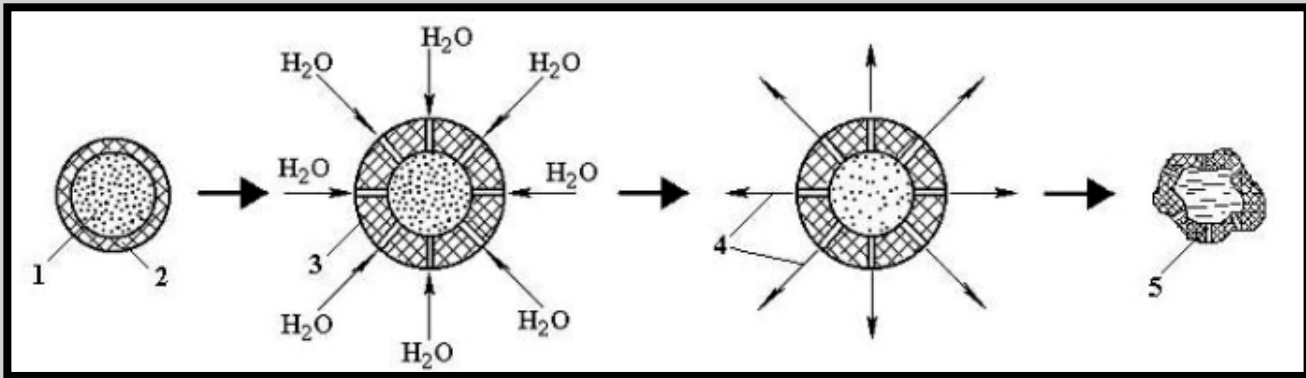
Maple v6.01 mathematical pack was used for the model numerical realization. Results so obtained allow to forecast the duration of drug removal from the particle, as well as its end concentration in the solution.

Investigated polymers also have been used for the development of drug delivery systems of another type, so called granular copolymers. Sorption properties of such copolymers are determined with net structural parameters and presence of different functional groups in the copolymer.

Initial mix design and kinetics investigation were fulfilled, what gave the possibility to substantiate the synthesis regimes of granulated copolymers and establish the effect of main factors on the granulometric composition and polymer properties [3]. The synthesis principles of PVP – HEMA granular copolymers have been developed. Such copolymers have controlled sizes of particles (from 0.1 to 2.0 mm) and polydispersity.

In order to establish the practical aptitude of copolymers so synthesized, the sorption and desorption processes were investigated using sodium diclofenac. This drug is used as solvent, analgesic and febrifuge, which is contra-indicated under stomach ulcer. Moreover, its long-term usage changes blood formula. Therefore, the development of prolonged systems, which essentially decrease the drug effective part and minimize its negative operation to the mucous membrane of gullet and stomach, is matter of great importance.

The experimental results show that homopolymers on the HEMA basis (FIG.3a, curve 1) have the least sorption ability. Effective sorption takes place during 6-8 h. and then practically does not change. The introduction of PVP links into the copolymer increases the sorption rate, as well as boundary amount of sorbed drug. Mentioned facts are caused, obviously, by introduction of additional functional groups of another nature into the copolymer composition (>N-C=O) and increase of granule porosity [4].

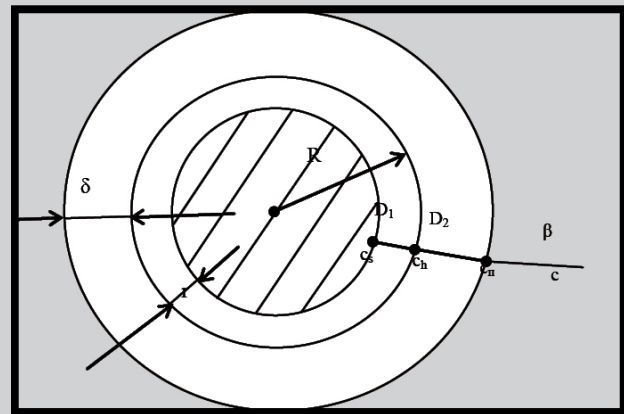


**FIG.1. The scheme of components transfer from capsulated particles.**  
 1 – drug; 2 – solid polymer envelope; 3 – swelled cross-linked gel;  
 4 – drug prolonged release; 5 – spent capsule.

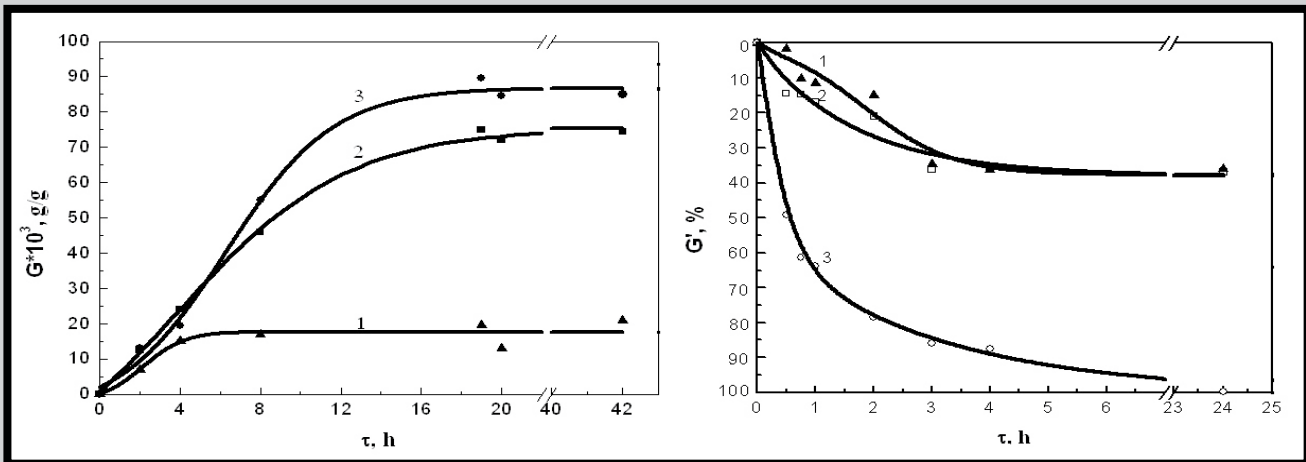
We also examined the drug release by spherical particles because they model the behavior of prolonged drug while operation.

Synthesized copolymers were desorbed for 24 h. till 40% of maximum sorbed sodium diclofenac was achieved. The rest amount did not release under experimental conditions, except granules based on polyHEMA (FIG.3b, curve 3). Perhaps, in such a case sodium diclofenac is sorbed only due to the physical interacting forces which are weak and can not hold drug for a long time. In the presence of PVP functional groups in the copolymer structure both physical and chemical interaction forces take part in the sorption-desorption process. It should be noted that amount of desorbed sodium diclofenac was in the range of therapeutic doses in all cases.

Thus, we established the relationship between synthesis conditions, structure and sorption-desorption properties of PVP cross-linked copolymers, what offers the challenge of their application as carriers for the systems of drugs directional and controlled release.



**FIG.2. The scheme of mass transfer from solid particle with hydrogel envelope.**



**FIG.3. Kinetic curves of sodium diclofenac sorption (left) and desorption (right) by polymeric hydrogels, [HEMA]:[PVP], mass parts: 1-10:0 ( $d_n=0,90\text{mm}$ ; PDI=1,27); 2-8:2 ( $d_n=0,64\text{mm}$ ; PDI=1,24); 3-7:3 ( $d_n=0,73\text{mm}$ ; PDI=1,15).**

## References

- [1] Grygoryanc I.K., Tryhanova G.A. Polymer drug delivery systems // Chemistry abroad.-1984.-№9.-64 p.  
 [2] Skorokhoda V., Semenyuk N., Suberlyak O. Structure and sorption ability of hydroxyethylmethacrylate copolymers with polyvinylpyrrolidone // Полімерний журнал.-2004.-№2.-P.86-92 (Ukraine).

- [3] Skorokhoda V., Semenyuk N., Lukan G., Suberlyak O. Influence of technological parameters on regularities of hydrophilic granular polyvinylpyrrolidone copolymers synthesis // Вопросы химии и химической технологии.- 2004.-№3.- С.88-91 (Ukraine).  
 [4] Suberlyak O., Skorokhoda V., Thir I. Influence of complex formation on polymerization of hydroxyethylmethacrylate in presence of polyvinylpyrrolidone // Высокомолекулярные соединения.-1989.-V.5Б.-P.336-340 (Russia).

# NANO-SIZED MICELLES FORMED BY SELF-ASSEMBLING OF POLYLACTIDE/POLY(ETHYLENE GLYCOL) BLOCK COPOLYMERS IN AQUEOUS SOLUTIONS

LIU YANG<sup>1</sup>, ZHENXIAN ZHAO<sup>1</sup>, JIA WEI<sup>1</sup>, SUMING LI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE, FUDAN UNIVERSITY, SHANGHAI 200433, CHINA

<sup>2</sup>MAX MOUSSERON INSTITUTE ON BIOMOLECULES, UMR CNRS 5247, RESEARCH CENTER ON ARTIFICIAL BIOPOLYMERS, FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITY MONTPELLIER I, 34060 MONTPELLIER, FRANCE

E-MAIL: LISUMING@UNIV-MONTP1.FR

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 16-18]

## Introduction

Biodegradable aliphatic polyesters such as polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA) have attracted much attention as biomaterials due to the biocompatibility and degradability. These polymers have been used for temporary therapeutic applications such as sutures, osteosynthetic devices, sustained drug delivery devices, and scaffolds in tissue engineering [1-3]. Hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) blocks have been incorporated into PLA backbones to make copolymers with suitable hydrophilicity and degradability. PEG presents outstanding physicochemical and biological properties, and is able to form a palisade avoiding protein adsorption and subsequent non-specific uptake by the reticuloendothelial system (RES) after intravenous injection [4].

PLA/PEG block copolymers have been widely investigated as drug carriers in the form of microparticles, nanoparticles, and hydrogels [5-8]. The aim of this work was to investigate the micellization properties of water soluble PLA-PEG-PLA triblock copolymers, which should be of great interest for applications in the field of drug delivery.

## Materials and methods

PLA-PEG-PLA triblock copolymers were prepared using ring-opening polymerization of L- or D-lactide, in the presence of PEG ( $M_n=4600$ ) and zinc lactate (0.1 wt%) [9].

PLLA-PEG-PLLA or PDLA-PEG-PDLA copolymers were dissolved in distilled water to yield homogeneous micellar dilute solutions. The two solutions with equal molar concentrations were then mixed to obtain a micellar solution by self-assembling.

Polymeric micelles containing paclitaxel were prepared as follows: polymer (50mg) and paclitaxel (10mg) were dissolved in 1-methyl-2-pyrrolidone (1ml), the solution was dropwise added to 5ml phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) under supersonic stirring to obtain a microemulsion. The solution was then centrifuged (1000rpm, 30min) to remove the unincorporated paclitaxel.

Paclitaxel-loaded micellar solution was added in a dialysis bag (MWCO=7000) which was then placed in 100ml of PBS. *In vitro* drug release was allowed to proceed at 37°C.

Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra were recorded at room temperature with a Bruker spectrometer operating at 250MHz by using DMSO-d<sub>6</sub> as solvent. Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms

were registered with a Perkin-Elmer DSC6 instrument, the heating rate being 10°C/min. Surface tension of PLA/PEG dilute solutions was determined with a Kruss tensiometer K100. Dynamic light scattering (DLS) was measured using a commercial laser light scattering spectrometer (Malvern Autosizer 4700, Malvern Instrument, Worcs, UK). High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed with a LC-10A apparatus (Shimadzu) equipped with a UV detection (SPD-10A, Shimadzu) and a 218MR54 column (4.6×250mm, C<sub>18</sub>, Vydac, USA). The mobile phase was acetonitrile/water (55:45 v/v) with a flow rate of 1.0 ml/min.

## Results and discussion

TABLE 1 presents the molecular and thermal characteristics of the copolymers as determined by <sup>1</sup>H NMR and DSC. For the sake of simplicity, triblock copolymers were named as L<sub>x</sub>EO<sub>y</sub>L<sub>x</sub> or D<sub>x</sub>EO<sub>y</sub>D<sub>x</sub> where L, D, and EO represent PLLA, PDLA, and PEG blocks, respectively, x and y representing the number-average degree of polymerization of corresponding blocks.

It is well known that polymeric micelles can be formed only when the polymer concentration is higher than the critical micellar concentration (CMC) which characterizes the micelle stability [14]. The CMC values were obtained from surface tension ( $\gamma$ ) measurements of the micellar solutions. FIGURE 1 shows the  $\gamma$  vs. lgC plot of L<sub>12</sub>EO<sub>104</sub>L<sub>12</sub> aqueous solutions. The intersection point at 0.050g/l is estimated to be the CMC of this copolymer. D<sub>13</sub>EO<sub>104</sub>D<sub>13</sub> exhibits the same CMC as L<sub>12</sub>EO<sub>104</sub>L<sub>12</sub>. However, the mixed solution of L<sub>12</sub>EO<sub>104</sub>L<sub>12</sub> and D<sub>13</sub>EO<sub>104</sub>D<sub>13</sub> presents a lower CMC = 0.040g/l, thus confirming that mixed micellar solution is more stable than separate ones due to stronger interactions between PLLA and PDLA blocks. These values appeared remarkably lower than those of low molar mass surfactants, indicating that micelles formed from PLA/PEG copolymers as drug carriers are susceptible to retain thermodynamic stability without dissociation even after intravenous injection which induces severe dilution.

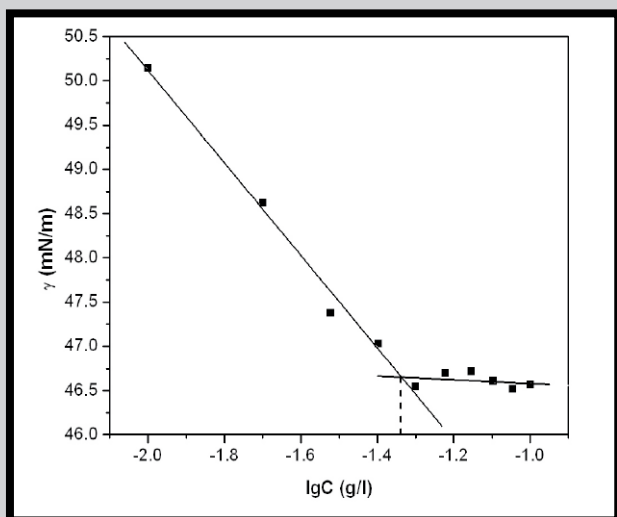
CMC measurements were performed in 0.1M NaCl aqueous solutions and at 37°C to simulate physiological conditions. As shown in TABLE 2, there is no significant difference between the CMC values of the copolymers in pure water or in NaCl solutions. The insensitivity of the CMC to electrolyte addition is probably due to the non-ionic nature of the polymers, in agreement with literature data [10]. In contrast, the CMC values at 37°C appeared slightly lower than those at 20°C. This finding could be attributed to the increase in hydrophobicity or loss of polarity of PEG at elevated temperatures, thus leading to dehydration of PEG chains and a subsequent decrease in the CMC [11]. On the other hand, chain mobility is improved with increasing temperature, the probability for hydrophobic PLA segments to meet each other and further assemble to form the inner core of micelles is enhanced. Similar findings have been reported in literature [11,12].

DLS measurements were performed to determine the size and size distribution of the micelles. Average diameters of 115.1nm and 108.5nm were obtained for micelles from L<sub>12</sub>EO<sub>104</sub>L<sub>12</sub> and mixed aqueous solutions at a concentration of 1.0 g/l. The polydispersity factors were fairly low (0.2-0.3), indicating a narrow size distribution. It has been reported that micelles less than 200nm can prevent spleen filtering and tend to accumulate at the tumor sites due to the facilitated extravasation [13,14]. The small size of PLA/PEG micelles should enable them to safely achieve the disease site. On the other hand, the micelle size of the mixed solution

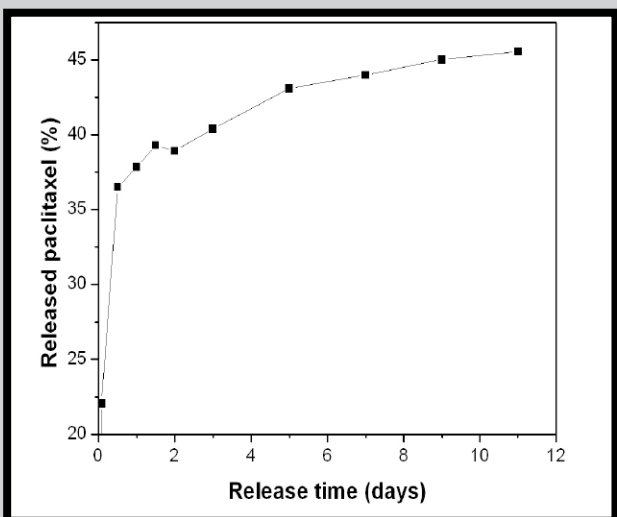
Polymer	EO/LA <sup>a</sup>	DP <sub>PEG</sub> <sup>b</sup>	DP <sub>PLA</sub> <sup>c</sup>	M <sub>n</sub> <sup>d</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>f</sup>	H <sub>m</sub> (J/g) <sup>f</sup>	T <sub>g</sub> (°C) <sup>g</sup>	T <sub>c</sub> (°C) <sup>g</sup>
L <sub>12</sub> EO <sub>104</sub> L <sub>12</sub>	4.2(3.0) <sup>e</sup>	104	24	6330	55.7	96.7	-46.8	-26.2
D <sub>13</sub> EO <sub>104</sub> D <sub>13</sub>	4.1(3.0)	104	26	6470	54.2	97.8	-47.1	-32.5
PEG4600	-	104	-	4600	67.5	170.8	-	-

<sup>a</sup> Calculated from the integration of NMR bands belonging to PEG blocks at 3.6 ppm and to PLA blocks at 5.2 ppm. <sup>b</sup> DP<sub>PEG</sub> = M<sub>nPEG</sub>/44. <sup>c</sup> DP<sub>PLA</sub> = DP<sub>PEG</sub>/(EO/LA). <sup>d</sup> M<sub>n</sub> = DP<sub>PEG</sub>·44 + DP<sub>PLA</sub>·72. <sup>e</sup> Data in parentheses corresponding to EO/LA ratios in feed. <sup>f</sup> Obtained from the first heating. <sup>g</sup> Obtained from the second heating.

**TABLE 1. Molecular Characteristics and Thermal Properties of PLA/PEG Block Copolymers.**



**FIG.1. Surface tension changes of L<sub>12</sub>EO<sub>104</sub>L<sub>12</sub> solutions as a function of concentration.**



**FIG.2. Paclitaxel release profile from polymeric micelles of L12EO104L12 aqueous solutions.**

appeared smaller than that of the separated one, which is assigned to the more compact structure due to stronger interactions between PLLA and PDLA blocks.

Paclitaxel is regarded as one of the most successful anticancer drugs. It has been widely applied to treat various cancers, especially breast and ovarian cancer. FIGURE 2 shows the cumulative release curve of paclitaxel from the micelles in vitro. A biphasic release profile is observed. In the first 12 hours, 35% of paclitaxel were rapidly released. Afterwards, the release rate slowed down and nearly 45%

Copolymer	EO/LA	CMC(g/l)		
		Water (20°C)	0.1M NaCl (20°C)	Water (37°C)
L <sub>12</sub> EO <sub>104</sub> L <sub>12</sub>	4.2	0.050	0.046	0.045
D <sub>13</sub> EO <sub>104</sub> D <sub>13</sub>	4.1	0.050	0.052	0.045
mixed <sup>a</sup>		0.040	0.048	0.037

<sup>a</sup>mixed micellar solution of PLLA/PEG and PDLA/PEG copolymers

**TABLE 2. CMC Values of PLA/PEG Triblock Copolymers and Mixed Solution at 20°C, in 0.1M NaCl aqueous solutions and at 37°C.**

of paclitaxel were released within 12 days. Compared with the release profile of paclitaxel from PLA-PEG-PLA nanoparticles obtained by solvent extraction/evaporation method in which a total of 49.6% paclitaxel was released within 1 month, 15 the micelles in our work exhibited faster release rate. This facilitated release can be ascribed to the less compact structure of the dynamic micelles prepared by self-assembly in aqueous solutions.

## Conclusion

Bioresorbable polymeric micelles were prepared from aqueous solutions of PLA-PEG-PLA triblock copolymers. The micellar solutions exhibited very lower CMC values, the mixed micellar solution of PLLA/PEG and PDLA/PEG copolymers appearing more stable than separate ones due to stronger interactions between PLLA and PDLA blocks. CMC measurements in the presence of salt and at 37°C indicated that the polymeric micelles could keep good stability under physiological environment. The size of micelles was around 100nm with a narrow size distribution. The release profile of paclitaxel from the micelles shows a biphasic pattern with 45% of drug released within 12 days. Therefore, PLA/PEG micelles are of great interest as injectable drug carriers because of the advantages as compared to most drug-delivery systems, especially easier formulation and absence of toxic organic solvents. Further studies are underway to investigate the degradation properties of the micelles and the effects of copolymer composition on the drug encapsulation and drug release.

## Acknowledgements

*The authors are indebted to the Shanghai-Unilever Research and Development Fun (No. 05SU07097) for financial support.*

## References

- [1] S. Li, M. Vert, Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Mat-hiowitz, E., Ed., Wiley&Sons: New York, 1999, p. 71.
- [2] S. Li, M. Vert, Macromolecules 36 (2003) 8008-8014.
- [3] S. Li, J. Biomed. Mater. Res. 48 (1999) 342-353.
- [4] Y. Hu, X. Jiang, Y. Ding, L. Zhang, C. Yang, J. Zhang, J. Chen, Y. Yang, Biomaterials 24 (2003) 2395-2404.
- [5] G. Ruan, S.S. Feng, Biomaterials 24 (2003) 5037-5044.
- [6] J. Matsumoto, Y. Nakada, K. Sakurai, T. Nakamura, Y. Takahashi, Inter. J. Pharm. 185 (1999) 93-101.
- [7] T. Govender, T. Riley, T. Ehtezazi, M.C. Garnett, S. Stolnik, L. Illum, S.S. Davis, Inter. J. Pharm. 199 (2000) 95-110.
- [8] I. Molina, S. Li, M.B. Martinez, M. Vert, Biomaterials 22 (2001) 363-369.
- [9] S. Li and M. Vert, Macromolecules 36, 8008 (2003).
- [10] X. Zhang, J. K. Jackson and H. M. Burt, Int. J. Pharm. 132, 195 (1996).
- [11] K. Letchford, J. Zastre, R. Liggins and H. Burt, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 35, 81 (2004).
- [12] B. Jeong, Y. H. Bae and S. W. Kim, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 16, 185 (1999).
- [13] G. S. Kwon and K. Kataoka, Adv. Drug Del. Rev. 16, 295 (1995).
- [14] Y. Dong and S. Feng, Biomaterials 25, 2843 (2004).
- [15] G. Ruan and S. Feng, Biomaterials 24, 5037 (2003).

## HIGH-HYDROPHILIC MEMBRANES FOR DIALYSIS AND HEMODIALYSIS

OLEG SUBERLYAK, JOURIJ MELNYK, NATALIYA BARAN

LVIV POLYTECHNIC NATIONAL UNIVERSITY  
BANDERA ST. 12, LVIV, 79013, UKRAINE  
E-MAIL: SUBERLAK@POLYNET.LVIV.UA

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 18-19]

Researches of high-hydrophilic and thromboresistive dialysis membranes have been carried out and possibility of their creation using polyvinylpyrrolidone has been confirmed.

Development of hemodialysis membranes, cardiovascular implants and other artificial organs put forward the problem of thromboresistive materials creation [1]. One of the effective ways of thromboresistance increase is immobilization of heparin, which is blood natural anticoagulant, over material surface. The main problem of heparin immobilization by polymeric membranes is its permanent minimal desorption at a contact with blood.

Researches concerning medical polymers syntheses and application are carried out at the Department of Chemical Technology of Plastics Processing of Lviv Polytechnic National University. These researches are directed mainly on the synthesis of new and modification of already existent polymers. Polyvinylpyrrolidone (PVP) was chosen as a base initial product after the protracted approbations. Originality of PVP properties and application is stipulated by its structure and physico-chemical properties. The presence of carbamate group favors high selective-sorption properties, complexation with iodine and other compounds and the formation of macromolecules ionic form in aqueous medium [2]. In addition to the foreseen PVP physiology activity and functional ability, it positively affects the kind of polymerization reaction at the synthesis of its copolymers.

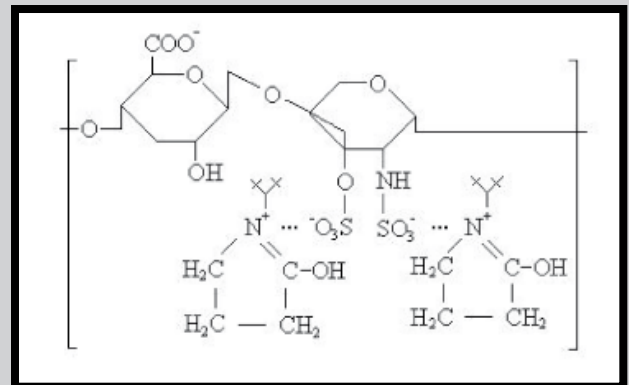
Netted copolymers of oxyalkylenmethacrylates with polyvinylpyrrolidone [3] are perspective compounds for the

production of dialysis membranes. The presence of PVP ionogenic groups in the composition of mentioned copolymers assumes the expansion of biochemical and sorption characteristics and obtaining of membranes with additional functions on their basis.

Hydrogel membranes were obtained by graft polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) over PVP (molecular mass was  $10\text{-}50\cdot 10^3$ ) in aqueous medium, what allowed to combine the synthesis stage and membrane swelling. Before the researches membranes were washed with the distilled water during 48 hours for the removal of unreacted products. The permeability of the synthesized hydrogel membranes in the dialysis process for the aqueous solutions of sodium chloride was determined at the special dialyzer with peristaltic pump. The saturation of membranes with heparin was realized in glycerin buffer solution (1M glycerin solution,  $\text{pH}=2,7$ ), which contained 250000 units of heparin in 1 l. The amount of sorbed and desorbed heparin was determined by photocolometry, based on quantitative determination of heparin and methylene blue complex.

Synthesized hydrogel membranes with PVP links have advanced immobilization ability relative to heparin (TAB.1).

Increased content of heparin on membranes with PVP is assigned, to our opinion, by the formation of ionic connections between heparin and PVP macromolecules. Also it should be taken into account that PVP link may exist as ketoform or in the form that contains nitrogen cationic atom [2]:



In spite of the fact that part of cationic form is insignificant [2], mentioned links connect heparin anions efficiently. As a result, PVP-heparin complex is so strong, that heparin does not precipitated for 24 hours (see TABLE 1) at membranes keeping in solutions with different pH (glycin buffer solution with  $\text{pH}=2,7$ , physical solution with  $\text{pH}=7$  and solution of sodium tetraboric acid with  $\text{pH}=9,1$ ). Here the selective-transport characteristics of membranes are changed insignificantly. As for membranes based of polyHEMA and modified cellulose, there is an insignificant precipitation of anticoagulant in acid and neutral media, while in alkaline medium it grows to 80...95%.

We have established that the presence of  $\text{-OH}$  and  $\text{N-C=O}$  hydrophilic groups in the composition of membrane copolymers increases their sorption ability which is characterized with water content (TABLE 2). The increase of PVP content multiplies dialysis permeability (KNaCl) of hydrogel membranes based on HEMA-PVP, but their strength falls down (TABLE 2). Hence, changing hydrogel chemical structure it is possible to change permeability of membranes on the basis of HEMA-PVP copolymers.

High-hydrophilic membranes synthesized on the basis of HEMA-PVP copolymers sorb plenty of water and form polymeric hydrogels, possessing high elasticity. All these factors also create additional preconditions of successful coexistence with biological tissues similar to the physical

№	Material of membranes	Heparin sorption, [10 <sup>-3</sup> u/m <sup>2</sup> ]	Heparin desorption for 24 hr., [%]			K <sub>NaCl</sub> · 10 <sup>6</sup> , [mole · m <sup>-2</sup> · h <sup>-1</sup> ]
			pH = 2,7	pH = 7	pH = 9,1	
1.	PHEMA	115	4	8	80	212/242*
2.	PVP-gr-PHEMA	550	0	0	2	848/865*
3.	Methyl cellulose [4]	126	8	5	95	–

K<sub>NaCl</sub> is a permeability coefficient for NaCl; \* - for heparinized membranes

**TABLE 1. Heparin immobilization by membranes surface and their permeability (membrane thickness is 200µm).**

№	Composition of (co)polymer membranes		Membrane tensile strength, [MPa]	Water content, [%]	K <sub>NaCl</sub> , [mole · m <sup>-2</sup> · h <sup>-1</sup> ]
	HEMA	PVP			
1.	100	—	0,53	40	127
2.	91	9	0,46	45	293
3.	82	18	0,40	48	412
4.	77	23	0,31	53	506
5.	69	31	0,22	61	611

K<sub>NaCl</sub> is a permeability coefficient for NaCl

**TABLE 2. - Properties of hydrogel membranes based on HEMA-PVP, (membrane thickness is 200µm).**

№	Composition of PA6-PVP mixtures, [% mass.]		Membrane tensile strength, [MPa]	Water content, [%]	K <sub>NaCl</sub> · 10 <sup>3</sup> , [mole · m <sup>-2</sup> · h <sup>-1</sup> ]
	PA6	PVP			
1.	99	1	21,0	22	0,36
2.	98	2	15,7	32	1,07
3.*	98	2	14,3	25	2,25
4.**	98	2	13,9	35	0,54
5.	95	5	15,4	32	0,96
6.	90	10	14,1	33	4,65

\* solvent evaporation temperature 382 K; \*\* PA6/PVP:HCOOH: H<sub>2</sub>O=7,2:77,6:15,2.

**TABLE 3. Properties of membranes based on PA6-PVP mixtures (PA6/PVP:HCOOH:H<sub>2</sub>O=7,2:79,0:13,8; solvent evaporation temperature 353 K; membrane thickness is 20 µm).**

state. At the same time they have low strength sharply limiting their application.

It has been established that strength of hydrogels can be increased by introduction of additional polyfunctional monomers [5] to the initial composition, but in such a case their permeability and elasticity diminish substantially. Moreover, there is another strange fact. The introduction of monomers in some cases decreases mechanical strength of hydrogels. Therefore, the creation of membranes based on polyamides modified with PVP seems more perspective.

High hydrophilicity and also complex of valuable properties (high mechanical strength, in particular) assign perspective usage of polyamide-6 (PA6) for the obtaining of dialysis membranes. Membranes based on PA6 have high operational characteristics but unsatisfactory permeability, especially relative to water. PA6 hydrophobicity is among the methods, which favors the considerable improvement of membranes permeability [6]. It is also necessary to pay attention to insufficient bio- and hemocompatibility of polyamides [7].

Membranes from PA6-PVP mixtures with high hydrophilicity were formed using solutions in the formic acid – water diluent system. Then prepared watering solutions were poured off [8].

We have established the possibility of ultrafine membranes formation on the basis of PA6-PVP mixtures with high hydrophilicity and permeability. We have confirmed the possibility of the controlled adjustment of membranes sorption ability and dialysis permeability by selection of initial polymeric mixture composition and membranes formation conditions (TABLE 3). High-hydrophilic membranes obtained on the basis of PA6-PVP are characterized with high strength (TABLE 3) which depends upon mixture composition, as well as the diluent system composition.

Previous medical researches confirmed the high thromboresistance of the synthesized high-hydrophilic PVP-containing membranes at their contact with blood.

## Conclusion

Conducted researches confirm the formation of high-hydrophilic PVP-containing dialysis membranes based of HEMA-PVP and PA6-PVP systems. They are able to immobilize heparin on the surface and have the wide spectrum of selective-diffusive and strength characteristics. Heparin, adsorbed by membranes surface, is resistant to the action of physical solution for a long time, what foresees stable antithrombogenic properties. These properties together with high permeability and separating ability intend membranes effective application in the hemodialysis processes.

## References

- [1] Hennink W., Kim S. Inhibition of surface induced coagulation by preadsorption of albumin-heparin conjugation. // J. Biomed. Mat. Res. – 1984. – 18, vol. 8. – P. 911-926.
- [2] Marutamutu M., Reddy J. Binding of fluoride onto poly(N-vinyl-2-pyrrolidone). // J. Polym. Sci. – 1984. – 22, vol. 10. – P. 569-573.
- [3] Thir I., Soshko A., Suberlyak O. About diffusion of electrolyte through hydrophilic polymer on the basis of monomethacrylate ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone. // Журнал прикладной химии. – 1983. – vol.10. – P. 2250-2253. (Russia)
- [4] Schmitt E., Holtz H. Heparin binding and release properties of DEAE cellulose membrane. // Biomaterials. – 1983. – 4, vol. 4. – P. 309-313.
- [5] Suberlyak O., Skorokhoda V., Soshko A. The regularity of polymerization oligoesteracrylates on polyvinylpyrrolidone. // Композиционные полимерные материалы. – 1986. – 29. – P. 39-43. (Russia)
- [6] Bryk M. The encyclopedia of membranes. – T. 1. – "Kyiv-Mogyla Academy" Publishing House. – 2005.
- [7] Senoo Manabu. Polymer of medical application – Moscow: Medicine. – 1981.
- [8] Suberlyak O., Melnyk J., Baran N. Modified of polyvinylpyrrolidone polyamide membranes. // Наукові записки НАУКМА "Хімічні науки і технології". – 2006. – 55. – P. 19-23. (Ukraine).



# IMMOBILIZATION OF COLLAGEN – AN EFFECTIVE METHOD OF IMPROVING CELL ADHESION ON POLYMERIC MATERIALS

ELŻBIETA PAMUŁA<sup>1</sup>, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, FACULTY OF ANATOMY,  
AL. JANA PAWŁA II 78, 31-571 KRAKÓW, POLAND

## Abstract

*Surface properties of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLG), and two reference materials: hydrophobic polystyrene (PS) and hydrophilic tissue culture polystyrene (TCPS) were modified by collagen adsorption. The morphology of the obtained collagen film was observed by using atomic force microscopy. On PLG and TCPS collagen layer was uniform, while on PS collagen formed isolated patches. The differences in supramolecular organization of collagen were due to differences in surface wettability. The behaviour of L929 fibroblasts incubated on all raw and collagen-modified surfaces was then evaluated. The best adhesion and spreading of cells, as expected, were observed on TCPS. Collagen adsorbed on PLG and PS considerably improved adhesion and spreading of fibroblasts.*

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 20-23]

## Introduction

Surface chemistry plays an important role in biomaterial design, because biological response to many implanted material is dependant on interactions between the implant material's surface atoms / molecules with the biological milieu (water molecules, ions, lipids, proteins, etc.). Within seconds upon implant exposure in vivo the material's surface is coated with a heterogeneous biological film, which is related to material's surface chemistry. In turn it determines how cells that arrive later interact with the implanted surface [1]. The biomaterials can be classified in two groups as regards contact with cells: i) cell conductive, e.g. promoting cell adhesion, proliferation and differentiation, due to adsorption of extra cellular matrix (ECM) proteins from serum at sufficient density and accessibility to permit cell receptor specific interaction with the surface; and, ii) cell resistant, e.g. passively adsorbing non-ECM proteins (e.g. albumin, globulins, lipoproteins), which prevent adsorption of ECM components, thus limiting cell receptor recognition [2].

Most clinically approved polymeric biomaterials possess attractive bulk properties (modulus, elasticity, strength, degradation rate), but frequently they are not cell conductive. Cell conductivity is necessary for tissue engineering applications, where a spontaneous and rapid cell integration and colonization of the scaffold are advantageous. Thus, transforming the surface properties of these clinically interesting biomaterials with surface modification techniques using cell-recognition ligands (ECM proteins) seems to be a very promising approach.

Collagen is the ECM protein of particular interest, involved in tissue structuring and cell recognition process. Type I collagen is a semi-flexible triple helix (molar mass about 300,000g/mol), about 300nm long and 1.5nm in diameter, with globular bulges at both ends of the molecules [3]. It is known to possess associative properties resulting in fibril formation in vivo and in vitro [4].

Collagen type I has been used as a coating of cell culture dishes to improve cell adhesion and proliferation in vitro. It was also used to coat titanium alloy implants to promote cell adhesion and integration with bone tissue [5]. In the recent study, it was shown that supramolecular assemblies of adsorbed collagen on two polymer surfaces (polystyrene and polystyrene modified with oxygen plasma) affect adhesion of endothelial cells [6].

The aim of this study was to examine the effect of the adsorbed collagen layers on the adhesion of cells. Collagen was adsorbed on poly(L-lactide-co-glycolide) (PLG), polystyrene (PS) and tissue culture polystyrene (TCPS), dried and its supramolecular organization was evaluated by using atomic force microscope (AFM). As a model system, fibroblasts originating from the cell line L929 were used in this study, because fibroblasts are involved in inflammatory reaction and healing, they deposit collagen and produce ECM. The adhesion of L929 cells after 4-hour contact with PLG, PS and TCPS was then investigated.

## Materials and methods

### Polymer substrates

Poly(L-lactide-co-glycolide) (PLG) (molar ratio of the comonomers 85:15,  $M_n=80$  kDa,  $d=1.9$ ; from CPCMC, PAN, Zabrze) and polystyrene (PS) ( $M_n=140$  kDa,  $d=1.8$ ; from Sigma-Aldrich, Germany) were dissolved in methylene chloride (POCH, Gliwice), and slip-casted on glass Petri dishes. After air and vacuum drying, polymeric films (170  $\mu\text{m}$  in thickness) were produced. As a reference material tissue culture polystyrene (TCPS, originating from 24-well Nunclon multidishes, Denmark) was used.

### Collagen adsorption

Collagen type I (from calf skin; Sigma, Germany) was received as an aqueous solution (1mg/mL, pH=3). Dilution to 40 $\mu\text{g/mL}$  was done in phosphate buffered saline (PBS) (137mM NaCl, 6.44nM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.7mM KCl, 8.0 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , all chemicals from POCh, Gliwice). PLG or PS samples were placed in cell culture wells and 2mL of collagen solution at 37°C was added. The collagen solution was also poured into the empty well (TCPS). The adsorption was performed for 10 min. Rinsing of the samples was performed 10 times with ultra-high quality water (UHQ-water, produced in UHQ-PS apparatus from Elga, UK) without complete removal of the solution, by pumping 1.5mL of the liquid and adding 1.5mL of UHQ-water. Then the samples were dried by flushing with a gentle nitrogen flow for about 10s and stored in a desiccator prior to use.

### Substrates characterization

Before and after collagen adsorption water contact angle of the substrates was measured by sessile drop method (DSA 10 Mk2, Kruss, Germany). The UHQ-water droplet was 0.2 $\mu\text{L}$  and each determination was obtained by averaging the results of 8 measurements.

Topography measurements of the films were performed with an Explorer atomic force microscope (ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Contact mode topographic images

were recorded using  $\text{Si}_3\text{N}_4$  tips with a spring constant of 0.05 N/m and a nominal radius of curvature of 20nm (Veeco NanoProbe™ Tips, model MLCT-EXMT-A). The images were recorded with a scan area of  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  for three randomly chosen places ( $300 \times 300$  data points) and with scan rate of 3 lines/s. All images were flattened using a third-order polynomial algorithm provided with the instrument. Based on the software SPMLab602 topographical parameters for each scan area were measured: average roughness ( $R_a$ ), root-mean square roughness ( $R_{\text{RMS}}$ ) and average height ( $H_{\text{av}}$ ).

### Cell culture and evaluation of cell adhesion

For cell culture studies the polymeric films were sterilized with UV radiation (1h on each side) and placed in 24-well dishes (Nunclon, Denmark). L929 fibroblasts were seeded on the polymeric materials with and without contact with collagen at the initial density of  $3 \times 10^4$  cells per well in 1ml of RPMI 1640 culture medium (Sigma, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (ICN, USA), 1% L-glutamine (Sigma, Germany) and antibiotics: penicillin (100IU/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}$ /ml) (Sigma, Germany). The cells were incubated 4h at 37°C.

To evaluate cell morphology the samples were rinsed with PBS, fixed in 4% formaldehyde in PBS for 5 min, stained with Gill's hematoxylin for 5 min, aqueous eosin Y for 2 min. (all chemicals from Sigma, Germany) and the cells were observed under optical microscope. The adhesion of cells was measured by crystal violet test (CV) [7]. The samples were rinsed with PBS, fixed in 2% formalin for 1h at 21°C and stained with crystal violet (0.5% in 20% methanol, Sigma, Germany) for 5 min. After washing with water and drying in air absorbed stain was extracted in 100% methanol (POCh, Gliwice, Poland). Finally, the optical density (O.D.) was measured at 570nm with Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitach, Austria).

## Results

The surface properties of the polymeric materials were characterized before and after protein adsorption using AFM and contact angle measurements (TABLE 1). The lowest contact angle among all raw materials was measured on TCPS, while the highest on PS. Incubation in collagen solution resulted in a significant decrease of contact angle in case of PLG and TCPS, indicating an increase in surface hydrophilicity. On PS a decrease of contact angle was much lower, and the results of contact angle were of low reproducibility (reflected in standard deviation).

	$\Theta(^{\circ})$	$R_a$ (nm)	$R_{\text{RMS}}$ (nm)	$H_{\text{av}}$ (nm)
PLG	72.3 (1.8)	0.6 (0.1)	0.7 (0.2)	3.7 (0.5)
PLG+coll	60.5 (2.5)	2.3 (1.1)	3.0 (1.5)	12.6 (5.9)
PS	87.2 (1.9)	1.5 (0.8)	1.9 (1.1)	8.5 (2.4)
PS+coll	83.9 (4.2)	5.6 (2.0)	8.0 (5.4)	26.0 (17)
TCPS	58.5 (2.3)	5.1 (3.1)	6.6 (3.7)	22 (7)
TCPS+coll	50.4 (2.5)	3.0 (2.2)	4.4 (2.7)	14.5 (6)

$\Theta$  - water contact angle,  $R_a$  - average roughness,  $R_{\text{RMS}}$  - root-mean square roughness,  $H_{\text{av}}$  - average height; average and standard deviations,  $n=10(\Theta)$  or  $n=3(R_a, R_{\text{RMS}}, H_{\text{av}})$ .

**TABLE 1. Surface properties of polymeric materials before and after collagen adsorption.**

FIG.1 presents AFM topographical images of the raw polymer surfaces before and after collagen adsorption. The PLG surface was the most smooth, as revealed by the low  $R_a$ ,  $R_{\text{RMS}}$  and  $H_{\text{av}}$  (TABLE 1). On the TCPS surface scratches were detected which resulted in increases of surface roughness and average height. In the case of PLG and TCPS after contact with collagen solution continuous layers of protein were observed, while on PS collagen formed discontinuous patches.

L929 fibroblasts were incubated on the studied substrata for 4 h, and the morphology of adhering cells as well their adhesion were evaluated (FIG.2). On PS the cells were round and weakly spread. On PGLA the cells were better spread and contacting the material with larger surface area. On TCPS the cells were well spread and polygonal in shape. Cells incubated on PGLA and TCPS coated with collagen were much better spread than those incubated on PS after collagen adsorption.

The number of adhering mass of cells was also studied by crystal violet absorption and extraction (FIG.3). On the native polymer substrata cell adhesion decreased in the order TCPS > PLG > PS. Collagen adsorbed on polymeric materials considerably enhanced adhesion of fibroblasts. The highest increase of cell adhesion was measured on PLG surface coated with protein layer, indicating that immobilization of collagen is a very effective way of improving cell behaviour.

## Discussion

Copolymer of L-lactide and glycolide (PLG) has attractive bulk properties such as tensile strength, degradability and resorbability, but its surface is not the most appropriate for cell adhesion. Therefore in this study, its surface was modified by collagen, the ECM protein having cell-recognition ligands. For comparison two model surfaces, e.g cell-resistant polystyrene (PS) and cell-conductive polystyrene treated with oxygen plasma (TCPS) were also modified in the same manner. It was found that on PLG and TCPS continuous protein layers were visible, while on PS collagen formed isolated patches. Different organization of adsorbed collagen was influenced by the hydrophobicity of the surface as already reported [8]. Presence of collagen on the surface resulted in decrease of water contact angle.

L929 fibroblasts suspended in the medium supplemented with serum were then incubated for 4 hours on all non-modified and collagen-modified polymeric materials. Among all raw polymers the best adhesion of cells was observed on TCPS, as expected. TCPS is the material preferentially binding ECM proteins from the serum designed to optimally culture cells in vitro [2]. Adsorption of collagen on TCPS practically did not influence adhesion of cells (FIG.2C, FIG.3). The lowest cell adhesion was observed on raw PS, because on its hydrophobic surface, preferential adsorption of albumin from serum prevented adsorption of ECM-proteins, thus inhibiting cell adhesion [9]. Once the PS surface was at least partially covered with collagen (FIG.1E), cells had better conditions to adhere and spread (FIG.2E, FIG.3). Similar results were already reported in the work of Z. Keresztes et al. [6] who found that polystyrene coated with smooth collagen film increased endothelial cells (HUVECs) adhesion and spreading. In our study, on the raw PLG the adhesion of fibroblasts was significantly higher than on PS and significantly lower than on TCPS, locating this material between cell-resistant and cell-conductive substrata. Collagen adsorbed on PLG significantly improved adhesion and spreading of fibroblasts, making PLG surface cell-conductive.

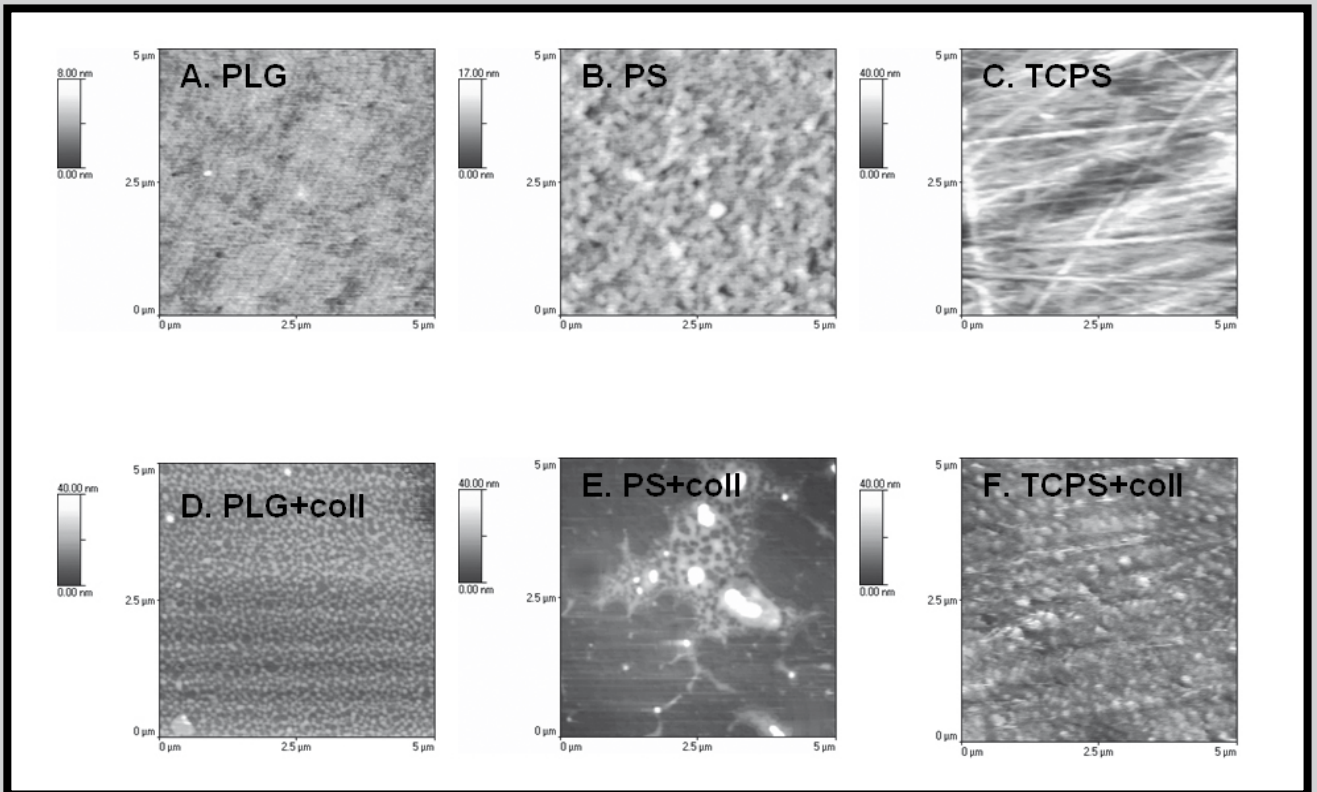


FIG.1. AFM topographical images (5μm x 5μm, z=8nm, or 17nm, or 40nm) of polymeric surfaces before (A, B, C) and after collagen adsorption (D, E, F).

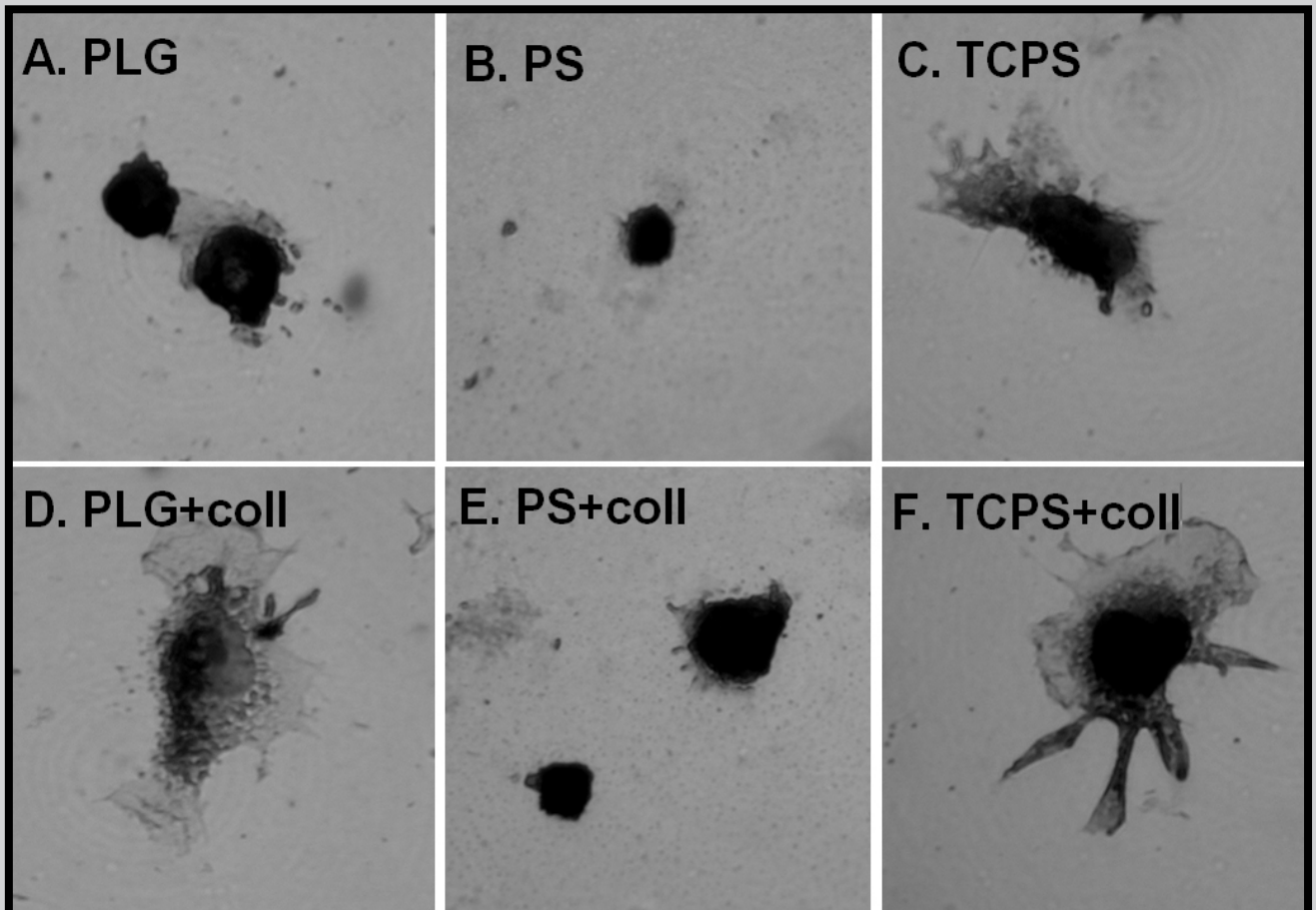
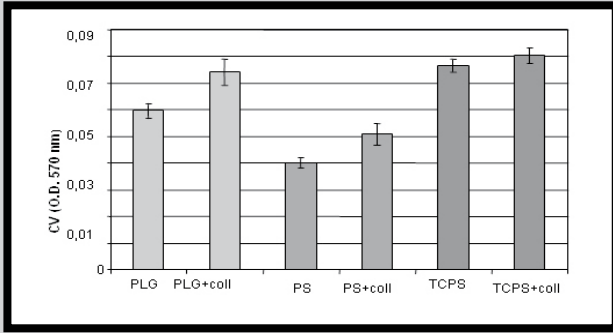


FIG.2. Morphology of L929 fibroblasts incubated on polymeric surfaces before (A, B, C) and after collagen adsorption (D, E, F); optical microscope, H-E staining.



**FIG.3. L929 fibroblasts adherence on polymeric surfaces before and after collagen adsorption.**

In summary, adsorption of collagen on polymeric materials is an effective method considerably improving adhesion and spreading of fibroblasts.

### Acknowledgements

The authors thank Prof. B. Płytycz (Jagiellonian University, Institute of Zoology, Krakow) for the access to cell culture facilities, Dr. P. Dobrzyński for providing PLG, and M. Adamczak for her assistance in AFM data acquisition and treatment.

This study was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education (grant no. 3 T08D 019 28).

### References

- [1] J.D. Andrade. Ed. Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers: Surface Chemistry and Physics, Vol. 1, Plenum, New York, 1985, 1-19.
- [2] G.M. Harbes, D.W. Grainger. Cell-Material Interactions: Fundamental Design Issues for Tissue Engineering and Clinical Considerations, in S.A. Guelcher, J.O. Hollinger (Eds.) An Introduction to Biomaterials, CRC, Boca Raton, 2005, 15-45.
- [3] I. V. Yannas, Natural materials, in B.D Ratner, A.S. Hoffman, F.J Schoen, J.E. Lemons (Eds.) Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine, Ch. 2.8, Elsevier, Amsterdam, 2004, 127-134.
- [4] K. Kadler. Extracellular matrix 1: fibril-forming collagens, Protein Profile 1, 1994, 519-638.
- [5] S. Rammelt, E. Schulze, R. Bernhardt, U. Hanisch, D. Scharnweber, H. Worch, H. Zipp, A. Biewener. Coating of titanium implants with type-I collagen, J Orthop Res 22, 2004, 1025-1034.
- [6] Z. Keresztes, P.G. Rouxhet, C. Remacle, C. Dupont-Gillian. Supramolecular assemblies of adsorbed collagen affect the adhesion of endothelial cells. J Biomed Mater Res 76A, 2006, 223-233.
- [7] B. Płytycz, M. Rozanowska, R. Seljelid. Quantification of neutral red pinocytosis by small numbers of adherent cells: comparative studies. Folia Biol (Krakow) 40, 1992, 3-9.
- [8] E. Pamuła, V. DeCupere, Y.F. Dufrene, P.G. Rouxhet. Nanoscale organization of adsorbed collagen: Influence of surface hydrophobicity and adsorption time. J Colloid Interface Sci 271, 2004, 80-91.
- [9] J.L. Dewez, V. Berger, Y.J. Schneider, P.G. Rouxhet. Influence of substrate hydrophobicity on the adsorption of collagen in the presence of Pluronic F68, albumin, or calf serum. J Colloid Interface Sci 191, 1997, 1-10.

## WPLYWU ŻELU WYBIELAJĄCEGO Z NADTLENKIEM MOCZNIKA NA POWIERZCHNIĘ SZKLIWA - BADANIA ZA POMOCĄ MIKROSKOPU SIŁ ATOMOWYCH (AFM)

DOROTA KOŚCIELNIAK<sup>1</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, PRACOWNIA STOMATOLOGII DZIECIĘCEJ IS CMUJ UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

<sup>2</sup> AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

### Streszczenie

*W pracy oceniono wpływ żelu wybielającego zawierającego 20% nadtlenek mocznika na powierzchnię szkliva zęba ludzkiego. Przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM) zarejestrowano obrazy topograficzne szkliva z powierzchni policzkowej zęba bez kontaktu jak i po kontakcie z żelem wybielającym. Badania wykazały, że 48-godzinne wybielanie nie wpływa w istotny sposób na topografię szkliva i jego chropowatość. Parametry topograficzne takie jak: średnia chropowatość powierzchni, chropowatość skuteczna i średnia wysokość elementów topograficznych szkliva po procesie wybielania były podobne do parametrów próbki kontrolnej.*

[INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW, 63-64, (2007), 24-27]

### Wstęp

Wybielanie zębów metodą domową, nakładkową przy użyciu nadtlenku mocznika zostało wprowadzone po raz pierwszy w 1989 roku [1] i jest ono obecnie jedną z najpopularniejszych metod przyżyciowego wybielania zębów. Efekt wybielający zależy bezpośrednio od czasu zabiegu i stężenia środka wybielającego. W większości dotychczasowych badań opisywano brak uszkodzeń szkliva po zastosowaniu preparatów wybielających [2, 3]. Wyniki uzyskane w naszych poprzednich badaniach in vitro wykazały, że zastosowanie żeli wybielających z 10% i 20% nadtlenkiem mocznika przez 12 dni, 4 godziny dziennie, nie wpływa znacząco na mikrostrukturę szkliva [4], jego skład chemiczny [5] i mikrostrukturę [6]. Istnieją jednak również doniesienia wskazujące, iż wysokie stężenia nadtlenku wodoru lub kwasów powodują wyraźne uszkodzenie struktury szkliva. Hegedus i wsp. na podstawie badań AFM stwierdzili występowanie zmian na powierzchni szkliva po 28 h wybielania 10% nadtlenkiem mocznika i 30% nadtlenkiem wodoru [7].

Mikroskop sił atomowych (AFM) jest skutecznym narzędziem zaprojektowanym do bezpośredniej obserwacji powierzchni różnych materiałów z rozdzielczością rzędu nanometrów. W przeciwieństwie do mikroskopu skaningowego elektronowego (SEM), nie wymaga on specjalnego przygotowania próbek, a więc pokrywania ich powierzchni przewodzącą warstwą złota lub węgla. Zatem obrazy otrzymane za pomocą AFM są bliższe rzeczywistości, gdyż są pozbawione artefaktów związanych z procedurami przygotowania próbek.

## AN ATOMIC FORCE MICROSCOPY STUDY ON THE EFFECT OF CARBAMIDE PEROXIDE BLEACHING GEL ON ENAMEL SURFACE

DOROTA KOŚCIELNIAK<sup>1</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF PEDODONTICS, INSTITUTE OF STOMATOLOGY, COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW, POLAND

<sup>2</sup> AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

### Abstract

*The effect of bleaching gel containing 20% carbamide peroxide on human enamel surface was evaluated. Topography images of the control and test samples located on the buccal surface of the same tooth were recorded with the use of an atomic force microscope (AFM). AFM evaluation demonstrated that 48-hour bleaching did not significantly affect topography and roughness of the enamel. Topographical parameters such as average roughness, root mean square roughness and average height were similar for both control and test surfaces of the enamel.*

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 24-27]

### Introduction

Teeth nightguard vital bleaching technique using hydrogen peroxide have been introduced in 1989 [1], and it has become more and more popular in dentistry. In this technique the effect of whitening is directly related to the time of exposure and concentration of the chemical used as a bleaching agent. Most studies have reported insignificant alterations of the enamel structure following exposure to bleaching chemicals [2,3]. Our previous in vitro studies demonstrated, that application of gels containing 10% and 20% carbamide peroxide for 12 days, 4 hours daily, did not have unfavourable effects on enamel microhardness [4], chemical structure [5] and microstructure [6]. Even though, there are reports claiming that high level of hydrogen peroxide or acids cause enamel structural alteration. Hegedus et al. described surface changes using atomic force microscopy after 28h of bleaching with 10% carbamide peroxide and 30% hydrogen peroxide [7].

Atomic force microscopy (AFM) is a powerful tool designed for direct observation of the surface with nanometer resolution. Contrary to scanning electron microscopy (SEM), it requires minimal sample preparation, without necessity to coat the surface with a conductive layer of gold or carbon. Therefore, AFM images are more likely to represent natural surfaces, without any alterations connected with sample preparation.

The aim of this study was to get a further insight into the microstructure and topography of the enamel after application of gel containing 20% carbamide peroxide. To this end, atomic force microscopy was used to evaluate topography and measure topographical parameters, e.g. surface roughness.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie dalszych informacji na temat mikrostruktury i topografii szkliwa zęba wybielonego przy pomocy żelu zawierającego 20% nadtlenuk moczniaka. Do oceny topografii i chropowatości zastosowano mikroskop sił atomowych.

## Materiał i metoda

Do wybielania zastosowano preparat Opalescence 20% PF (Ultradent Products Inc., USA), o składzie: 20% nadtlenuk moczniaka, karbopol, woda, azotan potasu, 0,11% związek fluoru (pH=6,5). Powierzchnię policzkową zęba (nieuszkodzony procesem próchnicowym, ludzki ząb przedtrzonowy, usunięty ze wskazań periodontologicznych u pacjenta w wieku lat 60-ciu) przecięto na dwie części (próbka kontrolna i próbka badana) przy użyciu obrotowej tarczy diamentowej. Obie części przemyto wodą destylowaną. Wybielaniu poddawano połowę powierzchni wargowej, a druga część tej powierzchni stanowiła kontrolę. Po osuszeniu nakładano na powierzchnię szkliwa 0,2 ml żelu wybielającego. Próbkę badaną wybielano 4h dziennie przez 12 dni (łącznie 48h). Pomiędzy zabiegami, próbkę przetrzymywano w 0,9% soli fizjologicznej w temperaturze 37°C. Próbkę kontrolną zęba przetrzymywano przez cały czas trwania doświadczenia w soli fizjologicznej, w temperaturze 37°C.

Po 12 dniach wybielania określono kolor próbki kontrolnej i badanej przy użyciu kolornika Esthet X (Dentsply DeTrey), zgodnie z metodą opisaną poprzednio [4,5] oraz wykonano zdjęcia aparatem cyfrowym (Nikon Coolpix 995).

Po wysuszeniu próbek dokonano obserwacji powierzchni szkliwa przy użyciu mikroskopu sił atomowych (Explorer, ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Obrazy topograficzne zarejestrowano w trybie kontaktowym za pomocą sondy z  $\text{Si}_3\text{N}_4$  o stałej sprężystości 0,05 N/m i średnim promieniu krzywizny 20 nm (Veeco NanoProbe™ Tips, model MLCT-EXMT-A). Obrazy zarejestrowano dla trzech przypadkowo wybranych miejsc i dwóch obszarów skanowania:  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  i  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ , przy rozdzielczości  $300 \times 300$  pikseli i przy szybkości skanowania 3 linie/s. Za pomocą oprogramowania SPMLab602 wyznaczono chropowatość średnią ( $R_a$ ), chropowatość skuteczną ( $R_{RMS}$ ), średnią wysokość elementów topograficznych ( $H_{av}$ ) i maksymalny zakres zmian wysokości elementów topograficznych (MaxR). Obliczono wartości średnie, odchylenia standardowe i przeprowadzono analizę statystyczną wyników z wykorzystaniem t-testu.

## Wyniki i dyskusja

Na RYS.1 przedstawiono dwie części zęba: kontrolną i po wybielaniu przez 48 godzin. Po zabiegu kolor badanej próbki uległ znacznemu rozjaśnieniu. Zgodnie z 18-stopniową skalą wg. kolornika Esthet X (Dentsply DeTrey) [4,5] kolor badanej próbki uległ zmianie ze stopnia 17 na stopień 4. Osiągnięto zatem poprawę koloru aż o 13 stopni.

Obrazy topograficzne powierzchni szkliwa próbki kontrolnej i po kontakcie z żelem wybielającym zostały przedstawione odpowiednio na RYS.2 i RYS.3. Na obrazach szkliwa zarejestrowanych dla większych obszarów skanowania ( $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ) (RYS.2a,3a) widoczne są jego pofalowania noszące nazwę perikymatów. Struktury te można obserwować także za pomocą mikroskopów optycznych i mikroskopów skaningowych elektronowych, które jednak nie stwarzają możliwości pomiaru ich głębokości [6]. Perikymaty są to poprzeczne prążki, będące zakończeniami linii wzrostowych szkliwa, tzw. linii Retziusa i odzwierciedlają tygodniowe cykle mineralizacji szkliwa [8]. Głębokość perikymatów mierzona za pomocą AFM dla próbek kontrolnych i badanych mieściła się w zakresie od 2 do 4  $\mu\text{m}$ . Odległość pomiędzy perikymatami wynosiła 30 $\mu\text{m}$ .

## Materials and methods

Tooth bleaching gel (Opalescence 20% PF, Ultradent Products Inc., USA) containing: 20% carbamide peroxide, carbopol, water, potassium nitride, fluoride compound 0.11%) of pH= 6.5, was used in this study. The buccal surface of the tooth (non-carious human premolar, extracted for periodontic reason, patient age 60 years) was divided in two parts (control and test) with the use of a high-speed diamond rotary. Both parts were rinsed with distilled water and placed in separate tubes containing 0.9% physiological saline at 37°C until use. Subsequently, 0.2 mL drop of Opalescence was deposited on the enamel surface. The test sample was treated with the bleaching agent applied 4 hours daily for 12 days (48h in total). During time intervals between gel applications, the sample was kept in physiological saline at 37°C. The control sample was incubated in physiological saline at 37°C for the whole experimental period.

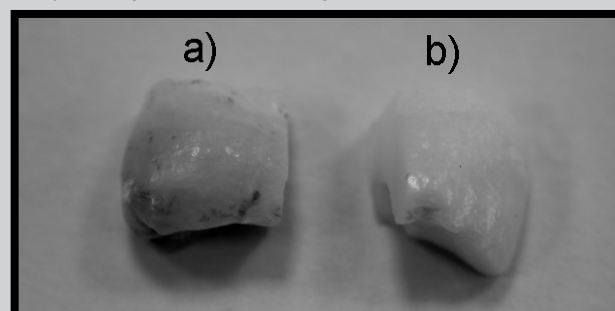
12 days after bleaching the colour of the test and control samples was compared to the Colour Standard Esthet X (Dentsply DeTrey), according to the method described previously [4,5], and both samples were photographed by a digital camera (Nikon Coolpix 995).

The samples were air dried and the enamel was analysed with the use of an atomic force microscope (Explorer, ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Contact mode topographic images were recorded using  $\text{Si}_3\text{N}_4$  probes with a spring constant of 0.05 N/m and a nominal radius of curvature of 20 nm (Veeco NanoProbe™ Tips, model MLCT-EXMT-A). The images were recorded for scan areas of  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  and  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$  for three randomly chosen places ( $300 \times 300$  data points), and with scan rate of 3 lines/s. Based on the software SPMLab602, topographical parameters for each scan were measured: average roughness ( $R_a$ ), root-mean square roughness ( $R_{RMS}$ ), average height ( $H_{av}$ ) and maximum range in z-direction (MaxR). The average and standard deviation were calculated, and the statistical analysis (a paired t-test) was made.

## Results and discussion

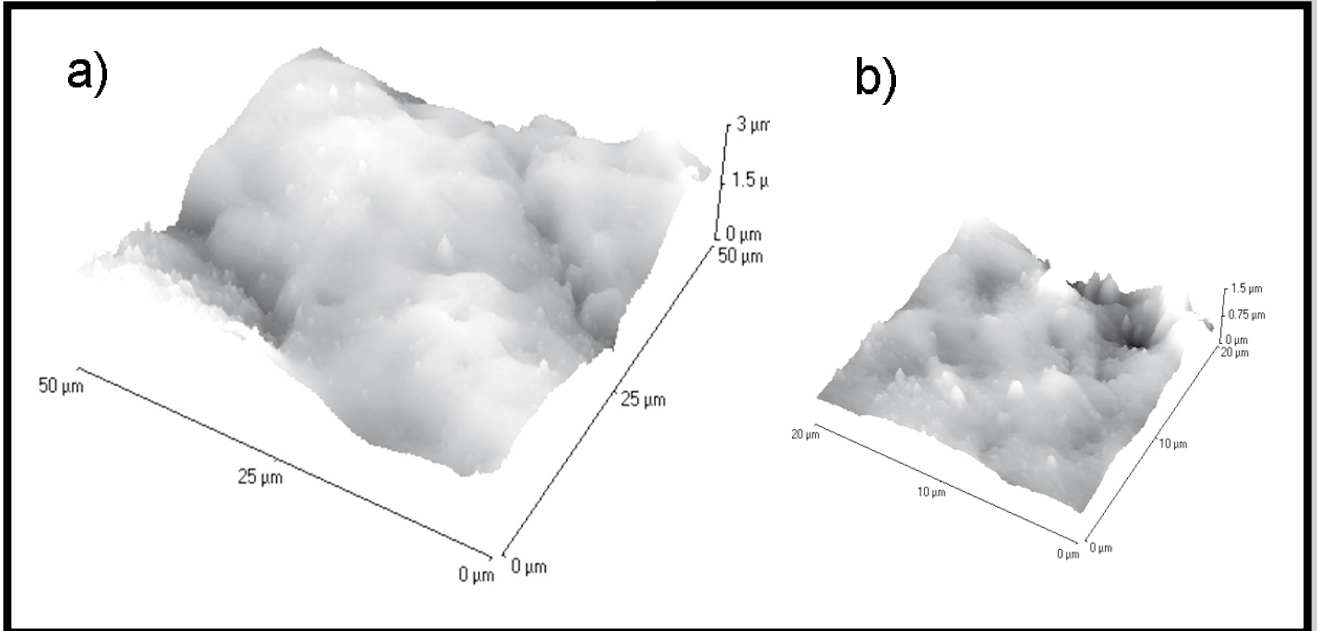
FIGURE 1 presents two parts of the tooth: control and after bleaching for 48h. After treatment a colour of the tooth considerably improved. According to the Colour Standard Esthet X (Dentsply DeTrey) and the assignment described in our previous papers [4,5], a degree of colour for control sample was 17, while after bleaching it dropped to 4. Thus, an excellent improvement in 13 degree was achieved.

Topographical images of the enamel without and after bleaching are presented in FIGURES 2 and 3, respectively. At larger scan areas (e.g.  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ) (FIG.2a,3a)



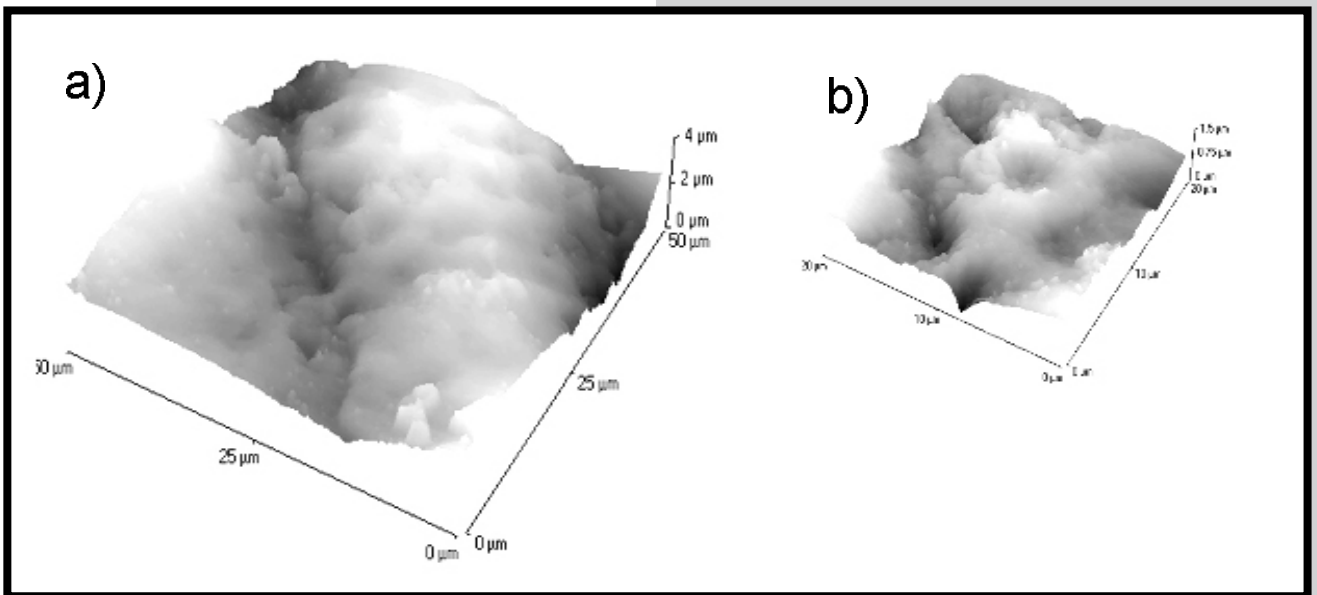
RYS.1. Zdjęcie zęba wykonane aparatem cyfrowym: a) część kontrolna, b) część wybielana przez 48 godz.

FIG.1. Digital camera picture of the tooth: a) control part, b) after bleaching for 48h.



RYS.2. Obrazy topograficzne kontrolnej powierzchni szkliwa zarejestrowane za pomocą AFM dla różnych obszarów skanowania: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Wysokość w kierunku z wynosi odpowiednio 3 μm (a) i 1.5 μm (b).

FIG. 2. AFM topographical images of the control enamel for different scan areas: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Note that z-range is equal to 3 μm (a) and 1.5 μm (b).



RYS.3. Obrazy topograficzne powierzchni szkliwa po wybielaniu zarejestrowane za pomocą AFM dla różnych obszarów skanowania: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Wysokość w kierunku z wynosi odpowiednio 4 μm (a) i 1.5 μm (b).

FIG.3. AFM topographical images of the enamel after bleaching for different scan areas: a) 50 μm x 50 μm, b) 20 μm x 20 μm. Note that z-range is equal to 4 μm (a) and 1.5 μm (b).

Sample / Próbką	$R_a$ (nm)	$R_{RMS}$ (nm)	$H_{av}$ (μm)	MaxR (μm)
Control / Kontrola	390 (120)	430 (90)	1.6 (0.6)	3.5 (1.3)
After bleaching / po wybielaniu	350 (80)	480 (110)	1.8 (0.6)	3.7 (2.1)

$R_a$  - average roughness / średnia chropowatość,  $R_{RMS}$  - root-mean square roughness / chropowatość skuteczna,  $H_{av}$  - average height / średnia wysokość, MaxR - maximum range in z-direction / maksymalny zakres wysokości w kierunku z.

TABELA 1. Parametry topograficzne szkliwa bez i po kontakcie z żel wybielającym. Wartości średnie i odchylenia standardowe dla 3 losowo wybranych miejsc.

TABLE 1. Topographical parameters of the enamel without and after contact with bleaching gel. Averages and standard deviations in parentheses from 3 randomly selected places.

W obrazach AFM przy mniejszych obszarach skanowania ( $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ ) (RYS.2b,3b) widoczne są wyraźnie pryzmaty szklivne o średnicy od 4 do  $6\mu\text{m}$  średnicy i głębokości około  $1,5\mu\text{m}$ . Pryzmaty zbudowane są z kryształów hydroksyapatytów o średnicy  $70\text{nm}$  [8]. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i po wybielaniu pryzmaty miały podobne wymiary.

Dla każdego zarejestrowanego obrazu wyznaczono parametry charakteryzujące topografię powierzchni szkliva takie jak: chropowatość średnia, chropowatość skuteczna, średnia wysokość elementów topograficznych i maksymalna wysokość elementów topograficznych w kierunku z. W TABELI 1 przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe wyliczone dla 3 losowo wybranych obszarów ( $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ) na kontrolnej powierzchni szkliva i powierzchni szkliva po wybielaniu. Na podkreślenie zasługuje wysoka wartość odchylenia standardowego, co świadczy o wysokiej niejednorodności powierzchni szkliva.

Badanie szkliva zęba za pomocą AFM nie wykazało istotnych różnic pomiędzy parametrami topografii powierzchni szkliva przed i po jego wybielaniu. Hegedus i wsp. opisali zmiany powierzchni szkliva widoczne w obrazie AFM po 28h wybielania 10% nadtlaniem mocznika i 30% nadtlaniem wodoru. Wyciągnęli oni wnioski, że struktura szkliva po wybielaniu staje się mniej regularna, a bruzdy na powierzchni bardziej nierówne i głębsze [7]. Trzeba jednak zaznaczyć, że powyższe wnioski zostały wyciągnięte na podstawie obrazów topograficznych zarejestrowanych dla bardzo małych obszarów skanowania, tj.  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ . Wniosków nie poparto głębszą analizą chropowatości i innych parametrów topograficznych. Nasze obrazy (RYS. 2a, 3a) dowodzą, że na powierzchni szkliva można rozróżnić obszary o większej chropowatości, jak i powierzchnie bardziej gładkie, co pozwala na stwierdzenie, że wnioskowanie o zmianach topografii na podstawie niereprezentatywnych obrazów o wymiarach kilku mikrometrów, porównywalnych z pojedynczymi pryzmatami i znacznie mniejszych od perikymata, wydaje się być wysoce niewiarygodne.

## Wnioski

Badanie potwierdziło bardzo wysoką skuteczność żelu zawierającego 20% nadtlenu mocznika w wybielaniu szkliva zęba ludzkiego. Pomiary dokonane za pomocą mikroskopu sił atomowych wykazują, że 48-godzinny zabieg wybielania nie wpływa znacząco na topografię i chropowatość powierzchni szkliva.

grooves called perikymata are clearly seen. They can be easily observed under optical or scanning electron microscopy, as previously reported, but their depth cannot be measured with the use of those methods [6]. Perikymata are concentric lines being the end of incremental growth lines (striae of Retzius) marking the position of the developing enamel at approximately weekly intervals [8]. The depth of the perikymata measured from AFM images for both control and bleached samples was in the range of  $2\text{--}4\mu\text{m}$ . The distance between the grooves was  $30\mu\text{m}$ .

As follows from FIGURES 2b and 3b at lower scan areas (e.g.  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ ) enamel prisms ( $4\text{--}6\mu\text{m}$  in diameter and  $1.5\mu\text{m}$  in depth) are clearly distinguished. The prisms are build of apatite crystallites with a diameter of  $70\text{nm}$  [8]. The prisms in both control and bleached samples were of similar depth and size.

Topographical parameters including roughness, average height of the topographical features, and maximal range in z-direction were evaluated for all scanned areas. Data obtained for 3 randomly chosen places ( $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$  in size) for enamel without and after bleaching are gathered in TABLE 1. It is interesting to note that standard deviation value is quite large, indicating that the enamel surface is not homogenous. The statistical analyse (a paired t-test) showed no significant differences between bleached and control samples.

The AFM topography results of human enamel show that there is not statistically significant difference between topographical parameters of the enamel without and after bleaching. Hegedus et al. described surface changes using atomic force microscopy after 28h of bleaching with 10% carbamide peroxide and 30% hydrogen peroxide. It was concluded, that the enamel structure became more irregular and surface grooves became rougher and deeper after bleaching [7]. However it must be pointed out, that such conclusions was drawn only on topography pictures recorded for very small scan areas of  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$  in size. The findings were not supported by deeper analysis of roughness and other topographical parameters. Our pictures [FIG. 2a, 3a] prove that on the surface of the enamel one can find the regions which are more rough, and also those which are more smooth. Thus, it seems to be inaccurate to draw conclusions on non-representative pictures having the x-y size of few micrometres, comparable to the size of individual prisms and much lower than perikymata.

## Conclusions

The study confirmed a very good efficiency of gel containing 20% of carbamide peroxide in whitening of the human tooth. Atomic force microscopy evaluation demonstrated that 48-hour bleaching did not significantly affect topography and roughness of the enamel.

## Piśmiennictwo

- [1] V.B. Haywood, H.O. Heymann. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989;20:173-6.
- [2] D.F. Murchison, D.G. Charlton, B.K. More. Carbamide peroxide bleaching: effects on enamel surface hardness and bonding. *Operative Dentistry* 1992;17:181-185.
- [3] A. Joiner. The bleaching of teeth: A review of the literature. *J Dentistry* 2006;34:412-419.
- [4] D. Koscielniak, M. Chomyszyn-Gajewska, E. Pamula. In vitro effect of carbamide peroxide gel bleaching agents on the microhardness of human enamel, *Eng Biomaterials* 2004;38-42:47-50.

## References

- [5] D. Kościelniak, E. Pamula, Cz. Paluszkiewicz, M.C homyszyn-Gajewska. Badania za pomocą spektroskopii w podczerwieni FTIR szkliva i zębiny po procesie wybielania. *Ceramika*. 2005;91(1):585-592.
- [6] D. Kościelniak, M. Chomyszyn-Gajewska, E. Pamula. Ocena bezpośredniego efektu wybielania zębów 10% i 20% żelem z nadtlaniem mocznika – badania in vitro, *Czas Stomatol* 2007;LX(4):231-239.
- [7] C. Hegedus, T. Bitstey, E. Flora-Nagy, G. Keszthelyi, A. Jenei. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface, *J Dentistry* 1999;27: 509-515.



# DŁUGOCZASOWA KORROZJA STOPÓW REX 734 I PANACEA P558 W ROZTWORACH 0.5 M NaCl I TYRODE'A

BARBARA BURNAT<sup>1</sup>, TADEUSZ BŁASZCZYK<sup>1</sup>, ANDRZEJ LENIART<sup>1</sup>, HENRYK SCHOLL<sup>1</sup>, LESZEK KLIMEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNIWERSYTET ŁÓDZKI, WYDZIAŁ FIZYKI I CHEMII, KATEDRA CHEMII OGÓLNEJ I NIEORGANICZNEJ, 90-136 ŁÓDŹ, NARUTOWICZA 68

<sup>2</sup>POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, 90-924 ŁÓDŹ, STEFANOWSKIEGO 1/15

E-MAIL: BURNAT@OP.PL

## Streszczenie

Przeprowadzono badania długoczasowej korozji dwóch biomedycznych stopów typu Fe-Cr-Mo: Rex 734 i Panacea P558 w roztworach 0.5 M NaCl i Tyrode'a, w temperaturze ciała ludzkiego 37°C (310 K). Czas kontaktowania się próbek stopów z roztworami wynosił 84 dni (ok. 3 miesiące). Stwierdzono, że dla wszystkich badanych próbek zarówno potencjały korozyjne, opory polaryzacyjne jak i szybkości korozji stabilizują się w końcowych 40. dniach. Inaczej zmieniają się w czasie eksperymentu charakterystyki impedancyjne. Wyniki atomowej spektroskopii absorpcyjnej roztworów korozyjnych pokazały, że korozja badanych stopów w swobodnym potencjale korozyjnym zachodzi równomiernie.

[INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW, 63-64, (2007), 28-31]

## Wprowadzenie

Stopy Rex 734 i Panacea P558 stosowane są do wytwarzania implantów kostnych krótko- i średnio- czasowych [1]. Stopy te charakteryzują się dobrą wytrzymałością mechaniczną, małym zużyciem, dobrą odpornością korozyjną i relatywnie niskimi kosztami. Skład chemiczny obydwu stopów przedstawiony jest w TABELI 1 [2,3].

Jak widać podstawową różnicą charakteryzującą te stopy jest zawartość Ni - bezniklowy stop Panacea P558 dedykowany jest pacjentom mających alergię na Ni. Badania elektrochemiczne i korozyjne obydwu stopów w różnych roztworach opisane zostały przez U.I. Thomanna i P.J. Uggowitza [3], J. Pan i wsp. [4], L. Reclaru i wsp. [2], oraz G. Rondelli'ego i wsp. [5]. Obecnie nie znajduje się w literaturze doniesień poświęconych systematycznym i porównawczym badaniom korozji długoczasowej tych stopów.

Celem tej pracy jest przedstawienie wyników badań długoczasowej korozji stopów Rex 734 i Panacea P558 w dwóch podstawowych roztworach korozyjnych - roztworze 0.5 M NaCl i roztworze Tyrode'a, symulującym rzeczywiste roztwory fizjologiczne. Czas kontaktowania się próbek z roztworami korozyjnymi wynosił 84 dni (ok.3 miesiące). Na podstawie przeprowadzonych badań określono zmiany potencjału korozyjnego, oporu polaryzacyjnego i impedancji w funkcji czasu kontaktowania się próbek z roztworami korozyjnymi. Po zakończeniu badań elektrochemicznych wykonano analizę roztworów korozyjnych metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA) i uzyskane wyniki porównano ze składem chemicznym badanych stopów.

# LONG-TIME CORROSION OF REX 734 AND PANACEA P558 ALLOYS IN 0.5 M NaCl AND TYRODE'S SOLUTIONS

BARBARA BURNAT<sup>1</sup>, TADEUSZ BŁASZCZYK<sup>1</sup>, ANDRZEJ LENIART<sup>1</sup>, HENRYK SCHOLL<sup>1</sup>, LESZEK KLIMEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF PHYSICS AND CHEMISTRY, DEPARTMENT OF GENERAL AND INORGANIC CHEMISTRY, 90-136 LODZ, NARUTOWICZA 68

<sup>2</sup>TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING, 90-924 LODZ, STEFANOWSKIEGO 1/15

E-MAIL: BURNAT@OP.PL

## Abstract

Long-time corrosion of two biomedical Fe-Cr-Mo alloys: Rex 734 and Panacea P558 was investigated in 0.5 M NaCl and Tyrode's solutions at human body temperature of 37°C (310 K). Samples of alloys were in contact with corrosion solutions within 84 days (ca. 3 months). It was stated that for all investigated samples both corrosion potentials, polarization resistances and corrosion rates were stabilized in last 40 days. In a different manner impedance characteristics changed during experiment. Results of atomic absorption spectroscopy of corrosion solutions after 84 days showed that corrosion processes at free corrosion potentials proceed as uniform corrosion.

[ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 63-64, (2007), 28-31]

## Introduction

Rex 634 and Panacea P558 are used for the manufacture of short- and middle-time bone implants [1]. These alloys have a good mechanical strength, acceptable wear and high corrosion resistance and relatively low cost. Chemical composition of both investigated alloys is presented in TABLE 1 [2,3].

As can be seen from TABLE 1 primary difference between this two alloys is Ni content - nickel-free Panacea P558 alloy is dedicated for patients with Ni allergy. Electrochemical and corrosion investigations of both alloys in different solutions were reported by U.I. Thomann and P.J. Uggowitzer [3], J. Pan et al. [4], L. Reclaru et al. [2], and also G. Rondelli et al. [5]. At present, there are no available literature data on systematic and comparative investigations of long-time corrosion processes of Rex 734 and Panacea P558 alloys.

The purpose of this study is to present results of long-time corrosion investigations of Rex 734 and Panacea P558 alloys in two basic corrosion solutions - 0.5 M NaCl solution and Tyrode's simulated physiological solution. Investigated samples were in contact with corrosion solutions within 84 days (ca.3 months). On the basis of performed investigations there were determined the changes of corrosion potential, polarization resistance and impedance versus contact time of samples with corrosion solutions. After electrochemical test termination corrosion solutions were analyzed using atomic absorption spectroscopy (AAS) and then obtained results were compared to chemical composition of investigated samples.

Pierwiastek / Element	C	Si	Mn	P	S	Cr	Ni	Mo	Cu	N	Nb	Fe
Rex 734 (ISO 5832/9)	max. 0.08	max. 0.75	2.00 ± 4.25	max. 0.025	max. 0.01	19.5 ± 22.0	9.0 ± 11.0	2.0 ± 3.0	max. 0.25	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.80	reszta rest
Panacea P558	0.2	0.43	10.18	0.01	0.01	17.35	0.08	3.09	0.04	0.48	0.05	reszta rest

**TABELA 1. Skład stopów Rex 734 i Panacea P558 (%wag.).**  
**TABLE 1. Composition of Rex 734 and Panacea P558 alloys (%wt.).**

## Materiały i metodyka badań

Próbki Rex i Panacea miały kształt walców o średnicach odpowiednio 28 mm i 30 mm. Powierzchnie próbek były szlifowane, polerowane mechanicznie i oczyszczane w myjce ultradźwiękowej [6,7]. Badania elektrochemiczne wykonywano w szklanym naczyniu pomiarowym, w którym elektrodą roboczą  $E_w$  była próbka, elektrodą pomocniczą  $E_c$  folia Pt, a elektrodą odniesienia  $E_{ref}$  elektroda kalomelowa w nasyconym roztworze NaCl. Wszystkie potencjały w tej pracy podawane są do stosowanej elektrody kalomelowej ( $E_0=0.236$  V wzgl. NEW). Powierzchnia robocza każdej próbki wynosiła ok. 3.14 cm<sup>2</sup>. Pomiary korozyjne prowadzono na 3. próbkach w roztworze 0.5 M NaCl i roztworze Tyrode'a (0.8 g NaCl, 0.02 g CaCl<sub>2</sub>, 0.02 g KCl, 0.1 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 g MgCl<sub>2</sub>, 0.005 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 100 cm<sup>3</sup> 3-krotnie destylowanej H<sub>2</sub>O). Całkowity czas kontaktowania się próbek z roztworami korozyjnymi w kontrolowanej temperaturze 37°C (310 K). Pomiary właściwości korozyjnych przeprowadzono w 0, 1, 3, 7 i 14 dniu od zamontowania próbek i następnie co 14 dni. Każdorazowo wykonywano pomiary swobodnego potencjału korozyjnego  $E_{cor}$  próbki w otwartym obwodzie, oporu polaryzacyjnego  $R_p$  metodą Stern - Geary'ego i elektrochemicznej spektroskopowej charakterystyki impedancyjnej (EIS) z użyciem potencjostatu / galwanostatu PGSTAT 30 (EcoChemie Autolab). Po zakończeniu pomiarów roztwórow korozyjnych z jednej z próbek analizowano metodą ASA. Dla pozostałych próbek wykonywano pomiary charakterystyk potencjodynamicznych w szerokim zakresie polaryzacji anodowej i pomiary charakterystyk EIS w wybranych potencjałach polaryzacji. Powierzchnię wszystkich badanych próbek analizowano stosując metalograficzny mikroskop optyczny oraz skaningowy mikroskop elektronowy Hitachi S 3000-N.

## Wyniki i podsumowanie

Przebieg zmian swobodnego potencjału korozyjnego  $E_{cor}$  w funkcji czasu kontaktowania się próbek z roztworami korozyjnymi pokazany jest dla badanych stopów na RYS.1. Zmiany potencjału  $E_{cor}$  obydwu stopów w roztworze 0.5 M NaCl są podobne - potencjał ten w ciągu pierwszych 7 dni wzrasta od początkowych ujemnych wartości do wartości dodatnich ok. 0.26 V dla Rex 734 i ok. 0.16 V dla Panacea P558 i następnie wykazuje tylko oscylacje wokół tych wartości. Inaczej zmienia się potencjał korozyjny  $E_{cor}$  w roztworze Tyrode'a. W ciągu pierwszych 7 dni potencjał ten rośnie do wartości bliskich zeru, lecz w kolejnych dniach obniża się tak, że ok. 40. dnia osiąga stałe wartości ok. -0.15 V dla Rex 734 i ok. -0.12 V dla Panacea P558. Przebieg potencjału w pierwszych dniach kontaktowania się próbek z roztworami korozyjnymi jest zgodny z wynikami wcześniej przeprowadzonych badań [6]. Przyczyn takiego zachowania się potencjału korozyjnego w roztworze Tyrode'a można szukać w specyficznej adsorpcji jonu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> na powierzchni próbek.

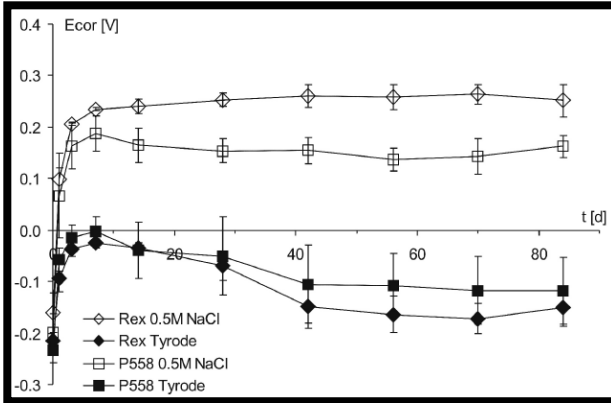
## Materials and methods

Rex 734 and Panacea P558 alloys were discs with a diameter of 28 mm and 30 mm, respectively. Samples' surfaces were grinded, mechanically polished and cleaned in ultrasonically bath [6,7]. Electrochemical investigations were carried out in glass electrolytic cell containing working electrode  $E_w$  (sample), counter electrode  $E_c$  (Pt foil) and reference electrode  $E_{ref}$  (calomel electrode in saturated NaCl solution). All potentials in this paper are given versus used calomel electrode ( $E_0=0.236$  V vs. SHE). Working area of each sample samples was ca. 3.14 cm<sup>2</sup>. Corrosion investigations were performed on 3 samples in 0.5 M NaCl and Tyrode's solutions (0.8 g NaCl, 0.02 g CaCl<sub>2</sub>, 0.02 g KCl, 0.1 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 g MgCl<sub>2</sub>, 0.005 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 100 cm<sup>3</sup> 3-times distilled H<sub>2</sub>O). Total contact time of samples with corrosion solutions at controlled temperature 37°C (310 K). Measurements of corrosive features were performed at 0, 1st, 3rd, 7th and 14th day after mounting the samples and then every 14 day. Each measurement cycle consist of measurement of free corrosion potential  $E_{cor}$  in open circuit, polarization resistance  $R_p$  according to Stern - Geary's method and electrochemical impedance spectroscopic characteristic (EIS) using potentiostat / galvanostat PGSTAT 30 (EcoChemie Autolab). After these measurements corrosion solution from one of three investigated samples was analyzed using atomic absorption spectroscopy AAS. For others samples were measured potentiodynamic characteristics in wide anodic polarization and EIS characteristics in selected polarization potentials. Surfaces of all investigated samples were analyzed using metallographic optical microscope and scanning electron microscope Hitachi S 3000-N.

## Results and conclusions

Dependence of free corrosion potential  $E_{cor}$  versus contact time of samples with corrosion solutions is shown for investigated alloys in FIG.1. The changes of  $E_{cor}$  potential of both alloys in 0.5 M NaCl solution are similar - in first 7th days this potential increases from initial negative to positive values ca. 0.26 V for Rex 734 and ca. 0.16 V for Panacea P558 and next it only oscillates around these values. Corrosion potential  $E_{cor}$  in Tyrode's solution changes in different manner. During 7th first days this potential increases close to zero, but in next days it decreases and from 40th day it reaches stable values ca. -0.15 V for Rex 734 and ca. -0.12 V for Panacea P558. The potential course in the first days of contact of samples with corrosion solutions corresponds to earlier presented our results [6]. The reason for such behavior can be explain by specific adsorption of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ions on samples' surface.

Dependence of polarization resistance  $R_p$  versus time is shown in FIG.2. Polarization resistances  $R_p$  of all investigated samples increase during first 14 or 28 days and then stabilize. Increase of  $R_p$  values in comparison with values in the mounting day amount to ca. 10 times.



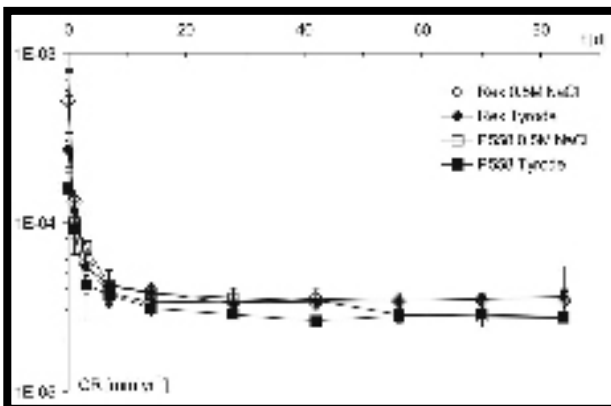
**RYS. 1.** Zależność  $E_{cor}$  od czasu dla stopów Rex 734 i Panacea P558 w roztworach 0.5 M NaCl i Tyrode'a.

**FIG. 1.** Dependence of  $E_{cor}$  vs. time for Rex 734 and Panacea P558 alloys in 0.5 M NaCl and Tyrode's solutions.

Przebieg zmian oporu polaryzacyjnego  $R_p$  w funkcji czasu przedstawiony jest na RYS.2. Opory polaryzacyjne  $R_p$  wszystkich próbek wzrastają w czasie pierwszych 14 lub 28 dni i później się ustalają na stałych wartościach. Zwiększenie się wartości  $R_p$  w porównaniu do dnia zamontowania próbek wynosi ok. 10 razy. Ustalone wartości  $R_p$  zawierają się między ok.  $0.8 \cdot 10^6$  ohm-cm<sup>2</sup> a  $1.1 \cdot 10^7$  ohm-cm<sup>2</sup> i nie wykazują żadnej zależności zarówno od typu stopu jak i od rodzaju roztworu korozyjnego.

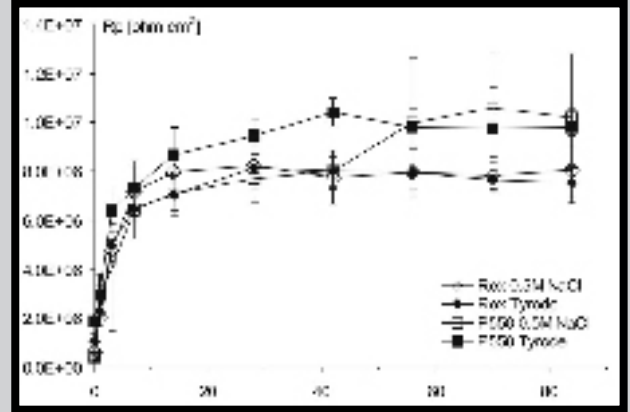
Z wyników pomiarów metodą Stern - Geary'ego wyznaczono gęstości prądów korozyjnych  $i_{cor}$  dla kolejnych dni kontaktowania się próbek z roztworami korozyjnymi. Dla wyznaczonych wartości  $i_{cor}$  obliczono wartości szybkości korozji CR w oparciu o normę ASTM G 102-89 (Reapproved 2004) [8]. Dla obliczenia EW uwzględniono tylko składniki stopu, których zawartość jest nie mniejsza od 1 %. Przebieg szybkości korozji CR od czasu przedstawiony jest na RYS.3. Jak widać szybkość korozji CR po ok. 14 - 28 dniach osiąga stałe wartości praktycznie takie same dla badanych stopów w obu roztworach korozyjnych równe ok.  $3 \cdot 10^{-5}$  mm-rok<sup>-1</sup>.

Przykładowe charakterystyki impedancyjne dla stopu Rex 734 w roztworze 0.5 M NaCl pokazane są na RYS.4 w postaci diagramów Bode. Strzałki wskazują kierunek



**RYS.3.** Zależność szybkości korozji CR od czasu dla stopów Rex 734 i Panacea P558 w roztworach 0.5 M NaCl i Tyrode'a.

**FIG.3.** Dependence corrosion rate CR vs. time for Rex 734 and Panacea P558 alloys in 0.5 M NaCl and Tyrode's solutions.



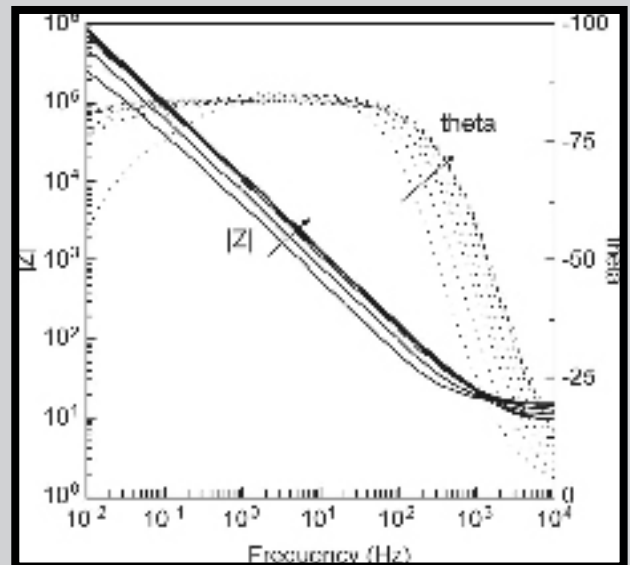
**RYS. 2.** Zależność  $R_p$  od czasu dla stopów Rex 734 i Panacea P558 w roztworach 0.5 M NaCl i Tyrode'a.

**FIG. 2.** Dependence of  $R_p$  vs. time for Rex 734 and Panacea P558 alloys in 0.5 M NaCl and Tyrode's solutions.

Stabilized  $R_p$  values are within ca.  $0.8 \cdot 10^6$  ohm-cm<sup>2</sup> and  $1.1 \cdot 10^7$  ohm-cm<sup>2</sup>, and they do not depend on both type of alloy and corrosion solution.

Corrosion current densities  $i_{cor}$  for consecutive days of contact of samples with corrosion solutions were determined on the basis of Stern-Geary's characteristics. Values of corrosion rates CR were calculated from  $i_{cor}$  according to ASTM standard G 102-89 (Reapproved 2004) [8]. In calculation of equivalent weight were taking into account only elements, which percentage in alloys was not less than 1%. Dependence of corrosion rate CR versus time is presented in FIG.3. As can be seen corrosion rate CR after 14 or 28 days reaches stable value ca.  $3 \cdot 10^{-5}$  mm·yr<sup>-1</sup> for all investigated samples in both corrosion solutions.

Examples of impedance characteristics of Rex 734 in 0.5 M NaCl solution are presented as Bode diagrams in Fig. 4. Arrows indicate how change versus time the parameters characterized impedance. Modulus  $|Z|$  stabilizes quickly, while phase angle  $\Theta$  changes during all time of experiment.



**RYS.4.** Przykładowa zależność impedancji od czasu dla stopu Rex 734 w roztworze 0.5 M NaCl.

**FIG.4.** Exemplary dependence of impedance vs. time for Rex 734 in 0.5 M NaCl solution.

zmian parametrów charakteryzujących impedancję w funkcji czasu. Moduł impedancji  $|Z|$  szybko osiąga stałą wartość, natomiast kąt przesunięcia fazowego  $\Theta$  zmienia się przez cały czas eksperymentu. Elektryczny obwód zastępczy składa się z połączonych ze sobą szeregowo oporu elektrolitu  $R_s$  i dwóch równoległych podukładów CPE i R, z których pierwszy określa właściwości granicy roztwór korozyjny / warstwa tlenkowa, drugi - granicy warstwa tlenkowa / materiał stopu.

Wyniki analiz atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA) roztworów korozyjnych po 84 dniach pokazały, że procentowa zawartość metali Fe, Cr, Ni, Mn i Mo w tych roztworach korozyjnych jest taka sama jak chemiczny skład badanych stopów. Świadczy to jednoznacznie o tym, że korozja tych stopów przebiegająca przy swobodnym potencjale korozyjnym jest korozją równomierną.

Podsumowując krótko uzyskane wyniki można stwierdzić, że długoczasowa korozja stopów Rex 734 i Panacea P558 jest korozją równomierną w potencjale swobodnej korozji i zarówno parametry charakteryzujące korozyjne właściwości obydwu stopów jak i kierunki ich zmian są do siebie bardzo podobne. Tym samym można postawić hipotezę, że właściwości korozyjne tych stopów determinowane są przede wszystkim obecnością Fe i Cr, natomiast obecność Ni - który również koroduje - w stopie Rex 734, nie ma wpływu na te właściwości.

## Podziękowania

*Praca wykonana została w ramach grantu 3T08C 036 27. Autorzy wyrażają podziękowania Prof. P. J. Uggowitzerowi i Böhler Edelstahl GmbH za stop PANACEA P558 oraz J. Borowskiemu - MEDGAL (Białystok) za stop Rex 734.*

Electrical equivalent circuit consists of connected in series uncompensated electrolyte resistance  $R_s$  and two circuits CPE and R which are connected in parallel. The first circuit CPE||R determines properties of corrosion solution / oxide layer boundary, and the second one describes oxide layer / bulk material boundary.

Results of atomic absorption spectroscopy AAS analyses of corrosion solutions after 84 days show that percentages of Fe, Cr, Ni, Mn and Mo elements in analyzed solutions are the same as chemical composition of investigated alloys. These results testified that corrosion processes at free corrosion potentials proceed as uniform corrosion.

Summing up obtained results it can be stated that long-time corrosion at free corrosion potential of Rex 734 and Panacea P558 alloys is a general corrosion. Both parameters characterized corrosive features and directions of their changes are very similar for investigated alloys. So a hypothesis can be proposed that corrosive features of studied alloys are first of all determined by influence of such elements as Fe and Cr, while influence of Ni in case of Rex 734 is negligible.

## Acknowledgements

*This work was supported by grant No. 3 T08C 036 27. The authors thank Prof. P. J. Uggowitzer and Böhler Edelstahl GmbH for PANACEA P558 alloy and J. Borowski - MEDGAL (Białystok) for Rex 734 alloy.*

## Piśmiennictwo

- [1] Marciniak J.: Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice (2002)
- [2] Reclaru L., Lerf R., Eschler P.-Y., Blatter A., Meyer J.M.: Pitting, crevice and galvanic corrosion of REX stainless-steel/CoCr orthopedic implant material, *Biomaterials*, 23, (2002), 3479-3485
- [3] Thomann U.J., Uggowitzer P.J.: Wear-corrosion behavior of bio-compatible austenitic stainless steels, *Wear*, 239, (2000), 48-58
- [4] Pan J., Karlen C., Ulfvin C.: Electrochemical study of resistance to localized corrosion of stainless steels for biomedical applications, *J. Electrochem. Soc.*, 147, (2000), 1021-1025.

## References

- [5] Rondelli G., Torricelli P., Fini M., Giardino R.: In vitro corrosion study by EIS of a nickel-free stainless steel for orthopaedic applications, *Biomaterials*, 26, (2005), 739-744
- [6] Błaszczuk T., Burnat B., Leniart A., Scholl H., Klimek L., Kaczorowski W.: Corrosion features of biomedical alloys REX 734 and PANACEA P558 modified by nanocrystalline diamond, *Inżynieria Biomateriałów*, 58 - 60, (2006), 65 - 68
- [7] Błaszczuk T., Burnat B., Leniart A., Scholl H., Kaczorowski W.: Właściwości korozyjne bezniklowego stopu PANACEA P558 i wpływ warstw NCD na te właściwości, *Inżynieria Materiałowa*, 5 (153), (2006), 878-881
- [8] G 102 - 89 (Reapproved 2004) Standard Practice for Calculation of Corrosion Rates and Related Information from Electrochemical Measurements.

## WPŁYW PROSZKÓW WĘGLOWYCH NA LUDZKIE KRWINKI BIAŁE

KATARZYNA BĄKOWICZ-MITURA<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA CZERNIAK-RECZULSKA<sup>1</sup> ZBIGNIEW BAJ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,  
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA  
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924, ŁÓDŹ

<sup>2</sup> ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII KLINICZNEJ,  
UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁÓDZI  
UL. PL. HALLERA 1, 90-647 ŁÓDŹ  
E-MAIL: BAKOWICZ@P.LODZ.PL, GOSIACZE@P.LODZ.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 32-34]

### Wprowadzenie

Proszek diamentowy ma właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne w kontakcie z organizmem żywym. Ten mechanizm jest prawdopodobnie oparty na reakcji pomiędzy powierzchnią diamentu zbudowaną z nanocząstek i molekułami w żywym organizmie odpowiedzialnymi za toksyczne procesy [1]. Proszki diamentu i grafitu poddano badaniom fizykochemicznym i badaniu biologicznemu na krwinkach białych (leukocytach).

### Metodyka i wyniki

Do badań został wykorzystany proszek grafitowy oraz proszek diamentowy. Proszek grafitowy uzyskano przez roztarcie elektrody grafitowej. Proszek diamentowy został wytworzony metodą detonacyjną i metodą RF PACVD (Radio Frequency Plasma Activated Chemical Vapour Deposition). Aparaturę, na której wytworzony został proszek diamentowy metodą RF PACVD przedstawia RYS.1, natomiast parametry procesu, podczas którego uzyskano ten proszek przedstawia TABELA 1.

	Potencjał / Potential [V]	Przepływ metanu / Flow of methane [sccm]	Czas / Time [min]
Proces RF PACVD Process RF PACVD	500	50	60

TABELA 1. Parametry procesu RF PACVD.  
TABLE 1. Parameter of RF PACVD process.

Badania fizykochemiczne obejmowały morfologię proszków przy użyciu mikroskopów (optycznego i skaningowego mikroskopu elektronowego - SEM) oraz ocenę jakościową i ilościową przy wykorzystaniu metody rentgenowskiej XPS.

#### Morfologia proszków

Proszki obserwowano pod mikroskopem optycznym i skaningowym mikroskopem elektronowym SEM. Wyniki obserwacji proszku grafitowego przedstawia RYS.2, RYS.3 przedstawia obraz proszku diamentowego wytworzonego metodą RF PACVD, natomiast obraz proszku diamentowego detonacyjnego przedstawia RYS.4.

## INFLUENCE OF CARBON POWDER PARTICLES ON HUMAN NEUTROPHILS

KATARZYNA BĄKOWICZ-MITURA<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA CZERNIAK-RECZULSKA<sup>1</sup> ZBIGNIEW BAJ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DIVISIONS OF BIOMEDICAL ENGINEERING, INSTITUTE OF MATERIALS  
SCIENCE AND ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924, LODZ

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF PATHOPHYSIOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ  
PL. HALLERA 1, 90-647 LODZ  
E-MAIL: BAKOWICZ@P.LODZ.PL, GOSIACZE@P.LODZ.PL

[Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 32-34]

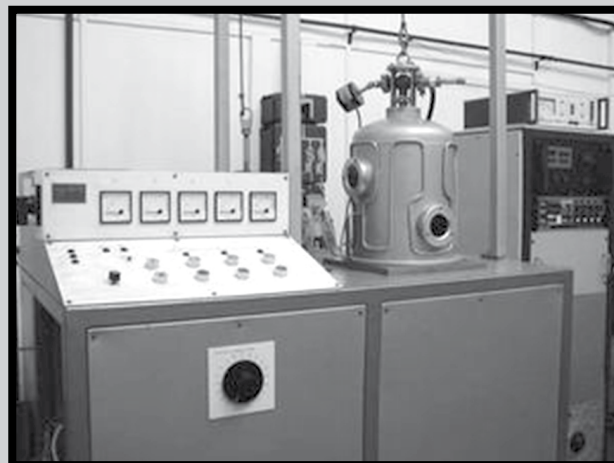
### Introduction

Diamond Powder Particles is the new antioxidant and anti-inflammatory factor in living organism. This mechanism is probably based on the reaction between the surface of diamond in nanoparticles and molecules in living organism, which are responsible for toxic processes [1].

Diamond and graphite powders have been investigated by physicochemical research and biological tests with used of white blood cells (leukocytes).

### Experimental and results

Diamond and graphite powder particles have been tested. Graphite powder particles were obtained by pulping graphite rod. Diamond powder particles were manufactured by detonation method and RF PACVD (Radio Frequency Plasma Activated Chemical Vapour Deposition) method. FIG.1 presents apparatus used to obtain diamond powder RF PACVD and TABLE 1 shows process parameters.

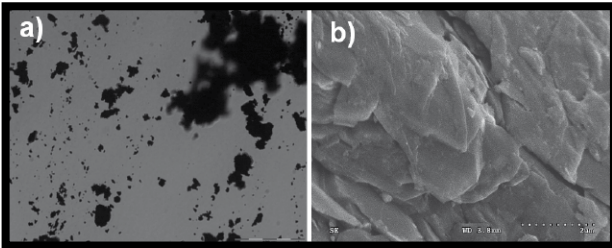


RYS.1. Reaktor plazmochemiczny RF PACVD [2].  
FIG.1. Plasmochemical reactor RF PACVD [2].

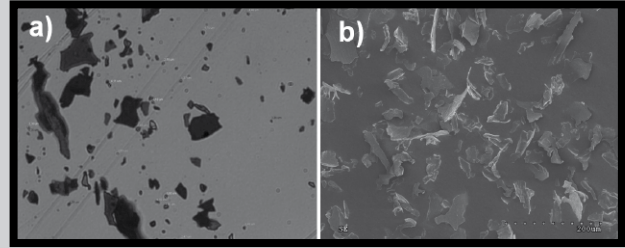
The physicochemical tests included powders morphology by microscopes as well as quantitative and qualitative estimations by used XPS method.

#### Powders morphology

Powders were observed on optical and SEM (scanning electron microscope) microscopes. Results of the observations of graphite and diamond powders are presented on FIG.2, 3 and 4.



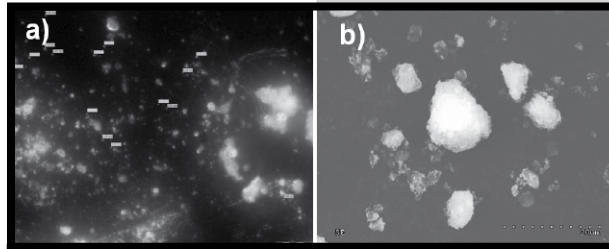
**RYS.2. Proszek grafitowy:**  
a) mikroskop optyczny, 400x ; b) SEM, 200x.  
**FIG.2. Graphite powder particles:**  
a) optical microscope, 400x; b) SEM, 200x.



**RYS.3. Proszek diamentowy RF PACVD:**  
a) mikroskop optyczny, 400x ; b) SEM, 200x.  
**FIG.3. RF PACVD diamond powder particles:**  
a) optical microscope, 400x; b) SEM, 200x.

### Rentgenowska Spektroskopia Elektronowa – XPS [3].

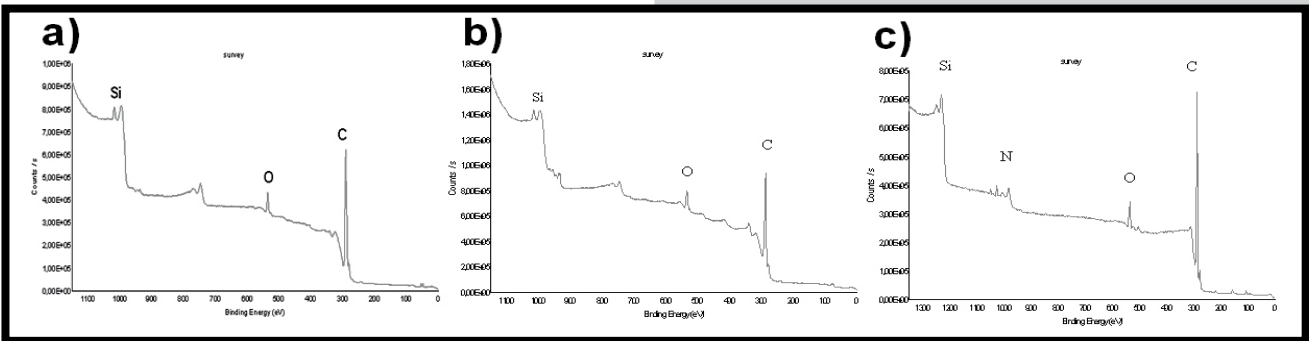
Metoda ta pozwoliła określić jakościowy i ilościowy rodzaj wiązań w proszku grafitowym i diamentowym. Widmo XPS proszku grafitowego przedstawia RYS.5a, proszku diamentowego RF PACVD przedstawia RYS.5b a proszku diamentowego detonacyjnego przedstawia RYS.5c



**RYS.4. Proszek diamentowy detonacyjny:**  
a) mikroskop optyczny, 400x ; b) SEM, 200x.  
**FIG.4. Detonation diamond powder particles:**  
a) optical microscope, 400x; b) SEM, 200x.

### X-ray Photoelectron Spectroscopy – XPS [3].

Presented method was performed to identify qualitative and quantitative bondings character in graphite and diamond powders. XPS spectrum of graphite and diamond powder is presented on FIG.5a, b, c.



**RYS.5. Widmo XPS: a) proszku grafitowego, b) proszku diamentowego RF PACVD, c) proszku diamentowego detonacyjnego.**  
**FIG.5. XPS spectra: a) graphite powder, b) RF PACVD diamond powder, c) detonation diamond powder.**

### Pomiar chemiluminescencji (CL)

Pomiar CL wykonywano chemiluminometrem 1251 Bio-Orbit połączonym z komputerem IBM PC. Test prowadzono w 37°C. Chemiluminescencja była wzmacniana luminalem (rozcieńczonym w 0.4% roztworze NaOH do stężenia 5mg/ml) i badana przy użyciu receptorowo zależnego stymulatora, którym był opsonizowany zymosan – (OZ; 0,3 mg/ml). Opsonizację wykonano poprzez zawieszenie zymosanu w PBS (phosphate buffered solution) i wymieszaniu z autologiczną plazmą 1:1. Następnie próbka była inkubowana przez 30 min w 37°C, następnie odwirowana, przemyta i zawieszona w stężeniu 10 mg/ml.

Każda próbka badana w chemiluminometrze zawierała  $2 \times 10^5$  neutrofilów w 180µl PBS, 20µl luminolu i i 30µl OZ w próbce stymulowanej. Objętość próbki doprowadzano do 1ml przy użyciu PBS. Pomiar był wykonany niezwłocznie po dodaniu granulocytów do medium. Każdy pomiar prowadzony jest podwójnie w czasie 30 min. Wartość CL określona jest polem pod krzywą emisji światła w funkcji czasu – obliczana w ciągu 30 min. To pole odzwierciedla całą emisję światła przez neutrofile w trakcie pomiaru [4].

### Measurement of chemiluminescence (CL)

The measurement of CL was performed with a LUMINOMETER 1251 BioOrbit linked to an IBM PC AT. The test was conducted at  $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The neutrophil CL was enhanced with luminol (diluted with 0.4% solution of NaOH to a concentration of 5 mg/ml) and tested using receptor dependent stimulator: opsonized zymosan (OZ, 0,3 mg/ml). The opsonisation of zymosan was performed by suspending zymosan in PBS and mixing it with autological plasma 1:1 (v/v). Then, the samples were incubated at  $37.0^\circ\text{C}$  for 30 min and centrifuged. After washing, zymosan was suspended in PBS at a concentration of 10 mg/ml.

Each of the studied samples contained:  $2 \times 10^5$  neutrophils in 180µl of PBS, 20µl of luminol and 30µl of OZ. The samples were brought to a final volume of 1ml with PBS. The analysis was performed immediately after the addition of granulocytes to the medium. Each measurement was conducted in duplicate during 30 min. The CL was defined as the area under the light emission curve as the function of time, calculated during 30 min. The area reflects the entire emission of light by the cells during the measurement [4].

1. Proszki węglowe oglądane w mikroskopie optycznym i skaningowym różnią się strukturą ziaren.
2. Proszki diamentowe wytwarzane metodą plazmochemiczną mają 23% wiązań  $sp^3$  w porównaniu z proszkami diamentowymi wytwarzanymi metodą detonacyjną, które mają 80% wiązań  $sp^3$  mierzonych metodą XPS.
3. W badaniach biologicznych obserwujemy różnice w aktywności i żywotności ludzkich neutrofilów w obecności proszków diamentowych wytwarzanych różnymi metodami. Proszek grafitowy jest prawdopodobnie obojętny dla ludzkich leukocytów.

## Piśmiennictwo

- [1] K.Bakowicz: Bioaktywność diamentu, Praca Doktorska, Politechnika Łódzka 2003.
- [2] P.Niedzielski, E.Mitura, S.Mitura, P.Przymusiła, S.Der-Sahagian, E.Strayga, J.Żak, A.Sokołowska, J.Szmidt, A.Stanishevsky, J.J.Moll, J.A.Moll: Comparison of the surface structure of carbon films deposited by different methods, *J Diamond and Related Materials* 6, 721-724 (1997).

## Conclusions

1. Carbon Powders Particles have different shapes and structures on SEM picture and optical microscope.
2. RF PACVD Diamond Powders Particles have less  $sp^3$  bondings (about 23%), than Detonation Diamond Powder Particles (about 80 %) measuring by XPS method.
3. In biological research we observed differences between activity and viability of neutrophils in presence Diamond Powder Particles manufacturing by various methods. Graphite powder is probably neutral for human neutrophils.

## References

- [3] Y.Taki, O. Takai: XPS structural characterization of hydrogenated amorphous carbon thin films prepared by shielded arc ion plating, *Thin Solid Films*, vol.316, Issues 1-2, 21 March 1998, Pages 45-50.
- [4] J.Kantorski, H.J.Tchórzowski: Biolumines. Chemilumines. 7, 1992, 37-45.

## STRUKTURA WARSTW WĘGLOWYCH WYTWORZONYCH NA STOPACH NiTi WYKAZUJĄCYCH PAMIĘĆ KSZTAŁTU

J. LELĄTKO, T. GORYCZKA, E. RÓWIŃSKI, P. PAĆKOWSKI, A. DRDZEŃ, H. MORAWIEC

UNIWERSYTET ŚLĄSKI, INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, 40-007 KATOWICE, UL. BANKOWA 12, POLSKA  
E-MAIL: JLELATKO@US.EDU.PL

*[Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 34-36]*

### Wstęp

Charakterystyczne własności stopu NiTi takie jak efekt pamięci kształtu, nadspężystość i dobra biokompatybilność powodują, iż jest on doskonałym materiałem medycznym do zastosowań w ortopedii, technice dentystycznej, chirurgii naczyniowej i organów. Jednakże duża zawartość niklu w stopie NiTi oznacza możliwość uwalniania toksycznych dla człowieka jonów niklu [1]. Aby zmniejszyć to zagrożenie i poprawić biologiczną odporność, powierzchnię stopu NiTi pokrywano warstwą ochronną. Warstwy węglowe, zwłaszcza warstwy diamentopodobne (DLC), są dobrym materiałem na tego rodzaju pokrycia ochronne, które wystarczająco dobrze ochronią ludzkie ciało [2,3]. Badania dowodzą, iż warstwy DLC mają lepszą biokompatybilność niż warstwy składające się z grafitu [4].

W niniejszej pracy badania skoncentrowane były na określeniu struktury fazowej warstw węglowych osadzonych na podłożu NiTi metodą chemicznego osadzania z par wspomaganego wyładowaniami plazmowymi o radiowej częstotliwości (RFPECVD).

## STRUCTURE OF THE CARBON LAYERS ON NiTi SHAPE MEMORY ALLOY

J. LELĄTKO, T. GORYCZKA, E. RÓWIŃSKI, P. PAĆKOWSKI, A. DRDZEŃ, H. MORAWIEC

UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, 40-007 KATOWICE, UL. BANKOWA 12, POLAND  
E-MAIL: JLELATKO@US.EDU.PL

*[Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 34-36]*

### Introduction

The characteristic properties of NiTi alloy like shape memory effect, superelasticity and good biocompatibility, make possible to use it as an excellent biomaterial for orthopaedics, dental application, vascular and organ surgeries. However, high nickel content in NiTi alloy and potential nickel ions, causing toxic reactions in humans [1]. To decrease this menace and improve the biological resistance, surface of NiTi alloy has been covered by a protective layer. Carbon covers has been found as a good candidate for the layer, which sufficiently protect human body, especially, a diamond-like carbon layer (DLC) [2,3]. The investigations show that DLC layer have better biocompatibility than graphite-like carbon layer [4].

In the present work the studies were focused on structure of the carbon layers deposited on the NiTi alloy using radio frequency plasma enhanced chemical vapour process.

### Experimental

The Ni(50.6at%)Ti shape memory alloy was used as a substrate for the carbon layer deposition. First, a surface of NiTi plates was mechanically polished to ensure good adhesive properties of the layers. Part of the samples was passivated by autoclaving in water steam at 130°C for 30 minutes.

## Materiał i metodyka badań

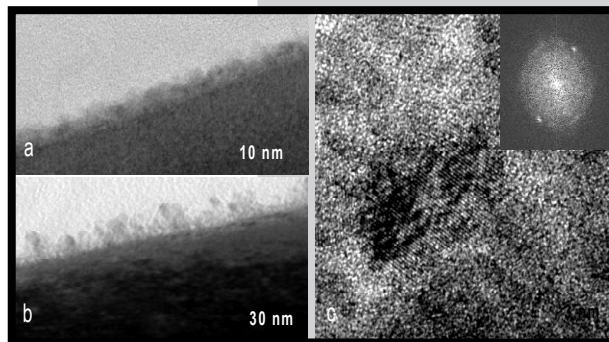
Jako podłoże dla warstw węglowych użyto stopu z pa-  
mięcią kształtu Ni(50.6at%)Ti. Najpierw powierzchnię płytek  
NiTi wypolerowano mechanicznie, aby zapewnić dobrą ad-  
hezję warstw. Część próbek została wstępnie spasywowana  
w autoklawie przy użyciu strumienia pary wodnej o tempera-  
turze 130°C w czasie 30 minut. Warstwy osadzono metodą  
chemicznego osadzania z par wspomaganego wyładowa-  
niami plazmowymi o radiowej częstotliwości (RFPECVD)  
w średniej temperaturze 150°C w czasie 5 i 20 minut  
w Instytucie Technologii Eksploatacji w Radomiu.

Grubość, chropowatość powierzchni i granicy międzyfa-  
zowej, gęstość warstwy węglowej jak również fazy macie-  
rzystej podłoża wyliczono z pomiarów reflektometrycznych  
promieniowania rentgenowskiego. Do analizy składu  
chemicznego użyto spektroskopii Augera. Identyfikację fa-  
zową przeprowadzono przy pomocy wysokorozdzielczego  
mikroskopu elektronowego JEM 3010.

## Wyniki badań

W celu obserwacji struktury otrzy-  
many warstw oraz ich połączenia  
z podłożem z NiTi preparaty do badań  
mikroskopowych wykonywano metodą  
przekrojów poprzecznych. Obserwa-  
cje mikroskopowe wykazały dużą chropowatość warstw (RYS. 1).  
Strukturę warstw tworzą nanocząstki o wielko-  
ści kilku nanometrów rozmieszczone  
w amorficznej osnowie. Na podstawie  
odległości między płaszczyznowych  
obliczonych przy pomocy transformaty  
Fouriera z obrazów wysokorozdziel-  
czych, dokonano identyfikacji fazowej  
(FIG. 1c). Wykazano, iż nanocząstki  
te tworzą: diament, TiC oraz TiO<sub>2</sub> [6].  
Zwiększenie czasu osadzania warstw  
węglowych wpływa na ich grubość  
oraz wielkość nanocząstek. Warstwy  
węglowe zawierają w dalszym ciągu  
dużą ilość fazy amorficznej.

Badania przeprowadzone przy  
pomocy reflektometrii rentgenowskiej  
potwierdzają i uzupełniają wyniki uzyskane przy pomocy  
transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TABELA 1).  
Wyniki te ukazują, iż cienka warstwa tlenku tytanu po-  
wstała podczas procesu pasywacji na wypolerowanej  
powierzchni zwiększa grubość osadzonej warstwy. Konse-  
kwencją tego jest większa bariera dla dyfuzji jonów niklu.



**RYS.1. Obrazy TEM warstw węglowych osadzanych: a) w czasie 5 minut na wypolerowanej powierzchni; b,c) w czasie 20 minut na powierzchni spasywowanej.**

**FIG.1. TEM images of carbon layer deposited for 5 minutes on mechanically polished surface (a) and deposited for 20 minutes on previously passivated surface (b,c).**

The layers were deposited using radio frequency plasma enhanced chemical vapour process (RFPECVD) at average temperature 150°C for 5 and 20 minutes (the layers were deposited in Institute for Sustainable Technologies, National Research Institute in Radom).

The thickness, surface roughness, interface roughness and density of the carbon layers as well as the metal matrix were calculated from the X-ray reflectivity measurement. The Auger spectroscopy was used for chemical analyses. The phase identification of the layers was done using the high resolution electron microscopy JEM 3010.

## Results

In order to observe the structure of the layers and their coherency with the NiTi matrix thin foils for TEM were prepared from the cross-section of the flat specimens. The TEM images show the high roughness of the layers (FIG.1). Inside the layers the nanocrystalline particles were observed in the amorphous matrix. The size of those particles is several nanometers. Basing on the inter-planar distances calculated from the FFT pattern obtained from

the high resolution image (FIG.1c), the phase identification was carried out. It has been found that the nanoparticles were created from the diamond, TiC and TiO<sub>2</sub> phases [6]. The increase of deposition time of the carbon layer influences on the thickness and size of the nanoparticles. Inside the carbon layer, there is still large amount of the amorphous phase.

The TEM observations are compatible with the results obtained from the X-ray reflectivity measurements (TABLE 1). These results show that the thin titanium oxide layer created during passivation

process on the mechanically polished surface [5] increases the thickness of the deposited carbon layer. In consequence, it creates thicker barrier against of nickel ions diffusion. Lower amount of the nickel ions in the bottom part of the carbon layer deposited on the passivated surface were found basing on the Auger spectroscopy (TABLE 2).

Powierzchnia NiTi / Surface of NiTi		Grubość / Thickness [nm]	Chropowatość / Surface roughness [nm]	Gęstość / Density [g/cm <sup>3</sup> ]
polerowana mechanicznie / mechanical polished	NiTi	-	13.4	6.147
	Warstwa węglowa / Carbon layer	32.1	8.2	3.245
polerowana mechanicznie oraz pasywowana / mechanical polished and passivated	NiTi	-	9.44	6.413
	Warstwa węglowa / Carbon layer	57.33	49.14	4.826

**TABELA 1. Wyniki reflektometrii dla warstw węglowych osadzanych w czasie 20 minut.**  
**TABLE 1. The results of the XRR measurements of carbon layers deposited for 20 min.**



Powierzchnia NiTi / Surface of NiTi	Trawienie jonowe / Ion sputtering	Skład chemiczny / Chemical composition, % at.				
		Cl	C	Ti	O	Ni
polerowana mechanicznie / mechanical polished	I	1,1	77,9	2,5	18,3	-
	II	1,6	49,8	6,8	25,7	15,8
polerowana mechanicznie oraz pasywowana / mechanical polished and passivated	I	0,8	55,6	12,8	30,6	-
	II	-	58,9	6,8	25	9

**TABELA 2. Skład chemiczny warstw węglowych osadzanych w czasie 20 minut.**  
**TABLE 2. Chemical composition of the carbon layers deposited for 20 minutes.**

Niższa zawartość jonów niklu w dolnej części warstwy węglowej osadzonej na pasywowanej powierzchni została potwierdzona przy pomocy spektroskopii Augera (TABELA 2). Wyniki wykazują również zwiększoną zawartość tytanu i tlenu pod powierzchnią warstwy węglowej. Stosunek składu atomowego tych pierwiastków wskazuje na zawartość  $TiO_2$  w strukturze tej części warstwy. Dalsze trawienie jonowe wykazuje obecność atomów niklu w dolnej części warstwy. Metoda przygotowania powierzchni przed procesem osadzania warstwy węglowej wpływa, więc na ilość niklu w jej dolnej części. Obecność warstwy tlenkowej, otrzymanej w wyniku procesu autopasywacji po mechanicznym polerowaniu, odgrywa w tym mechanizmie pomniejszą rolę.

Szczegółowa analiza głównych pików węgla na spektrach Augera pokazuje, iż dla górnej części warstwy dominujące są stany energetyczne świadczące o konfiguracji elektronicznej typowej dla wiązania  $sp^3$ . Zidentyfikowana, tą metodą, warstwa diamentopodobna (DLC) zawiera dodatkowo grafit i diament.

## Wnioski

- Warstwy węglowe osadzone na powierzchni NiTi przy pomocy metody chemicznego osadzania z par wspomaganego wyładowaniami plazmowymi o radiowej częstotliwości (RFPECVD), posiadają strukturę nano-kompozytu. W osnowie warstwy DLC stwierdzono obecność nanocząstek diamentu i grafitu.
- Wysokie stężenie tlenu i tytanu w środkowej części warstwy, uzyskanej na spasywowanej w autoklawie powierzchni, skutkuje obecnością w tej części warstwy nanocząstek  $TiO_2$  oraz TiC.
- Warstwy węglowe pokrywające stop NiTi eliminują obecność jonów niklu na powierzchni.
- Cienkie amorficzne warstwy tlenku tytanu powstałe podczas pasywacji w autoklawie w strumieniu pary wodnej zmniejszają migrację jonów niklu do dolnej części warstwy węglowej.

## Podziękowanie

Praca współfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (PBZ-4/RJP3/06).

These results show the higher amount of titanium and oxygen under the surface of the carbon layer produced on the passivated layer. The ratio of the atomic concentration of these elements indicates that the  $TiO_2$  oxides are present in the structure of this part of the layer. Further ion etching shows the presence of nickel atoms in the bottom part of the layer. The method of surface preparing before the deposition of carbon layer influence the quantity of the nickel in the layer. The presence of oxide layer, as an effect of autopassivation process after mechanical polishing, plays in this process minor role.

The detailed analysis of the main peaks of carbon on the Auger spectra revealed that the electronic states of the layer top has the DLC type with the dominant electron configuration  $sp^3$  type bonding [6]. The identified DLC layer is inhomogeneous in respect of the phase. Moreover, in the DLC structure the diamond and graphite phases appear simultaneously.

## Conclusions

- The carbon layers deposited on NiTi surface, applying radio frequency plasma enhanced chemical vapour deposition process (RFPECVD), possess the nano-composite structure. In the diamond-like (DLC) matrix the nanoparticles of diamond and graphite were identified.
- The layer obtained on the passivated surface by autoclaving contains, in the middle part, high amount of titanium and oxygen. Due to that the nano-particles of the  $TiO_2$  and TiC phase were created.
- The carbon layers covering the NiTi alloy eliminate the presence of the nickel ions on the surface.
- The thin amorphous layer of titanium oxides created during passivation by autoclaving in water steam reduces migration of nickel atoms to the bottom part of the carbon layer.

## Acknowledgements

This work was supported financially by the Ministry of Science and High Education (project PBZ-4/RJP3/06).

## Piśmiennictwo

- [1] Kapanen A., Ilvesaro J., Denilov A., Rychänen J., Lehenkari P., Tukkanen J., *Biomaterials*, 23 (2002) 645-650
- [2] Fyta M.G., Mathioudakis C., Kopidakis G., Kelires P.C., *Thin Solid Films*, 473 (2005) 56-62
- [3] Yanga W. J., Sekino T., Shim K. B., Niihara K., Auh K. H., *Thin Solid Films*, 473 (2005) 252-258

## References

- [4] LaVana D. A., Paderab R. F., Friedmann T. A., Sullivand J. P., Langere R., Kohanef D. S., *Biomaterials*, 26 (2005) 465-473
- [5] H. Morawiec, J. Lelątko, G. Stergioudis, T. Goryczka, A. Winiarski, P. Paćzkowski, *Inżynieria Materiałowa*, 37 (2004) 32-35
- [6] J. Lelątko, T. Goryczka, E. Rówiński, P. Paćzkowski, A. Drdzeń, H. Morawiec, *Inżynieria materiałowa*, (2007) (w druku)

# DYNAMIKA ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWYCH POD WPŁYWEM ROZTWORU FIZJOLOGICZNEGO W BIOSZKŁACH OTRZYMANÝCH Z ŻELU

STANISŁAWA SZARSKA<sup>1</sup>, AGATA WÓJCIK<sup>2</sup>, BOGDAN BARWIŃSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT FIZYKI, POLITECHNIKA WROCLAWSKA, WROCLAW

<sup>2</sup> INSTYTUT FIZYKI, UNIwersYTET OPOLSKI, OPOLE

<sup>3</sup> INSTYTUT FIZYKI, UNIwersYTET WROCLAWSKI, WROCLAW

## Streszczenie

*Szklá i amorficzne materiały silnie różnią się właściwościami dynamicznymi od ich krystalicznych odpowiedników. W kryształach typowymi ekscytacjami są fonony. Nieuporządkowanie struktury w szklach obniża średnią drogę swobodną wszystkich fononów.*

*W tej pracy przedstawiono model pasmowy dielektryka, w którym znajdują się dodatkowe pasma emisyjne. Źródłem tych pasm są defekty powstające w wyniku oddziaływania roztworu fizjologicznego. Te badania wskazują, że roztwór fizjologiczny wpływa nie tylko na powierzchniową warstwę biomateriału, ale także na strukturę poziomów energetycznych.*

[*Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 37-39*]

## Wstęp

Shi w swojej książce [1] formułuje pytanie, czy są podstawowe zależności między strukturą sieciową materiałów i bioaktywnością? Zgodnie z definicją Hencha [2] bioaktywny materiał powoduje specyficzną biologiczną odpowiedź w miejscu zetknięcia się materiału z tkanką, w wyniku czego tworzy się wiązanie na tej międzypowierzchni. Obecnie do materiałów bioaktywnych zalicza się niektóre fosforany wapnia, bioaktywne szkła, oraz bioaktywne powłoki nałożone na podłoża ceramiczne lub metale. W temperaturze ciała, tylko dwa rodzaje fosforanów wapnia są stabilne, gdy biomateriał jest poddany działaniu roztworu fizjologicznego. Jednym z nich jest bruszyt, drugim hydroksyapatyt (HA). Biologiczne apatyty są podobne do syntetycznego HA, ale różnią się od HA składem, stechiometrią, oraz fizycznymi i mechanicznymi właściwościami. Biologiczne apatyty mają z reguły niedobór wapnia powstający w wyniku różnych podstawień w regularnej strukturze HA [1].

Powierzchnia materiału implantacyjnego może być mocno zmieniona w wyniku procedury otrzymywania materiału oraz zewnętrznych czynników. W pracy przebadano wpływ roztworu fizjologicznego na właściwości powierzchniowe bioszkieł otrzymanych metodą zol-żel, nieznacznie różniących się składem chemicznym. Celem badań było, potwierdzenie bioaktywności poprzez sprawdzenie za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM) i metod absorpcyjnych czy i jak szybko warstwa hydroksyapatytu powstaje na powierzchni tych szkieł podczas przetrzymywania ich w różnych czasach w roztworze fizjologicznym.

## Preparatyka próbek

Zgodnie z wcześniejszymi badaniami [3,4] otrzymano 2 typy bioszkieł o założonym składzie:  $36\text{CaO}$ ,  $60\text{SiO}_2$ ,  $4\text{P}_2\text{O}_5$  (mol%). Otrzymano żel z następujących składników: TEOS,

# SURFACE DYNAMIC PROPERTIES UNDER PHYSIOLOGICAL SOLUTION INFLUENCE OF GEL-DERIVED BIOGLASS

STANISŁAWA SZARSKA<sup>1</sup>, AGATA WÓJCIK<sup>2</sup>, BOGDAN BARWIŃSKI<sup>3</sup>,

<sup>1</sup> INSTITUTE OF PHYSICS, WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, WROCLAW, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF PHYSICS, UNIVERSITY OF OPOLE, POLAND

<sup>3</sup> INSTITUTE OF PHYSICS, UNIVERSITY OF WROCLAW, POLAND

## Abstract

*Glasses and amorphous materials strongly differ in their dynamic properties from their crystalline counterparts. In crystal the typical excitations are phonons. In glasses disorder reduces the mean free path of all phonons. Typical for glasses are- coexisting with the long wavelength phonons- additional low energy excitations: tunneling and relaxations.*

*In this paper presented the dielectrics band model an addition emission centers took place. The source of this addition levels was the defected influence of physiological solution. These investigations indicate that the solution influence not only for surface of biomaterials, but also on structure of their energy levels.*

[*Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 37-39*]

## Introduction

Shi in his book [1] formulates a question: are there fundamental relationships between materials lattice structures and bioactivity? According to Hench [2] a bioactive material caused a specific biological response at the interface of the material which results in the formation of a bond between the tissues and the material. At present, bioactive materials include some calcium phosphate compounds, bioactive glasses, bioactive coating deposited on ceramic or metal substrates. At body temperature, only two calcium phosphates are stable when the biomaterial is in contact in physiological solution. One of them is brushite, the second is hydroxyapatite (HA). Biological apatites are usually calcium-deficient as a result of various substitutions at regular HA lattice points.

The surface of implant materials may be highly variable as a result of preparative procedure and external agent. The aim of the investigations was to confirm the bioactivity of the biogel glasses by checking, using AFM and absorption method whether a layer of hydroxyapatite is formed on the surface of these glasses while they are kept in various time on physiological solution.

## Experimental procedures

In agreement with earlier investigation [3,4] 2 types of biogel glasses with the nominal compositions was  $36\text{CaO}$ ,  $60\text{SiO}_2$ ,  $4\text{P}_2\text{O}_5$  (mol%) were obtained.

The basic gel has been prepared from the mixture of: tetraethoxysilane TEOS -  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ; calcium nitrate tetrahydrate  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  dissolved in distilled water; triethylphosphate  $\text{OP}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3$ , ethanol  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  as organic solvent, hydrochloric acid HCL as catalyst of the

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O rozpuszczony w wodzie destylowanej; trietanolan fosforu OP(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>3</sub>, alkohol etylowy C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, kwas solny HCl jako katalizator reakcji hydrolizy. Stosunek objętości TEOS: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH:HCl wynosił 10:20:0,04 (próbka J); 10,2:11,53:0,48 (próbka L). Ten hydrolizat mieszano 2 godziny. Metodą zanurzeniową nakładano żel na szkiełka podstawkowe. Tak otrzymane próbki przetrzymywano w temperaturze pokojowej przez 3-6 tygodni. Następnie próbki były suszone w temperaturze 120°C, a potem wygrzewane w piecu z szybkością 5C<sup>o</sup>/min do 450°C i przetrzymywane w tej temperaturze 1 godzinę. Symulowany roztwór fizjologiczny (SBF) otrzymano zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Kokubo [5].

## Wyniki i dyskusja

Zmiany na powierzchni materiałów otrzymanych z żelu powstające w wyniku oddziaływania roztworu fizjologicznego zostały określone za pomocą obserwacji morfologii materiału w mikroskopie sił atomowych (AFM). Wzrost warstwy powierzchniowej w wyniku oddziaływania SBF z powierzchnią bioszkiełka powoduje naruszenie równowagi jonowej, uwodnienie szkieletu krzemianowego i powstawanie grup Si-OH. Łączka i in. [4] ustaliła, że materiał otrzymany z żelu w porównaniu do odpowiedniego materiału otrzymanego z wytopu ma na pewno znacznie bardziej chemicznie reaktywną strukturę ze względu na jego porowatość i znacznie bardziej rozwiniętą powierzchnię. Ta porowata powierzchnia otrzymana metodą zol-żel jest około 80 razy większa, niż odpowiednia powierzchnia szkła z wytopu.

Na RYS. 1A,B można zaobserwować charakterystyczne pory, w których rozpoczyna się proces wzrostu warstwy hydroksyapatytu. RYS. 1C przedstawia dynamiczne zmiany topografii pora w czasie działania roztworu fizjologicznego przez okres 75 minut. Porównując próbki J i L (nieznacznie różniące się składem chemicznym matrycy), widać, że warstwa J jest bardziej równomiernie pokryta porami niż próbka L. Największe zmiany narostu warstwy hydroksyapatytu obserwujemy w ciągu pierwszych 3 minut po zanurzeniu próbki w roztworze.

W TABELI 1 przedstawiono średnią wartość wysokości i szerokości wybranych porów A,B,C widocznych na RYS. 1.

Gwałtowne obniżenie się transmisji fali elektromagnetycznej w czasie pierwszych godzin oddziaływania SBF na wytopione szkła, wskazują na największe zmiany w strukturze powierzchni [6,7]. Szkła krzemianowe zawdzięczają widmo absorpcji w obszarze UV dwóm czynnikom: jednym jest absorpcja matrycy (absorpcja podstawowa), drugim czynnikiem jest absorpcja spowodowana domieszkami. Neutralny wakans tlenowy jest najbardziej rozpowszechnionym defektem, ponieważ jest energetycznie najbardziej korzystny. Pasma absorpcji w obszarze 5,2eV, odpowiadające temu defektowi w krzemionce nosi nazwę B<sub>2</sub>, podobny defekt obserwujemy zarówno dla próbek szkła J, jak i L (około 230nm) (RYS.2). Krawędź absorpcji dla bioszkiełka otrzymanego z żelu obserwujemy w ultrafioletcie około 310 nm dla szkła J i 330nm dla szkła L. Przesuwanie się krawędzi absorpcji w wyniku oddziaływania roztworu fizjologicznego można wiązać z przepływem ładunku między jonami wapnia i ligandami matrycy szklanej. W przypadku warstwy żelu struktura szklista powstaje, gdy jony wapnia znajdują się wewnątrz więzby szklistej

reaction of hydrolysis. Volume ratio of TEOS: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH:HCl was 10:20:0,04 (J sample); 10,2:11,53:0,48 (L sample). These hydrolyzed mixed about 2 hours. By spin-coating method, the coated k9 glass substrates gelations have been obtained. Then these films were pulled out from gel and aged at room temperature for a 3-6 weeks. After them, these samples were moved into an oven at 120°C for 7 days. The dried gels were heated in air at 5°C/min speed to 450°C and kept it about 1 h. Simulated Body Fluid (SBF) was prepared agree Kokubo method [5].

## Result and discussion

Changes on the surface of gel-derived materials as the result of contact with SBF were determined by surface morphology observations of the materials with atomic force microscope (AFM). The increase of surface layer, as a result of contact SBF with surface of glass of CaO- SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system, was the result of an ionic equilibrium disturbance in the solution due to hydration of the silicate framework and formation of Si-OH groups. Łączka et al [4] established, that the gel-derived material compared with that observed in the corresponding melt-derived material, was undoubtedly due to the more chemically reactive structure of gel-derived materials because of their porosity and increased surface development. This is supported by the fact that the specific porous surface of gel-derived glass was about 80 times greater than the melt derived.

On FIG. 1A,B it occurred the characteristic pore (A, B, C), on which it started HA crystallite growth. FIG. 1C presented the dynamic changes of topography of bioglass during 75 min. soaking in SBF. In comparison J and L (slightly differentiates in chemical composition) samples, we showed that J film is more homogeneously than L film. The most change of pore profile we observed in first minutes during soaking in SBF (FIG. 1C).

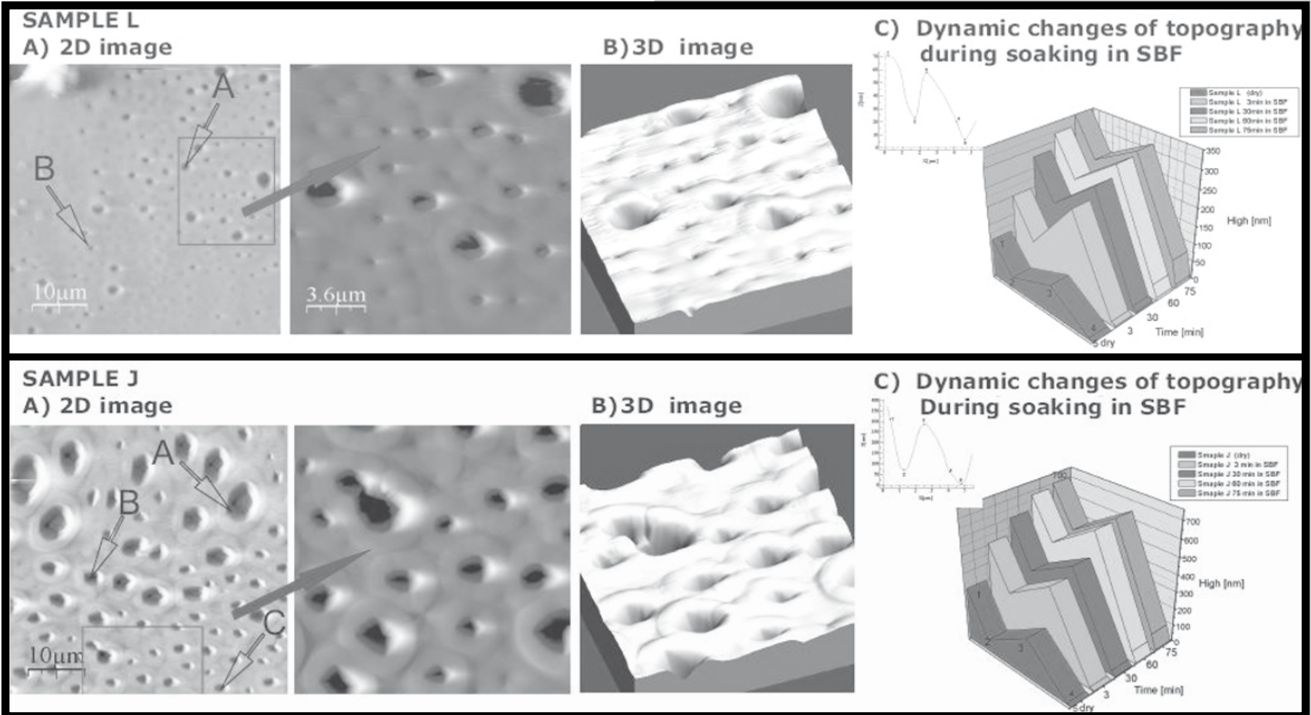
In TABLE 1 are presented the average value height and size of investigated films. The height of J film is 3 times more than the L film.

Rapid decrease of transmittance value for the first hours of SBF interaction for melted bioglass indicate on most intensive changes in surface structure [6,7]. Silicate glasses owe their absorption spectrum in UV region to two factors: one is absorption by the matrix (the fundamental absorption), the other is absorption by the impurities. Neutral oxygen vacancy is the most common intrinsic defect since it is energetically favored. The absorption bands attributed to this defect in silica are the B<sub>2</sub>, around 5,2eV, the similar defect are as well

J as L glass sample we observed (about 230 nm absorption band) (FIG.2). The absorption edge of gel derived bioglass was observed in UV region around 310nm (J sample) and 330nm (L). The shifting of absorption edge during SBF soaking can be explained as charge transfer between Ca<sup>2+</sup> metals and ligands of the glass matrix. In particular case of sol-gel film, the glassy network

Próbka / Sample	Średnia wysokość poru / Average pore height [μm]			Średnia szerokość poru / Average pore size [μm]		
	Typ poru / Pore type			Typ poru / Pore type		
	A	B	C	A	B	C
J J "dry"	0,6	0,63	0,35	6,5	4,0	2,0
J po 1h w SBF J after 1h in SBF	0,7	0,68	0,43	7,6	4,8	2,5
L L "dry"	0,2	0,15	-	2,2	1,5	-
L po 1h w SBF L after 1h in SBF	0,25	0,2	-	2,6	1,7	-

**TABELA 1. Średnie wartości profilu porów na powierzchni bioszkiełek otrzymanych z topografii AFM.**  
**TABLE 1. Average height profile of surface structure of bioglasses obtained by AFM topography.**

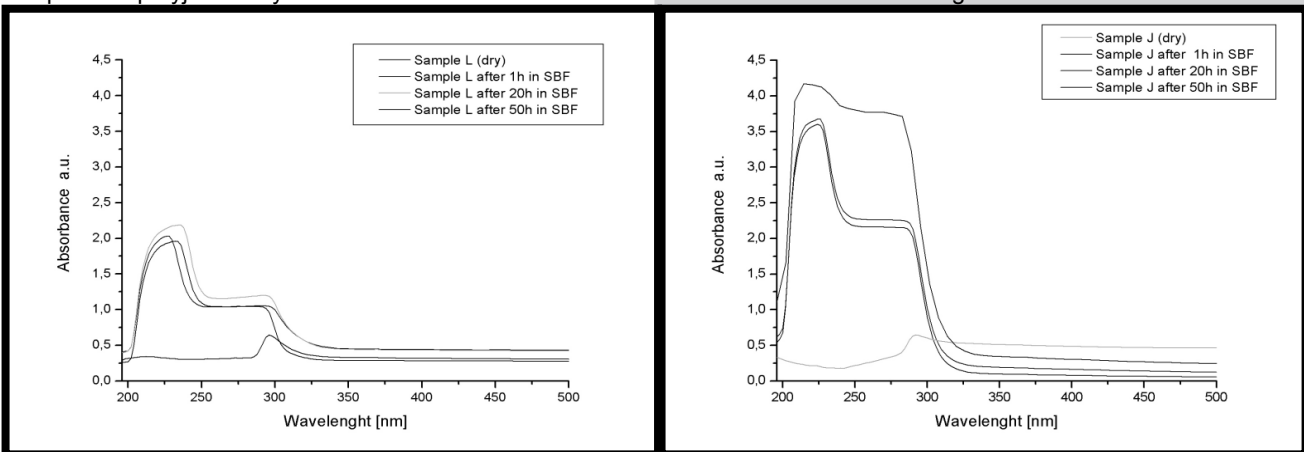


**RYS.1. A), B)** obraz powierzchni bioszkieł otrzymanych za pomocą mikroskopu sił atomowych; **C)** Dynamiczne zmiany topografii pora podczas oddziaływania roztworu fizjologicznego  
**FIG.1. A), B)** The AFM images of gel-derived bioglass film after 1 hour soaking in SBF; **C)** The dynamic changes of topography of bioglass during 75 min soaking in SBF.

i stąd otaczające je atomy nie są w stanie zmniejszyć pustek w strukturze, dzięki czemu ułożenie jonów jest łatwiejsze. Oddziaływania chemiczne na powierzchnię są zawsze związane z mechaniczną jej rekonstrukcją. W przypadku bioszkieł otrzymanych z żelu prowadzi to do jednoczesnego uwalniania się i rekombinacji ładunków powierzchniowych. Ten proces sprzyja bioaktywności materiału.

is formed when the calcium ions are already inside the matrix, and therefore, the atoms are not constricted to fill available positions, but accommodation of ion is easier.

Chemical surface interactions are always connected with mechanical reconstruction of the surface. In the case of gel-derived bioglass there is a simultaneous separation or recombination of charges.



**RYS.2. Widma absorpcji: a) próbki L, b) próbki J, dla różnych czasów oddziaływania SBF.**  
**FIG.2. Absorption spectra of: a) sample L, b) sample J, for different time of SBF exposure.**

## Piśmiennictwo

- [1] Shi D., Biomaterials and tissue engineering, Springer, 2004
- [2] Hench L.L. Biomaterials: a forecast for the future, Biomaterials. 1998. 19:1419-1423.
- [3] Pereira, M.M., Clark, A.E., Hench, L.L. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, J.Biomed. Mater. Res., 1994, 28, 693-698
- [4] Laczka M., Cholewa-Kowalska K., Laczka-Osyczka A., Tworzycio M., Turyna B., Gel-derived materials of CaO- P2O5- SiO2 system modified by boron, sodium, magnesium, aluminium, and fluorine compounds, J.Biomed. Mat. Res., 52, 4, 2000, 601-612

## References

- [5] Kokubo T., Kushitani H., Ohtsuki C., Sakka K., Yamamuro T., Effects of ions dissolved from bioactive glass and glass ceramics with simulated body fluid, J.Mater.Sci.Mater. Med. 1992, 3, 78-83
- [6] Yan H., Zhang K., Blanford Ch. F., Francis L.F. Stein A., In vitro hydroxycarbonate apatite mineralization of CaO-SiO2 sol-gel glasses with three-dimensionally ordered macroporous structure, Chem. Mater., 2001, 13, 1374-1382
- [7] Borsowska A., Szarska S., Jasiorski M., Maruszewski K., Stręk W., Optical and structural properties of sol-gel derived bioactive glasses, Optica Appl., 2003, 33, 1, 107-114

# WARSTWA PLATYNOWA DLA OCHRONY TAŚM STOPU NiTiCu WYKAZUJĄCEGO EFEKT PAMIĘCI KSZTAŁTU

T. GORYCZKA<sup>1</sup>, J. LELAŃKO<sup>1</sup>, Z. PASZENDA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, UNIwersYTET ŚLĄSKI,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLSKA

<sup>2</sup> POLITECHNIKA ŚLĄSKA, CENTRUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,  
UL. AKADEMICKA 2A, 44-100 GLIWICE, POLSKA  
E-MAIL: GORYCZKA@US.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 40-42*]

## Wstęp

Stopy NiTi wykazujące efekt pamięci kształtu są powszechnie znane z zastosowań w medycynie. Jednakże w literaturze nadal dyskutowana jest ich biokompatybilność i odporność na korozję zwłaszcza w przypadku implantów długoterminowych [1-2]. W celu zabezpieczenia przed dyfuzją niklu ze stopu NiTi liczne metody modyfikacji powierzchni były proponowane. Pokrycie azotkami, tlenkami czy diamentopodobne wydają się być skuteczne do stworzenia bariery, która dostatecznie redukuje korozję stopów NiTi [3]. Jednakże zbyt gruba czy też za sztywna warstwa może prowadzić do zablokowania efektu pamięci kształtu. Oprócz rodzaju warstwy ważną rolę odgrywa technologia nakładania. Większość stosowanych technologii prowadzona jest w relatywnie wysokiej temperaturze powodując powstanie niekorzystnych wydzielen. Jednym ze sposobów uniknięcia tworzenia się wydzielen jest dodanie zamiennie za nikiel trzeciego pierwiastka stopowego. Szczególną uwagę zwrócono na miedź. Rondelli [4] i Wen [5] badali wpływ dodatku miedzi do NiTi na odporność korozyjną. Stwierdzili, że stop NiTiCu wykazuje wyższą odporność korozyjną niż NiTi. Dlatego może on być traktowany jako potencjalny kandydat do zastosowań medycznych. Jednakże dla długoterminowych implantów nadal wymagane jest stworzenie bariery ochronnej przed dyfuzją pierwiastków szkodliwych. Było to inspiracją do pokrycia stopu NiTiCu cienką warstwą platyny. Celem prezentowanej pracy było zbadanie struktury warstwy i jej wpływu na przebieg przemiany martenzytycznej.

## Część eksperymentalna

Z pierwotnie otrzymanego wytopu o namiarowym składzie 25% at. Ni, 50% at. Ti oraz 25% at. Cu odlano taśmę stosując metodę szybkiego schładzania z fazy ciekłej w układzie podwójnego bębna chłodzącego (TRC) [6]. Parametry procesu technologicznego podano w TABELI 1. Z taśmy wycięto próbkę o kształcie prostokąta (70mm x 20mm), której obie strony pokryto warstwą platyny w napylarce magnetronowej. Charakterystyczne temperatury przemiany martenzytycznej wyznaczono z krzywych grzania i chłodzenia uzyskanych z różnicowego kalorymetru skaningowego (DSC). Strukturę warstwy zbadano stosując transmisyjny mikroskop elektronowy oraz technikę dyfrakcji rentgenowskiej – stałego kąta padania wiązki pierwotnej (GIXD).

# PLATINUM LAYER FOR NiTiCu SHAPE MEMORY STRIP PROTECTION

T. GORYCZKA<sup>1</sup>, J. LELAŃKO<sup>1</sup>, Z. PASZENDA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCE,  
UNIVERSITY OF SILESIA,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLAND

<sup>2</sup> SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
BIOMEDICAL ENGINEERING CENTRE,  
UL. AKADEMICKA 2A, 44-100 GLIWICE, POLAND  
E-MAIL: GORYCZKA@US.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 40-42*]

## Introduction

NiTi shape memory alloys have been known from their medical application. However, there is still discussion about their biocompatibility and corrosion resistivity in long term implants [1-2]. In order to prevent nickel diffusion from NiTi shape memory alloys, various surface modification have been proposed. Coating with nitrides or oxides, or carbides seems to be an attractive way to create a barrier, which sufficiently reduces corrosion of NiTi alloys [3]. However, too thick and/or stiff layer may spoil shape memory effect. Also, a key role plays coating technology. Most of them are applicable in elevated temperature, in which precipitates appear. In aim to avoid of precipitation, nickel is substituted by a third alloying element. Especial, attention was paid to copper addition. Rondelli at all [4] and Wen at all [5] studied the effect of copper addition to NiTi on the corrosion resistance. They have stated that the corrosion resistance of NiTiCu alloys is better than that one measured in binary TiNi. Thus, the NiTiCu alloy appears as a potential candidate for medical application. However, it still requests of protection against element diffusion for long period implants. It was an inspiration to cover the NiTiCu alloy with thin platinum layer and the aim of presented work was study of platinum layer structure and its influence on behavior of the martensitic transformation.

## Experimental

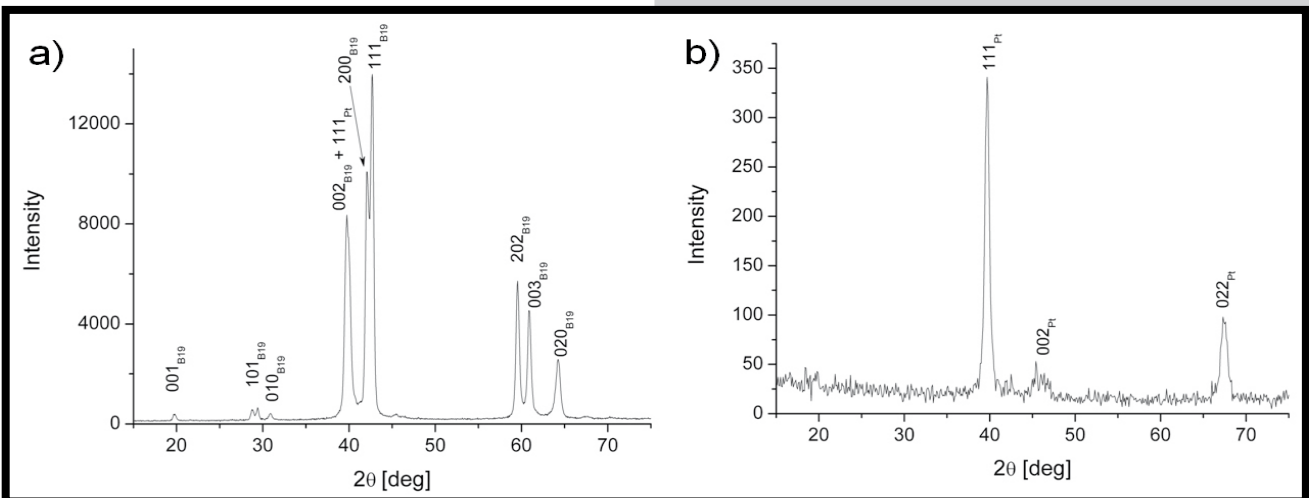
From previously cast bulk, with a nominal composition of Ni 25at.%, Ti 50at% and Cu 25at.%, the shape memory strip was produced using the twin roll casting technique (TRC) [6]. Processing parameters are given in TABLE 1. The rectangular sample (70mm x 20mm) was cut from the strip. Both surfaces of the sample were covered with platinum using magnetron sputtering technique. The characteristic temperatures of the martensitic transformation were determined from cooling/heating curves obtained in differential scanning calorimeter (DSC). Structure of the layers was studied applying transmission electron microscopy and X-ray grazing incident beam diffraction (GIXD).

Temp. kąpieli / Melt temp. [°C]	Materiał obręczy / Rim material	Prędkość obrotu bębnow / Roller's velocity [ms <sup>-1</sup> ]	Ciśnienie wtrysku / Ejection pressure [MPa]	Odległość bębnow / Pre-set gap [μm]	Średnica dyszy / Nozzle hole [mm]	Grubość / Thickness [μm]	Szerokość / Width [mm]
1395	Cu-Be-Co	0.6	0.025	100	3.0	296	45

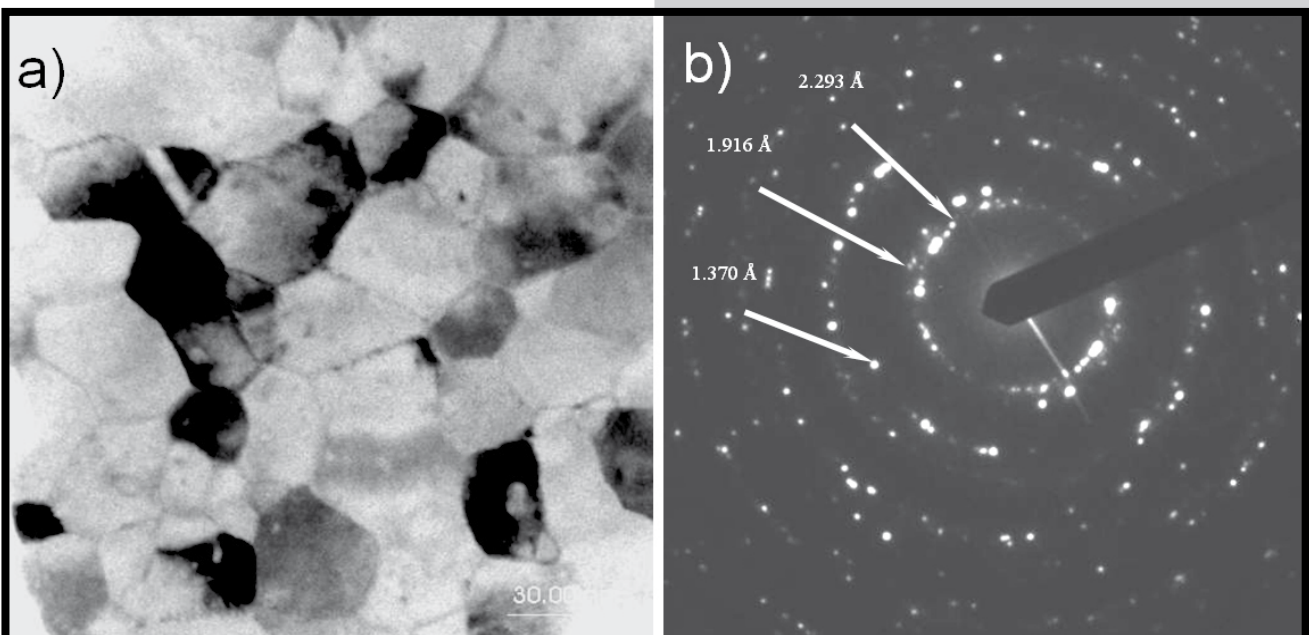
**TABELA 1. Parametry procesu technologicznego wytwarzania taśmy Ni<sub>2</sub>5Ti<sub>50</sub>Cu<sub>25</sub> oraz jej wymiary.**  
**TABLE 1. Processing parameters and dimension of the Ni<sub>2</sub>5Ti<sub>50</sub>Cu<sub>25</sub> strip.**

Taśma / Strip	M <sub>s</sub> [°C]	M <sub>p</sub> [°C]	M <sub>f</sub> [°C]	ΔH <sub>B2-B19</sub> [J/g]	A <sub>s</sub> [°C]	A <sub>p</sub> [°C]	A <sub>f</sub> [°C]	ΔH <sub>B19-B2</sub> [J/g]
Stan wyjściowy / As-cast	48.3	45.8	42.6	13.16	48.2	52.3	54.6	13.17
Po pokryciu /Covered	46.5	44.6	41.5	8.7	48.6	51.0	53.1	8.81

**TABELA 2. Wyniki otrzymane z termogramów DSC.**  
**TABLE 2. The results obtained from the DSC measurements.**



**RYS.1. Dyfraktogramy zarejestrowane dla taśmy: a) w stanie wyjściowym w geometrii Bragg-Brentano oraz b) dla taśmy pokrytej platyną stosując technikę GIXD.**  
**FIG.1. X-Ray diffraction patterns registered for the strip: a) as-cast in Bragg-Brentano geometry and b) after Pt sputtering using GIXD technique.**



**RYS.2. Obraz uzyskany przy pomocy elektronowego mikroskopu transmisyjnego warstwy platynowej (a) oraz jej elektronogram (b).**  
**FIG.2. Plan-view TEM image of platinum layer (a) and electron diffraction pattern (b).**

W celu zbadania przebiegu przemiany martenzytycznej zarejestrowano termogramy DSC dla taśmy w stanie wyjściowym oraz pokrytej warstwą platyny. Z termogramów wyznaczono temperatury początku i końca przemiany martenzytycznej jak również i odwrotnej przemiany martenzytycznej ( $M_s$ ,  $A_s$ ,  $M_f$ ,  $A_f$ ), a także ich entalpie ( $\Delta H$ ). Wyniki porównano w TABELI 2. Z porównania zmierzonych wartości temperatur dla taśmy w stanie wyjściowym jak i pokrytej platyną wynika, że zastosowana technologia pokrycia nie wpłynęła znacząco na temperatury przemian. Uzyskane różnice dla odpowiednich temperatur nie przekraczały 1.5 stopnia. Jednakże wartości entalpii wyznaczone dla pokrytej taśmy były niższe w porównaniu z taśmą w stanie wyjściowym. Powodem różnicy była mniejsza ilość fazy ulegającej przemianie (w przypadku pokrytej taśmy) w tej samej objętości badanego materiału.

Identyfikacja dyfraktogramu zarejestrowanego dla taśmy w stanie wyjściowym w klasycznej geometrii Bragg-Brentano, w temperaturze pokojowej, wskazuje że przemiana martenzytyczna kończy się uformowaniem martenzytu romboidalnego o strukturze typu B19 (RYSUNEK 1a). Identyfikację fazową cienkiej warstwy przeprowadzono na podstawie dyfraktogramu zarejestrowanego metodą GIXD przy stałej wartości kąta padania wiązki pierwotnej 0.5 stopnia.

Położenia linii dyfrakcyjnych wskazują na fakt, że warstwa składa się tylko z platyny (RYSUNEK 2). Obserwacje przeprowadzone za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego potwierdzają otrzymane wyniki z badań rentgenowskich (RYSUNEK 2). Ponadto ujawniły, że warstwa utworzona jest z nanokrystalicznych ziaren.

## Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że nałożenie nanokrystalicznej warstwy platynowej na taśmę nie blokuje odwracalnej przemiany martenzytycznej, która zachodzi jednoetapowo pomiędzy fazą macierzystą B2 a martenzytem romboidalnym B19. Z tego punktu widzenia platynowa warstwa napyłana magnetronowo jest atrakcyjnym materiałem ochronny stopu NiTiCu wykazującego efekt pamięci kształtu w przypadku jego zastosowania w medycynie czy weterynarii.

## Podziękowanie

*Badania zostały współfinansowane z grantu PBZ-KBN-100/T08/2003.*

## Piśmiennictwo

- [1] Duerig T., Pelton A., Stöckel D., *Mat. Sci. Eng.* A273–275 (1999) 149–160.
- [2] Schiff N., Grosgeat B., Lissac M., Dalard F., *Biomat.* 25 (2004) 4535–4542.
- [3] Starosvetsky D., Gotman I., *Biomaterials* 22 (2001) 1853–1859.

## Results and discussion

In order to study of martensitic transformation behavior the DSC cooling/heating curves were registered for the as-cast strip and for the strip covered with platinum. From the curves, start and end temperature of forward and reverse martensitic transformation was determined ( $M_s$ ,  $A_s$ ,  $M_f$ ,  $A_f$ , respectively) as well as enthalpy ( $\Delta H$ ) of the martensitic transformation. Results are compared in TABLE 2. It can be clearly seen that differences in characteristic transformation temperatures, for the as-cast and covered strip, are smaller than 1.5 degree. However, enthalpy determined for covered strip is lower than that one in the as-cast. It is due to the fact that the same measured volume of the covered strip contains less amount of transformable phase than in the as-cast one.

The X-ray diffraction pattern registered at room temperature, using Bragg-Brentano geometry, for the as-cast strip reveals that the transformation is completed by forming the B19 orthorhombic martensite (FIG.1a). The structure of the thin layer was studied using GIXD technique, where the incident beam was set at angle of 0.50 to the sample surface. The X-ray diffraction pattern shows that the layer is formed only from the crystalline platinum (FIG.1b). Observation carried out using electron transmission microscope confirms that the layer consists of platinum (FIG.2). Moreover, it was revealed that nanocrystalline grains were formed.

## Summary

It was stated that the nanocrystalline platinum layer does not limit martensitic transformation in the covered strip, which reveals one step reversible martensitic transformation between the B2 parent phase and the B19 orthorhombic martensite. From this point of view magnetron sputtered platinum can be promising material for protection layer when is used NiTiCu shape memory alloy for medical or veterinary applications.

## Acknowledgement

*The studies were partially supported from the grant PBZ-KBN-100/T08/2003.*

## References

- [[4] Rondelli G., Vicentini B., *Biomaterials* 23 (2002) 639.
- [5] Wen X., Hang N., Li X., Gao Z., *Biomed. Mater. Eng.* 7 (1997) 1.
- [6] Gorczyka T., Ochinn P., Morawiec H., *Arch. of Metall. Mat.* 49 (2004) 891-901.

# REAKCJE BIOLOGICZNE NA GRANICY IMPLANT-ORGANIZM

BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK

POLITECHNIKA GDAŃSKA,  
WYDZIAŁ MECHANICZNY, KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ  
UL. G. NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK,  
E-MAIL: BSWIECZKO@MECH.PG.GDA.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 43-44]

## Wstęp

Materiał przeznaczony do implantacji w tkanki żywego organizmu powinien być biozgodny i biofunkcjonalny. Jeśli taki nie jest, ciało może zareagować na „intruza” różnymi typami reakcji miejscowej. Reakcje zapalne mogą się objawiać np. odrywaniem się cząstek materiału z powierzchni implantu na skutek tarcia lub nacisku. Innym zjawiskiem występującym w odpowiedzi na wprowadzenie biomateriału do środowiska biologicznego zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* jest wytworzenie biofilmu na jego powierzchni [1].

## Zjawiska zachodzące w organizmie żywym po wprowadzeniu implantu

Procesy zachodzące na granicy faz implant-organizm mają charakter molekularny i dotyczą najmniejszych cząstek, takich jak woda lub większych, takich jak proteiny. Środowisko biologiczne wywiera wpływ na powierzchnię implantu m.in. poprzez swój skład chemiczny oraz pH [2] (RYS.1).

Implantowany biomateriał w środowisku tkankowym jest najczęściej pokryty cienką warstwą makrofagów przylegających do implantu, gęsto upakowaną warstwą kolagenu o grubości ok. 100  $\mu\text{m}$  oraz zewnętrzną, luźną warstwą naczyń krwionośnych. Molekuła, by przedostać się do powierzchni implantu musi te warstwy pokonać [3].

Ważnym problemem związanym z wszczepianiem implantów jest niebezpieczeństwo infekcji. Na odpowiedź organizmu na wszczepienie obcego ciała wywierają wpływ zarówno czynniki ogólnoustrojowe, jak i lokalne. Tak więc odpowiedź układu immunologicznego na implant może być zmieniona przez obecność bakterii oraz biofilmów na powierzchni implantu [2]. Powstanie biofilmu ukazuje RYSUNEK 2.

Rozmieszczenie i grubość biofilmu zależą od właściwości powierzchni, głównie takich jak: skład chemiczny, topografia, energia powierzchniowa i ładunek elektryczny. Może on tworzyć warstwy jednorodne i równomiernie rozmieszczone, nieregularną sieć lub wyspy. Rozrastanie się warstwy biofilmu jest możliwe dzięki powstawaniu bocznych połączeń między łańcuchami białek. Skład, rozmieszczenie i grubość biofilmu zmienia się w czasie kontaktu materiału z organizmem [5].

# THE BIOLOGICAL REACTIONS ON THE IMPLANT-ORGANISM BORDER

BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK

TECHNICAL UNIVERSITY OF GDANSK,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
NARUTOWICZA 11/12 STR., 80-952 GDANSK,  
E-MAIL: BSWIECZKO@MECH.PG.GDA.PL

[Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 43-44]

## Introduction

The material designer for implant into a body should show biological and a functional compatibility. If it is not such, the body may react to the implant in different ways. Inflammation reactions may be the following: breaking off some parts of material from the surface layer due to friction or pressure. Another phenomenon which results from introducing biomaterial into the biological environment both *in vitro* and *in vivo* is the formation of biofilms on its surface [1].

## The phenomena undergoing in the body after introducing an implant

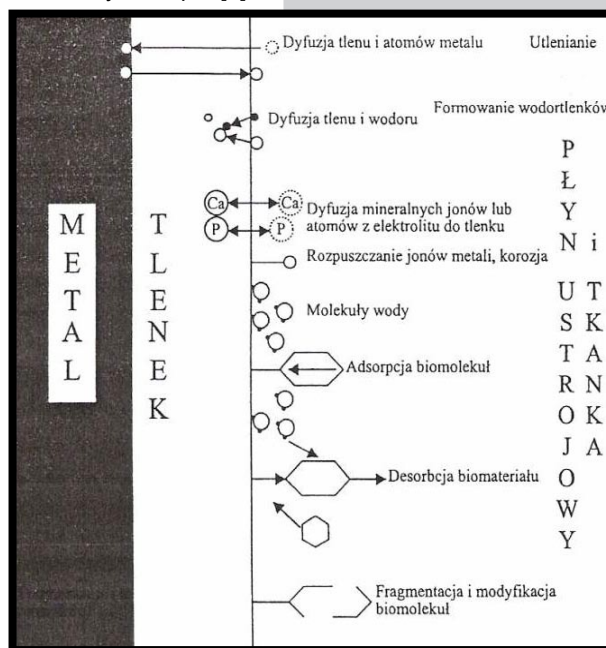
The processes undergoing on the implant-body border are of molecular type and they concern the smallest parts, such as water or bigger like proteins. The biological environment affects the implant surface for example by its chemical composition as well as pH [2] (FIG. 1).

The implanted biomaterial in tissue environment is most frequently covered by macrophages layer sticking to the implant, thickly packed collagen layer reaching the thickness of 100  $\mu\text{m}$  and outside layer of veins. To reach the implant the molecule must penetrate the layers [3].

In case of an implant the body is in danger with infection. The response of the body to implant is influence by both entire system and local factors. Thus the response of immunity system to an implant may be modified by bacteria presence as well as biofilms on the implant surface [2]. The formation of biofilms is presented in FIGURE 2.

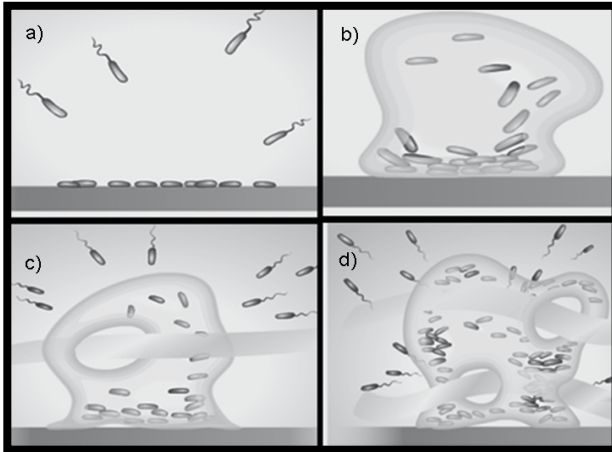
The location and thickness of biofilms depend on: chemical composition, topography, the surface energy and the

electric charge. It can create a homogeneous layers and equally located, irregular net or islands. Increasing the biofilm layer is possible owing to forming protein connections. The composition, location and thickness of biofilm undergo a change during the contact of the material with the body [5].



RYS.1. Schemat procesów molekularnych zachodzących na granicy implant-organizm [2].  
FIG.1. The presentation of molecular processes occurring on the implant-organism border [2].





**RYS.2. Powstawanie biofilmu: a) powstawanie mikrokoloni bakterii, b) rozwój mikrokoloni, c) koegzystencja różnych typów bakterii, d) migracja bakterii do nowych siedlisk [4].**  
**FIG.2. The formation of biofilm: a) formation of bacteria microcolony, b) the development of the colony, c) coexistence of different bacteria types, d) migration of bacteria to new environments [4].**

Uszkodzenie warstwy pasywnej implantu powoduje, że dochodzi do bezpośredniego kontaktu komórek z powierzchnią materiału. Z biomateriału są wówczas uwalniane do środowiska otaczającego biomateriał składniki stopu. Zmiany korozyjne zachodzące na powierzchni materiału nasilają reakcję zapalną, a jej konsekwencją jest śmierć jednych i proliferacja innych komórek, co z kolei przyczynia się do przebudowy (remodeling) tkanek stykających się z biomateriałem [6].

W przypadku materiałów metalicznych dochodzi do biokorozji, i w efekcie tego zjawiska, do pojawienia się w obrębie kontaktującej się z implantem tkanki jonów metali w dużej koncentracji (RYS.3) [7].

## Podsumowanie

Kontakt biomateriału z organizmem ludzkim powoduje tworzenie się warstwy pasywnej i prowadzi do odkładania się na jej powierzchni białek macierzy pozakomórkowej. Skład i ich ilość są efektem reaktywności biologicznej implantu, a szczególnie właściwości powierzchni. Białka wpływają na procesy adhezji komórek i bakterii, aktywność biologiczną komórek oraz aktywację reakcji zapalnych [2].

Źródłem zagrożeń mogą być również mikroskopijnych rozmiarów pozostałości narzędzi chirurgicznych powstające w wyniku mechanicznego oddziaływania narzędzia z tkanką i z implantem lub ze zużycia implantu. Źle dobrane materiały i złe wykonanie narzędzi oraz błędy operatora mogą być źródłem niespodziewanych reakcji alergicznych i zapalnych ale też mogą być przyczyną poważniejszych w skutkach efektów cytotoksycznych a nawet kancerogennych [7,8].

## Piśmiennictwo

- [1] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004
- [2] Łaskawiec J., Michalik R.: Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach. Wyd. Polit. Śl., Gliwice 2002
- [3] Siemiński A., Gooch K.: Biomaterial-microvasculature interactions. Biomaterials, 21, 2000, 2233-2241
- [4] <http://www.biodro.home.pl/protezy/abg-stryker.html>
- [5] Gristina A.G.: Implant failure and the immuno-incomponent fibro-inflammatory zone. Clin. Orthop. Related Res. 298 (1994) 106.



**RYS.3. Zmiany korozyjne zachodzące na powierzchni materiału [4].**  
**FIG.3. The corrosion changes occurring on the biomaterial surface [4].**

Damaging of the passive surface layer causes a direct contact between cells and the surface of the material. The biomaterial releases the alloy components into the environment surrounding the biomaterial. The corrosion changes occurring on the material surface intensify the inflammation reaction. Its consequence is dieing out of some cells and proliferation of others, which in turn results in remodeling the tissue sticking to the biomaterial [6].

The metallic materials undergo biocorrosion and it results in presence, in a high concentration, of metallic ions in tissues surrounding the implants (FIG.3) [7].

## Summary

The contact between the biomaterial and human body causes the formation of passive layer and gathering mother out-cell proteins on its layer. The composition and the amount of protein are the result of biological reactivity of implant, and particularly its surface. The protein has impact on adhesion process of cells and bacteria, the biological activity of cells as well as the reactivity of the inflammation reactions [2].

Microscopic size remains of surgical devices, created as a result of mechanical interaction of the device with tissue and with implant, and also particles produced by an implant wear, are often underestimated source of risk. Wrongly selected materials and badly made devices combined with operator's mistakes can be a reason of unexpected allergic reactions and inflammables, but also can be a reason of much more serious cytotoxic and even malignant effects [7,8].

## References

- [6] Boyan B.D., Hummert T.W., Kieswetter K.: Effect of titanium surface on chondrocytes and osteoblast in vitro. Scan. Electron Microsc. (Cells Mat.), 5 (1995) 323
- [7] Walkowiak B.: Biomedyczne skutki kontaktu tkanki z implantem. Inżynieria biomateriałów, 38-43, 2004, 200-205
- [8] Yagil-Kelmer E., Kazmier P., Rahaman M.N., Bal B.S., Tessman R.K., Estes D.M.: Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytic cell line to two different sizes of alumina ceramic particles. J. Orthop. Res. 2004, 22, 832-8.

# BIORESORBOWALNE TERPOLIMERY LAKTYDU, GLI- KOLIDU I TRIMETYLOWĘGLANU OBDARZONE WŁASNOŚCIĄ ZAPAMIĘTYWANIA KSZTAŁTU

PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1</sup>, MACIEJ BERO<sup>1</sup>,  
MARIATELLA SCANDOLA<sup>2</sup>, ELISA ZINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE

<sup>2</sup> DIP. DI CHIMICA „G. CIAMICIAN” UNIVERSITA DI BOLOGNA, ITALY  
VIA SELMI 2, 40126 BOLOGNA

E-MAIL: PIOTRDB@CCHP.PAN.ZABRZE.PL

## Streszczenie

*Prowadząc terpolimeryzację ROP cyklicznych: laktydu, glikolidu i trimetylenowęgla, inicjowaną niskotoksycznym acetylacetonianem cyrkonu (IV) otrzymano z dobrą wydajnością szereg wysoko-cząsteczkowych bioresorbowalnych trójpolimerów. Otrzymane polimery pomimo obecności w strukturze łańcucha dużej ilości dłuższych sekwencji laktydylowych były amorficzne. Wszystkie wykazywały pamięć kształtu. Czas powrotu do kształtu permanentnego był bardzo krótki i nie przekraczał kilku sekund. Temperatura w której następowało to zjawisko była nieco wyższa od temperatury ciała ludzkiego.*

**Słowa kluczowe:** polimeryzacja, pamięć kształtu, biodegradowalne, biokompatybilne

[*Inżynieria Biomateriałów*, 63-64, (2007), 45-47]

## Wstęp

Pamięcią kształtu nazywamy własność materiałów polegającą na zdolności do powrotu z kształtu przejściowego ("zamrożonego") otrzymanego w wyniku mechanicznej deformacji, do wcześniejszego pierwotnego kształtu, wywołwaną zdefiniowanym bodźcem, którym najczęściej jest temperatura. Pierwszymi poznanymi materiałami charakteryzującymi się tymi własnościami są różnorodne stopy metaliczne (SMAs), takie jak stopy TiNi, CuZnAl czy FeNiAl. W 1960 ukazała się pierwsza publikacja opisująca istnienie efektu pamięci kształtu polietylenu naświetlanego promieniowaniem jonizującym [1,2]. Dopiero nieco później, w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku pojawiły się doniesienia o możliwości syntezy innych polimerów mających w pełni własność zapamiętania kształtów (SMPs), nie tylko na drodze sieciowania radiacyjnego lecz również chemicznego [1]. Polimery SMPs cechują się wieloma zaletami w porównaniu do stopów SMAs, są lżejsze, wykazują lepszą stabilność kształtu, oraz większą możliwość dostosowywania temperatury powrotu do kształtu pierwotnego. Są również stosunkowo łatwo przetwarzalne i generalnie tańsze [1,3,4]. Termoplastyczne SMPs, najbardziej interesujące ze względu na łatwe przetwórstwo, charakteryzowane są jako liniowe kopolimery zawierające w swojej strukturze łańcucha sztywne i elastyczne segmenty. Generalnie materiał taki można dowolnie kształtować poprzez ogrzanie do temperatury zbliżonej do temperatury mięknienia domeny zbudowanej z segmentów sztywnych. Ten pierwotny kształt może być zapamiętany po schłodzeniu polimeru, w wyniku fizycznego międzycząsteczkowego oddziaływania segmentów sztywnych, co tworzy powstanie efektu zbliżonego do fizycznego

# BIORESORBABLE LACTIDE/ GLYCOLIDE/TRIMETHYLENE CARBONATE TERPOLYMERS WITH SHAPE RECOVERY PROPERTIES

PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1</sup>, MACIEJ BERO<sup>1</sup>,  
MARIATELLA SCANDOLA<sup>2</sup>, ELISA ZINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES, 34 M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE STR.,  
41-819 ZABRZE, POLAND

<sup>2</sup> DIP. DI CHIMICA „G. CIAMICIAN” UNIVERSITA DI BOLOGNA, ITALY,  
VIA SELMI 2, 40126 BOLOGNA

E-MAIL: PIOTRDB@CCHP.PAN.ZABRZE.PL

## Abstract

*ROP terpolymerization of cyclic monomers: lactide, glycolide and trimethylene carbonate, initiated with zirconium (IV) acetylacetonate was conducted. The terpolymerization resulted in obtaining a series of highmolecular bioresorbable terpolymers. In spite of relatively large amount of longer lactidyl sequences present in the terpolymer's chain structure, all of the terpolymers were amorphous. All the obtained materials revealed shape memory properties too. The recovery time was relatively short and valued several seconds. The temperature at which the starting of the phenomenon was observed was close to the temperature of human body.*

**Keywords:** polymerization, shape memory, biodegradable, biocompatible polymers.

[*Engineering of Biomaterials*, 63-64, (2007), 45-47]

## Introduction

Shape memory in materials is the ability to return to a predefined initial form from a temporary transient shape, obtained as a result of mechanical deformation. It is triggered by a certain stimulus, usually temperature. The first known materials characterized with these properties were various metallic alloys (SMAs), such as TiNi, CuZnAl or FeNiAl. In 1960, the first paper regarding the shape memory effect was issued, describing the phenomenon for polyethylene exposed to ionizing radiation [1,2]. In 1980s, first mentions of the possibility to synthesize other polymers with full shape memory abilities (SMPs) not only on the way of radiative, but also chemical cross-linking [1] appeared. Many features of SMPs advocate their application instead of SMAs, such as: less weight, better shape stability, more possibilities of adjusting the temperature of returning to the initial shape, etc. The processing of these materials is relatively easy and they are generally cheaper [1,3,4]. Thermoplastic SMPs, most interesting because of easy processing, are described as linear copolymers containing both rigid and elastic segments in their chain microstructure. Generally, such materials can be shaped to any desired form by means of heating the material to the temperature similar to temperature of softening of the domain built up of rigid segments. The initial shape may be remembered after cooling down the polymer, which happens due to physical intermolecular interactions in the rigid segments, which causes the effect similar to physical chain cross-linking. Then, if the material is subjected to mechanical deformation at the temperature

sięciowania łańcuchów. Jeśli następnie materiał ten ulegnie deformacji mechanicznej w temperaturze niższej od temperatury mięknienia segmentów sztywnych, otrzymuje kształt przejściowy. Powrót do pierwotnego kształtu może nastąpić po podgrzaniu materiału powyżej temperatury zeszklenia segmentów elastycznych, ale niższej od temperatury mięknienia segmentów sztywnych. Efekt pamięci kształtu można uzyskać zarówno w polimerach semikrystalicznych, jak i amorficznych, pod warunkiem uzyskania wspomnianego specyficznego efektu sięciowania liniowego łańcucha. Bardzo obiecującym polem do zastosowań polimerów SMPs jest medycyna, gdzie materiały te pozwolą na rozwój wielu małoinwazyjnych technik chirurgicznych i gdzie znajdą wiele nowych zastosowań w postaci narzędzi takich jak: samozaciskające się klamery, szpilki chirurgiczne czy różnego rodzaju samorozprężające się stenty [5,6]. Polimery te mogą w wielu wypadkach zastąpić dotychczas stosowane stopy metaliczne SMAs pod jednym warunkiem – stosowane do ich formowania SMPs muszą być biogodne i bioresorbowalne, a dzięki temu nie będą wymagać usuwania – ulegną po ustalonym czasie resorpcji w organizmie pacjenta. Takimi polimerami, powszechnie uznanymi za biokompatybilne i biodegradowalne są alifatyczne poliestry, homo- i kopolimery otrzymywane najczęściej z laktydów, e-kaprolaktonu i cyklicznych węglanów.

## Wyniki

W procesie terpolimeryzacji mieszaniny cyklicznych monomerów L-laktydu, glikolidu i trimetylenowęglanu (TMC) inicjowanym niskotoksycznym acetylacetonianem cyrkonu (IV), uzyskano z dużą wydajnością szereg wysokocząsteczkowych terpolimerów o zaplanowanym składzie (TABELA 1). Z pomocą badań  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR określono budowę łańcucha i skład terpolimerów (RYS.1).

Jak wykazały badania kalorymetrii skaningowej DSC, pomimo dużej liczby długich sekwencji laktydyliowych, występujących w łańcuchach kilku terpolimerów (RYS.1, próbki 2,4) wszystkie otrzymane materiały były amorficzne i nie zaobserwowano występowania separacji faz.

Własności zapamiętywania kształtów były wstępnie badane poprzez obserwacje zmian kształtu płaskiej kształtki poddanej cyklicznym zmianom kształtu w dwóch wybranych temperaturach. W wyższej temperaturze otrzymywano kształt przejściowy poprzez rozciągnięcie kształtki o 100% długości, a następnie szybko w niższej temperaturze (TL) „zamrażano” ten kształt. Dla każdego terpolimeru, wyższa temperatura (TU) wynosiła  $10^\circ\text{C}$  powyżej temperatury zeszklenia  $T_g$ , a niższa (TL) była temperaturą mniejszą o  $10^\circ\text{C}$  od temperatury  $T_g$ . Zaobserwowano, że wszystkie terpolimery wracały do kształtu pierwotnego, gdy umieszczano

lower than the rigid segments softening temperature, it gains its transient form. The return to the initial shape may occur after heating the material up to a temperature higher than the elastic segments glass transition temperature, but lower than the rigid segments softening temperature. The effect of shape memory may be obtained in either semicrystalline or amorphous polymers, provided that the mentioned specific phenomenon of linear chain cross-linking occurs. Medicine seems a promising field of application for SMPs, as the materials can advance the development of minimally invasive surgical techniques and find a number of application possibilities in the manufacturing of tools such as: self-clamping clips, surgical pins or various self-expanding stents [12, 13]. These polymers might successfully replace metallic SMAs under one condition – SMPs used for forming the devices must be biocompatible and bioresorbable, thus not require deletion, as they will be resorbed after defined time. The polymers commonly considered fully biocompatible and biodegradable are aliphatic polyesters, homo- and copolymers obtained usually of lactides, e-caprolactones and cyclic carbonates.

## Results

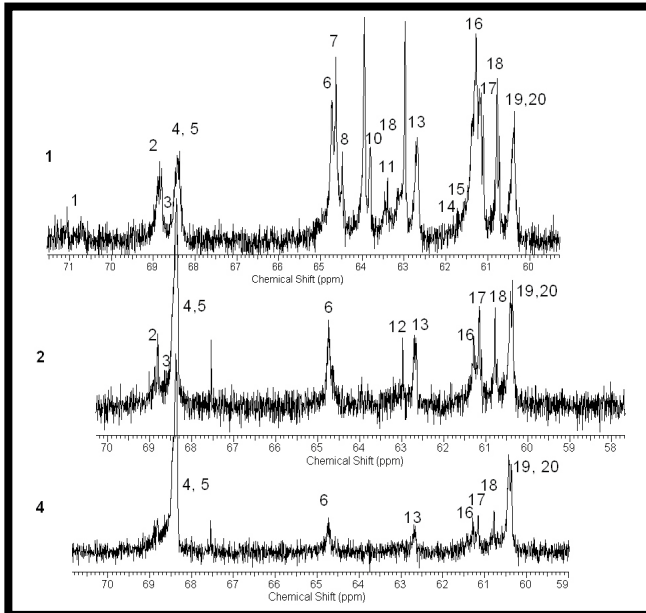
Terpolymers with different unit composition were obtained by changing the monomer feed ratio.  $[\text{Zr}_{(\text{acac})_4}]$  was used as an initiator for reaction, with I/M molar ratio as 1:1000 (TABLE 1). By means of  $^{13}\text{C}$  and proton NMR analysis, the chain microstructure and terpolymer composition was determined. The molar masses and glass transition temperature were measured (FIG.1). The NMR signals were assigned to the sequences present in the chain. Hence DSC measurements indicate that all terpolymers are completely amorphous and that there is not phase separation. The microblocks present into samples are no long enough to enable glycolidyl or lactidyl sequences to crystallize, however the amount of long lactidyl sequences is relatively sizeable in many events (FIG.1, sample 2,4). All terpolymers, except sample 1, which contains the minor contents of lactidyl units and it is generally formed by random sequences, show segmental chain microstructure. Their chain is mainly built of longer lactidyl and glycolidyl microblocks and random glycolyl/carbonate (-GT-) sequences. Shape memory properties of the terpolymers were preliminarily investigated by thermally cycling between two selected temperatures a piece of film. In order to induce temporary shape, the terpolymer sample was stretched at temperature about  $10^\circ\text{C}$  above  $T_g$ . Then the obtained shape “was frozen” by rapid placement of sample in bath at temperature considerably below the glass transition temperature. All terpolymers were manually stretched to reach an elongation higher than 100%. It was observed

Sample	Reaction Time [h]	Conversion <sup>b</sup> [%]	Composition <sup>b</sup>	Mn (Da) <sup>c</sup>	PDI <sup>d</sup>	T <sub>g</sub> (°C) <sup>e</sup>	T <sub>α</sub> (°C) <sup>f</sup>
1	72	90	G34:L20:T46	33700	2.1	12	15 <sup>g</sup>
2	48	94	G37:L36:T27	53900	2.0	31	37
3	48	95	G25:L53:T22	43500	2.1	39	45
4	36	97	G35:L52:T13	48400	2.0	42	50

Próbki otrzymano w stopie, w  $120^\circ\text{C}$ , stosując ilość inicjatora do komonomerów w stosunku molowym jak 1:1000 <sup>b</sup>) wyniki z badań NMR: skład oznaczono odpowiednio Gx: Ly: Tz gdzie x, y, z wskazuje na zawartość mol% Glikolidylu (G), Laktydyli (L) i Trimetyleno węglanu (T). <sup>c,d</sup>) z badań GPC. <sup>e</sup>) z badań DSC szybkość skanowania  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  <sup>f</sup>) z badań DMTA rozciąganie ( $3\text{Hz}$ ,  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ ), <sup>g</sup>) DMTA zginanie – polimer umieszczony między płatkami folii aluminiowej.

The samples obtained in bulk at  $120^\circ\text{C}$ , with initiator/comonomers ratio: as 1:1000 <sup>b</sup>) from NMR: the composition is labelled Gx: Ly: Tz where x, y, z indicate the mol% of Glycolidyl (G), Lactidyl (L) and Trimethylene carbonate (T) units respectively. <sup>c,d</sup>) From GPC. <sup>e</sup>) From DSC heating scan at  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ . after melt quenching <sup>f</sup>) From DMTA in tensile mode ( $3\text{Hz}$ ,  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ ), <sup>g</sup>) DMTA performed in bending mode on polymer films sandwiched between two aluminium plates.

TABELA 1. Charakterystyka otrzymanych terpolimerów.  
TABLE 1. Properties of obtained terpolymers.



Sequences	
Lactide sequences (methine carbon region)	
1	TLT + TLLT + TLLLT + TLLG
2	GLLT + GLLLT
3	TLLLL + LLLLT
4	LLLL
5	LLGG
Carbonate sequences (Methylene carbons O-CH <sub>2</sub> region)	
6	GGT'GG + TGT'GG
7	GGT'T
8	GT'GT + GGT'GT + LT'T + TT'L
9	TT'T + TT'T + TT'G
10	TT'GG
14	TT'L + LT'T
15	LT'L + LT'L
16	GGT''T
17	GGT''GG + GGT''GT TGT''GG + TGT''GT
Glycolide sequences (methylene carbons region)	
11	TGGGT + TGGGL
12	TGT + TGGT + TGGL
13	GGGGT + TGGGT + LGGGT
18	TGGT, TGGGG,
19	LLGG
20	GGGG
	T' = -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OCO-    T'' = -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OCO-
	G = -OCH <sub>2</sub> CO-                      L = -OCH(CH <sub>3</sub> )CO-

**RYS.1. Widma <sup>13</sup>C NMR otrzymanych terpolimerów, przyporządkowanie pasm do sekwencji łańcucha.**  
**FIG.1. <sup>13</sup>C NMR spectra of the terpolymers, assignation of signals to the chains sequences.**

je ponownie w temperaturze TU. Kształtem permanentnym była spirala, otrzymana w temperaturze 100°C poprzez nawinięcie uprzednio uformowanej płytki wokół śrubokręta, a następnie wystudzenie w temperaturze pokojowej. Spirala ta po pewnym czasie była rozciągnięta do kształtu płytki w temperaturze 48°C, a otrzymany tymczasowy kształt płytki został "zamrożony" poprzez szybkie ochłodzenie poniżej temperatury zeszklenia. Kiedy płytka została umieszczona ponownie w temperaturze 48°C, materiał odzyskał dokładnie pierwotny kształt spirali w przeciągu kilku sekund.

Zaobserwowana zdolność powrotu do kształtu pierwotnego jest związana ze zjawiskiem splątania łańcuchów polimeru, powodującym utworzenie fizycznych odpowiedników węzłów sieci, umożliwiających zaistnienie obserwowanej własności zapamiętywania kształtu. W zjawisku tym niepoślednią rolę biorą udział również zaobserwowane z pomocą badań FTIR wiązania wodorowe pomiędzy wodorami grup metinowych i metylowych a tlenem grupy karbonylowej laktynydu, glikolidylu i jednostek węglanowych. Obecność tych wiązań może być przyczyną obserwowanego relatywnie bardzo krótkiego czasu powrotu do kształtu pierwotnego. W prowadzonych badaniach, skład i budowa łańcuchów badanych terpolimerów były tak dobierane aby temperatura w której materiał ten powraca do pierwotnego kształtu był bliski temperaturze ciała ludzkiego. Z tego powodu wiele otrzymanych terpolimerów wydaje się szczególnie interesującymi, jako bioresorbowalne materiały do zastosowania medycznego, do wykorzystania w formowaniu implantów i narzędzi wykorzystywanych w chirurgii małoinwazyjnej. Cenną własnością otrzymanych terpolimerów jest również krótki czas powrotu do kształtu pierwotnego nie przekraczający 3-4 sekund, oraz dobre własności mechaniczne.

## Podziękowania

Praca prowadzona w ramach programu EU6FP-Excellence-BIOMAHE FP-6-509232

## Piśmiennictwo

- [1] Lendlein A, Kelch S. *Angew Chem Int Ed* 2002; 41:2034-57.  
 [2] Kim BK, Lee SY, Xu M. *Polymer* 1996; 37:5781-93.  
 [3] Lendlein A, Schmidt AM, Langer R.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:842-7.

that all terpolymers are able to visually recover the initial shape. This property strongly depends on the two combined effects; of time and temperature.

The polymer with a spiral permanent shape was tested. The spiral was then deformed (by sample unwinding) at 48°C, and the obtained temporary shape (straight strip) was fixed by quickly cooling. When the deformed strip was dipped again into the temperature at 48°C, the spiral permanent shape was completely recovered in a matter of seconds. The observed shape memory ability must be ascribed to the existence of chain entanglements that act as cross-linking points and allow the shape recovery. It can also be stated that in this phenomenon, hydrogen bonds observed by means of FTIR investigation between the hydrogen atoms of methine and methyl groups, and the oxygen atom of the carbonyl group of lactidyl, glycolidyl and carbonate units, have significant influence. The recovery temperature is located in the neighbourhood of human body temperature. It is therefore concluded that, providing that a tuned and accurate programming is used in order to avoid viscous deformation of the material, the analysed terpolymers of L-lactide, glycolide and trimethylene carbonate (having T<sub>g</sub> higher than room temperature) may find interesting clinical applications as shape-memory implants.

## Acknowledgements

The work was conducted in frame of EU FP6 - Excellence-BIOMAHE FP-6-509232.

## References

- [4] Ping P, Wang W, Chen X, Jing X. *Biomacromolecules* 2005;6:587-92.  
 [5] Venkatraman SS, Yan Lay Poh, Joso Joe Ferry D., Boey YCF, Wang X. *Biomaterials* 2006;27:1573-8.  
 [6] Ikada W, Chu CC. *Wound Close Biomaterial and Devices*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992. p. 317-46

# POLIMERY Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU – BADANIE MIKROSTRUKTURY ŁAŃCUCHA TERPOLIMERÓW LL-LAKTYDU, GLIKOLIDU I TRIMETYLENOWĘGLANU

KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1</sup>,  
PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>, MARIABELLA SCANDOLA<sup>2</sup>, ELISA ZINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
POLSKA AKADEMIA NAUK,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

<sup>2</sup> UNIWERSYTET BOLOŃSKI,  
WYDZIAŁ CHEMII INSTM UdR BOLOGNA,  
SELMI 2, 40126 BOLOGNA, WŁOCHY

## Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań mikrostruktury łańcucha bioresorbowalnych terpolimerów LL-laktydu, glikolidu i trimetylenowęglanu, wykazujących pamięć kształtu. Polimery scharakteryzowano, wykorzystując technikę <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego. Przeprowadzono analizę zakresu węgli metinowych laktydu oraz metylenowych glikolidu i węglanu widma węglowego pod kątem przyporządkowania linii spektralnych odpowiednim sekwencjom. Wyznaczono następujące parametry: udziały jednostek oraz bloków komonomerycznych, a także udział segmentów bezładnych.

[Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 48-50]

## Wstęp

Syntetyczne bioresorbowalne materiały polimerowe otrzymywane z glikolidu, laktydu i trimetylenowęglanu (TMC) są obecnie szeroko wykorzystywane w medycynie i farmacji ze względu na ich biokompatybilność i degradację do nietoksycznych produktów przemiany materii. Z homo- i kopolimerów w/w materiałów produkuje się nici chirurgiczne, scaffoldy w inżynierii tkankowej, a także różnego typu implanty oraz systemy kontrolowanego uwalniania leków [1]. Wielorakość zastosowań powoduje konieczność opracowywania materiałów o nowych właściwościach mechanicznych i fizycznych. Jednym z obiektów badań nad bioresorbowalnymi materiałami polimerowymi są polimery z pamięcią kształtu (SMP). Polimery te charakteryzują się zdolnością do powrotu z kształtu przejściowego tzw. „zamrożonego” do kształtu pierwotnego. Kształt przejściowy uzyskuje się w wyniku mechanicznej deformacji, a czynnikiem powodującym przejście do kształtu pierwotnego może być np. drastyczna zmiana pH, siły jonowej, pola magnetycznego. Jednak najczęściej bodźcem stymulującym jest temperatura [2]. Kluczową rolę w powstawaniu efektu zapamiętywania kształtu pierwotnego odgrywają splątania łańcuchów lub inne silne oddziaływania fizyczne pomiędzy odpowiednimi segmentami łańcuchów [3].

Możliwość zastosowania materiałów z pamięcią kształtu w medycynie otwiera rozwój wielu nowym technikom terapeutycznym, w których mogą być wykorzystane narzędzia wykonane z SMP takie jak samozaciskowe klamry, szpilki chirurgiczne czy różnego rodzaju samorozprężające stenty [4,5].

# SHAPE-MEMORY POLYMERS – INVESTIGATION OF LL-LACTIDE, GLYCOLIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE TERPOLYMER'S CHAIN MICROSTRUCTURE

KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1</sup>,  
PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>, MARIABELLA SCANDOLA<sup>2</sup>, ELISA ZINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34 ST., 41-819 ZABRZE, POLAND

<sup>2</sup> UNIVERSITY OF BOLOGNA,  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY INSTM UdR BOLOGNA,  
SELMI 2, 40126 BOLOGNA, ITALY

## Abstract

*This paper presents the results of investigation of chain microstructure of bioresorbable LL-lactide, glycolide and trimethylene carbonate terpolymers exhibiting shape-memory behaviour. Polymers were characterized by means of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. Detailed analysis of lactide methine carbons as well as methylene glycolide and carbonate carbon regions was performed in order to assign the spectral lines to appropriate sequences. Following parameters were designated: comonomeric unit, long block and mixed segments contribution.*

[Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 48-50]

## Introduction

Synthetic bioresorbable polymeric materials obtained from glycolide, lactide and trimethylenecarbonate (TMC) are nowadays in common use in medical field due to their biocompatibility and degradation to non-toxic metabolic products. Homo- and copolymers of aforementioned materials are used in manufacturing sutures, scaffolds in tissue engineering and different kinds of implants and controlled drug delivery systems etc. [1]. Variety of application fields evoke the need for elaborating materials that exhibit novel mechanical and physical properties. One of new interesting fields of investigation are shape-memory polymers (SMP). Such polymers possess the ability to recovery from intermediate shape, so called “frozen” to primal. The intermediate shape is the result of mechanical deformation and can be caused by e.g. severe change of pH, ionic strength, magnetic field. However the most frequent stimulating factor is temperature [2]. The essential in memorizing the primal shape is entanglement of polymer chains or other strong physical interaction between appropriate chains' segments.

Possibility of utilizing shape-memory materials in medicine allows the development of novel therapeutic methods, where SMP-made instruments can be applied; for instance self-clamping clips, surgical pins or different kinds of self-expanding stents [4,5]. Such materials, when implanted into body, can successfully replace hitherto used implants of metallic alloys.

Physical and physicochemical polymer properties depend on the microstructure of chains. Therefore, the scope of our investigations is approach to determine the structure of

Wyroby te, implantowane do organizmu, mogą zastąpić z powodzeniem dotychczas stosowane implanty ze stopów metalicznych pod warunkiem ich biogodności.

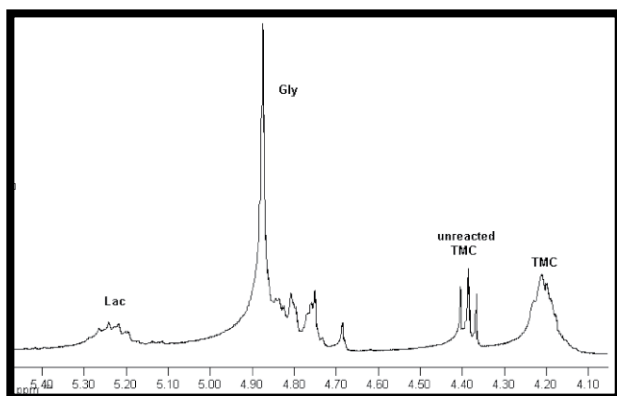
Fizyczne i fizykochemiczne właściwości polimerów zależą od mikrostruktury ich łańcuchów. Dlatego też celem naszych badań jest próba scharakteryzowania mikrostruktury łańcucha bioresorbowalnych terpolimerów, wykazujących pamięć kształtu, przy pomocy wysokorozdzielczej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego. Znalezienie zależności efektu pamięci kształtu ze strukturą łańcucha polimerowego zapewne umożliwi sterowanie procesem otrzymywania materiału o odpowiednich parametrach mechanicznych i odpowiedniej temperaturze (w zakresie temperatury ciała ludzkiego) przejścia z kształtu „zamrożonego” do pierwotnego.

## Material i metody

Przy pomocy wysokorozdzielczej spektrometrii magnetycznego rezonansu jądowego przeprowadzono badania mikrostruktury łańcucha terpolimerów LL-laktydu, glikolidu i TMC otrzymane na inicjatorze cyrkonowym ( $Zr(acac)_4$ ). Widma  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR zarejestrowano na 300 MHz spektrometrze Varian Unity Iova w temperaturze 80°C. Jako rozpuszczalnik użyto osuszony DMSO- $d_6$  razem z tetrametylosilanem jako wzorcem wewnętrznym. Liczba przejść dla pomiaru  $^1H$  NMR to 32, czas akwizycji 3,74s i długość pulsu 7 $\mu$ s. Dla widma  $^{13}C$  NMR liczba przejść wynosiła 16500, czas akwizycji 1,8 s, długość pulsu 9  $\mu$ s.

## Wyniki

W celu określenia mikrostruktury łańcucha terpolimeru LL-laktydu, glikolidu i TMC badaniom poddano próbki o następujących udziałach jednostek monomerycznych: laktydylowych LL, glikolidowych GG i węglanowych T (A: 35% mol. LL/ 20%mol. GG/ 45% mol. T; B: 35%mol. LL/ 35% mol. GG/ 30% mol. T; C: 25% mol. LL/ 50% mol. GG/ 25% mol. T). Przy pomocy techniki  $^1H$  NMR określono udział poszczególnych jednostek monomerycznych.



**RYS.1. Widmo  $^1H$  NMR terpolimeru LL-laktydu, glikolidu i TMC próbki C (zakres metylenowy laktydu i metylenowy glikolidu i TMC).**

**FIG.1.  $^1H$  NMR spectrum of LL-lactide, glycolide and TMC terpolymer - sample C (region of methylene carbons in lactide and methyl carbons in glycolide and TMC).**

Szersze spektrum informacji na temat struktury łańcucha terpolimeru uzyskano z widm  $^{13}C$  NMR. Najbardziej czułym obszarem widmowym, umożliwiającym dokładną analizę grup i sekwencji występujących w łańcuchu, okazał się zakres węgli metinowych laktydu oraz metylenowych glikolidu i węglanu.

bioresorbable terpolymer chains, that show shape-memory behaviour, by means of high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. The elaboration of shape-memory dependence with polymer microstructure will probably enable to coordinate the process of obtaining material of appropriate mechanical parameters and temperature (in the range of body temperature) of transition from “frozen” state to primal.

## Material and methods

The investigations of chain microstructure of LL-lactide, glycolide and trimethylene carbonate terpolymers obtained on zirconium initiator ( $Zr(acac)_4$ ), were performed using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra were recorded at 300 MHz with a Varian Unity Iova Spectrometer at 80°C. Dried dimethyl sulfoxide- $d_6$  was used as a solvent and tetramethylsilane was used as the internal standard. The  $^1H$  NMR spectra were obtained with 32 scans, a 3.74 s acquisition time, and a 7  $\mu$ s pulse width. Number of scans for  $^{13}C$  NMR spectra was 16500, acquisition time 1.8 s, pulse width was 9  $\mu$ s.

## Results

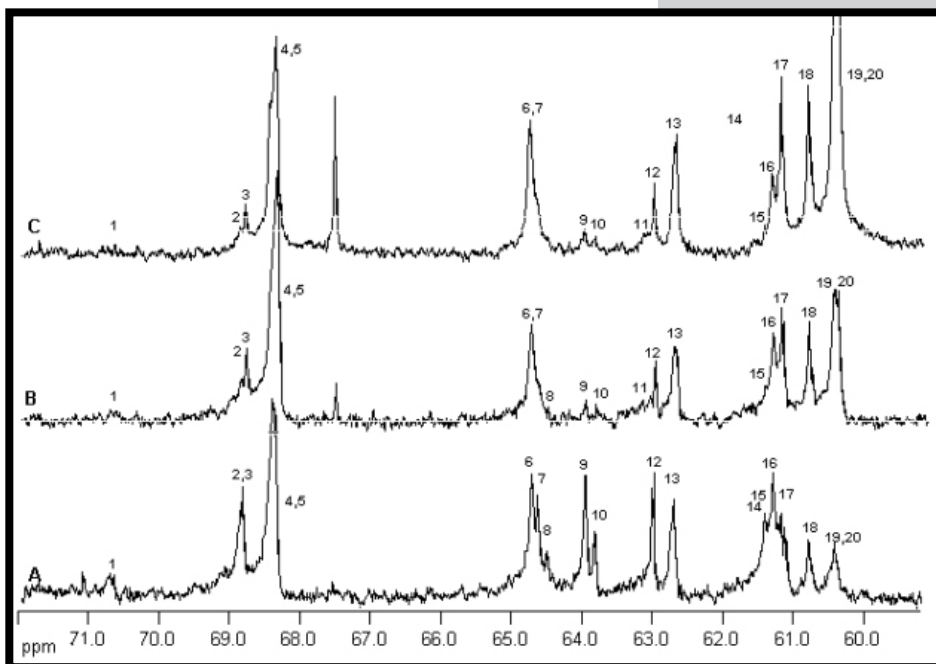
In order to determine the chain microstructure of LL-lactide, glycolide and TMC terpolymer, samples with following monomeric unit contribution were used: lactidyl LL, glycolidyl GG and carbonyl T (A: 35% mol. LL/ 20%mol. GG/ 45% mol. T; B: 35%mol. LL/ 35% mol. GG/ 30% mol. T; C: 25% mol. LL/ 50% mol. GG/ 25% mol. T). By means of  $^1H$  NMR method molar content of particular monomeric units was determined.

Much more information about terpolymer's chain microstructure was received from  $^{13}C$  NMR spectra. The most sensitive spectral region, best for detailed analysis of groups and sequences appearing in terpolymer's chain, turned out to be methine carbon region from lactide and methylene carbon regions from glycolide and TMC.

Sequences	
Lactide sequences (methine carbon region)	
1	TLT + TLLT + TLLL + TLLG
2	GLLT + GLLT
3	TLLLL + LLLL
4	LLLL
5	LLGG
Carbonate sequences (Methylene carbons O-CH <sub>2</sub> region)	
6	GGT'GG + TGT'GG
7	GGT'T
8	GT'GT + GGT'GT + LT'T + TT'L
9	TT'T + TT'T + TT'G
10	TT'GG
14	TT'L + LT'T
15	LT'L + LT'L
16	GGT'T
17	GGT'GG + GGT'GT TGT'GG + TGT'GT
Glycolide sequences (methylene carbons region)	
11	TGGGT + TGGGL
12	TGT + TGGT + TGGL
13	GGGGT + TGGGT + LGGGT
18	TGGT, TGGGG,
19	LLGG
20	GGGG
T' = -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OCO- T'' = -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -OCO-	

**TABELA 1. Przyporządkowanie sekwencji, występujących w łańcuchu terpolimeru w widmie  $^{13}C$  NMR poli(laktydu/glikolidu/TMC).**

**TABLE 1. Assignment of sequences in  $^{13}C$  NMR spectrum of poly(lactide/glycolide/TMC).**



RYS.2. Widma  $^{13}\text{C}$  NMR terpolimeru LL-laktydu, glikolidu i TMC (zakres węgli metinowych laktydu oraz metylenowych glikolidu i węglanu).

FIG.2.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of LL-lactide, glycolide and TMC terpolymer (methine carbon region from lactide and methylene carbon regions from glycolide and TMC).

Na podstawie intensywności poszczególnych linii spektralnych zbadano zależność udziału poszczególnych jednostek monomerycznych na zawartość długich bloków oraz sekwencji bezładnych w łańcuchu polimerowym.

On the basis of the intensity of particular spectral lines, contribution of appropriate monomeric units dependence on the contribution of long blocks and mixed segments was investigated.

Sample	Long L blocks [%]	Long G blocks [%]	Long T blocks [%]	Mixed GL segments [%]	Mixed GT segments [%]	Mixed LT segments [%]
A	16	2	4	8	53	17
B	16	8	0	16	45	15
C	8	19	0	25	41	7

TABELA 2. Udział długich bloków komonomerycznych i segmentów bezładnych.  
TABLE 2. Contribution of long comonomeric blocks and mixed segments.

## Wnioski

Analiza mikrostruktury terpolimerów laktydu, glikolidu i TMC jest możliwa przy użyciu spektroskopii NMR. Na podstawie wyników  $^1\text{H}$  NMR określono udział jednostek komonomerycznych. Natomiast wyniki analiz  $^{13}\text{C}$  NMR umożliwiły wyznaczenie takich parametrów jak procentowy molowy udział długich bloków polimerowych i segmentów bezładnych. Stwierdzono, iż różna zawartość jednostek monomerycznych wpływa na mikrostrukturę łańcucha polimerowego.

## Podziękowania

Badania finansowane z programu EU6FP Excellence – BIOMAHE FP-6-509232.

## Conclusions

Analysis of LL-lactide/glycolide/TMC terpolymer's microstructure is possible with use of NMR spectroscopy. Results of  $^1\text{H}$  NMR spectra allowed to calculate the content of comonomeric units, whereas  $^{13}\text{C}$  NMR percentage molar content of long polymer blocks and mixed segments. It was found that different monomeric unit content influences the polymer chain microstructure.

## Acknowledgements

Investigations were supported by EU6FP Excellence – BIOMAHE, FP-6-509232.

## Piśmiennictwo

- [1] Dobrzyński, P.; Kasperczyk, J.; J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2005, 44, 98-114.
- [2] Jeonga, B.; Gutowska, A.; Trends in Biotechnology 2002, 20, 305-311.
- [3] Lendlein, A.; Kelch, S.; Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2034-57

## References

- [4] Wache, H. M.; Tartakowska, D. J.; Heinrich, A. Wagner, M. H.; J. Mat. Sci.: Mat. Med. 2003, 14,109-12
- [5] Kawai, T. I in.; Plastic molded articles with shape memory property, US Patent 4, 950, 258.

# ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI DO BADAŃ POLIMERÓW Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU

BOŻENA KACZMARCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI,  
JANUSZ KASPERCZYK, MACIEJ BERO

CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN  
W ZABRZU

## Streszczenie

W pracy zaprezentowano wyniki badań nad wykazującymi właściwość pamięci kształtu bioresorbруемymi terpolimerami laktyd/glikolid/trimetylenowęglan. Celem wyjaśnienia charakteru występujących w tych terpolimerach oddziaływań, decydujących o istnieniu ich zdolności do zapamiętywania kształtu, zastosowano do badań metodę spektroskopii w podczerwieni i drugie pochodne widm.

**Słowa kluczowe:** terpolimery laktyd/glikolid/trimetylenowęglan, materiały bioresorbabowalne, wiązania wodorowe

[Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 51-54]

## Wstęp

Najczęściej stosowanymi w biomedycynie syntetycznymi polimerami bioresorbруемymi są poliestry i poliwęglany alifatyczne otrzymywane z cyklicznych monomerów takich jak: laktyd, e-kaprolakton czy trimetylenowęglan. Szczególnie interesujące wydają się próby kopolimeryzacji tych monomerów prowadzone specjalnie w celu otrzymywania nowego biodegradowalnego materiału, który oprócz biokompatybilności charakteryzuje się również własnościami zapamiętywania kształtu. Własność ta, nazywana pamięcią kształtu, polega na zdolności do powrotu z kształtu przejściowego ("zamrożonego") otrzymanego w wyniku mechanicznej deformacji, do wcześniejszego pierwotnego kształtu, wywołwanej zdefiniowanym bodźcem, którym najczęściej jest temperatura. Efekt ten związany jest z warunkiem uzyskania specyficznego chemicznego lub fizycznego efektu sieciowania liniowego łańcucha. W pracy przedstawiono wyniki badań nad oddziaływaniami typu wiązań wodorowych występujących w terpolimerach laktyd/glikolid/trimetylenowęglan, które wykazują pamięć kształtu. Oddziaływanie takie może być jedną z przyczyn występowania tej zaobserwowanej własności. Do badań tych wybrano metodę spektroskopii w podczerwieni. Metoda spektroskopii w podczerwieni jest szeroko znaną i stosowaną techniką do badań zarówno struktury związków polimerowych jak i występujących w polimerach oddziaływań. Rozwinięta w ostatnich latach spektrometria pochodna pozwala na obserwowanie nawet niewielkich zmian w widmie, co znacznie poszerza możliwości badawcze spektroskopii w podczerwieni.

## Materiały i metody

Do badań wybrano terpolimery otrzymane w reakcji terpolimeryzacji l-laktydu, glikolidu i trimetylenowęglanu inicjowanej acetyloacetonianem cyrkonu. Analizowano próbki o następującym składzie (TABELA):

# APPLICATION OF INFRARED SPECTROSCOPY IN SHAPE MEMORY POLYMERS STUDY

BOŻENA KACZMARCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI,  
JANUSZ KASPERCZYK, MACIEJ BERO

CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS PAS, ZABRZE

## Abstract

*This work presents results of the study of bioresorbable lactide/glycolide/trimethylene carbonate terpolymers exhibiting the shape memory properties. Infrared spectroscopy and second derivative spectra were used to explain the character of appearing at terpolymers interactions, which determine the possibility of existence the shape memory ability of these terpolymers.*

**Keywords:** lactide/glycolide/trimethylene carbonate terpolymers, bioresorbable materials, hydrogen bonds.

[Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 51-54]

## Introduction

Aliphatic polyesters and polycarbonates synthesized from cyclic monomers as: lactide, e-caprolactone or trimethylene carbonate are the most frequently used synthetic bioresorbable polymers in medicine. The most interesting seems the study of copolymerization of these monomers led especially in the aim to obtain new bioresorbable material, which besides biocompatibility would characterize also shape memory properties. That property depends on capability of return from transient shape ("freezing"), obtained as a result of mechanical deformation, to the early original shape, caused by defined stimulus, the most frequently, temperature. That effect is the condition of receiving the specific chemical or physical effect of cross-linking of linear chain. This work presents results of the study on hydrogen bonding type interactions appearing in lactide/glycolide/trimethylene carbonate terpolymers, which demonstrate the shape memory. Such interactions can be one of the reasons of appearing that observed property. To investigate it infrared spectroscopy method was used. Infrared spectroscopy is well known technique as well as in the polymer structure studies as in the investigations of interactions appearing in polymers. Developed recently derivative spectroscopy allow to observed even small changes in infrared spectrum, which remarkably broad the possibilities in infrared spectroscopy studies.

## Materials and methods

The terpolymers investigated were obtained in the terpolymerization reaction of l-lactide, glycolide and trimethylene carbonate using Zr acetylacetonate as the initiator. The following content samples were analyzed (see TABLE):

	T1	T2	T3	T4
Glikolidyl / Glicolidyl	39%	38%	35%	34%
Laktydyl / Lactidyl	52%	50%	52%	20%
Węglan / Carbonate	10%	12%	13%	46%



Próbki T3 i T4, różniące się zawartością l-laktidu i trimetylenowęglanu są amorficzne i wykazują bardzo dobre własności pamięci kształtu. Próbką T2 częściowo krystaliczna również wykazuje właściwości pamięci kształtu, natomiast próbka T1 o niższej masie cząsteczkowej, silnie blokowa, krystaliczna nie wykazuje tych właściwości.

Próbki badano w postaci pastylek w bromku potasu. Widma w podczerwieni rejestrowano na spektrometrze FTS-40 z fourierowską transformacją firmy BIO-RAD (obecnie Digilab) z rozdzielczością  $1\text{cm}^{-1}$  i przy liczbie skanów równej 32 w atmosferze azotu. Widma w zakresie temperatur od 20 do  $250^{\circ}\text{C}$  rejestrowano co  $10^{\circ}\text{C}$  przy szybkości grzania  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . stosując przystawkę temperaturową firmy Carl Zeiss Jena.

Drugie pochodne widm obliczono stosując metodę Savitzky-Golay przy liczbie konwolucji 20 i stopniu wielomianu 2.

## Wyniki i dyskusja

Widma FTIR otrzymane dla badanych terpolimerów w temperaturze pokojowej w zakresie charakterystycznym dla drgań rozciągających grupy estrowej C=O oraz drgań rozciągających i deformacyjnych grupy alifatycznej różnią się od widma uzyskanego po zsumowaniu widm FTIR poszczególnych polimerów w odpowiednich proporcjach.

Obserwowane zmiany w widmach są niewielkie, nie wskazują więc raczej na zmiany w strukturze chemicznej i mogą świadczyć o zmianie oddziaływań międzycząsteczkowych (np. wiązania wodorowe) lub zmianie uporządkowania w próbkach.

Aby różnice występujące w widmach FTIR w/w związków były bardziej widoczne obliczono drugie pochodne tych widm.

W zakresie charakterystycznym dla drgań rozciągających estrowej grupy karbonylowej, dla drugiej pochodnej widma uzyskanego po matematycznym dodaniu widm czystych polimerów otrzymano pasmo z maximum przy  $1748\text{cm}^{-1}$  (RYS.1), podczas gdy dla próbki T1 w zakresie tym obserwuje się szerokie pasmo z maximum przy  $1756\text{cm}^{-1}$  i widocznym garbem przy ok.  $1748\text{cm}^{-1}$ . Wskazuje to na powstanie w próbce terpolimeru innych oddziaływań międzycząsteczkowych niż ma to miejsce w czystych polimerach.

W przypadku drugiej pochodnej widm próbek T2 i T3, posiadających identyczny skład jak T1, obserwujemy w tym zakresie jedno szerokie pasmo z maximum przy  $1756\text{cm}^{-1}$  a więc silnie przesunięte w stosunku pasma dla drugiej pochodnej widma sumy czystych polimerów. Należy jednak zauważyć, że pasma dla tych próbek również różnią się od pasma dla próbki T1, co może świadczyć o innym charakterze oddziaływań w terpolimerze T1 i może być przyczyną braku właściwości zapamiętywania kształtu tego terpolimeru.

W zakresie charakterystycznym dla drgań deformacyjnych grupy alifatycznej dla próbki T1 obserwuje się jedno pasmo przy  $1458\text{cm}^{-1}$ , podobnie jak to ma miejsce dla pochodnej sumy widm. Dla próbek T2 i T3, wykazujących właściwości pamięci kształtu, dodatkowo występuje pasmo przy  $1462\text{cm}^{-1}$ . Obserwowane różnice w zakresie charakterystycznym dla drgań grupy karbonylowej i alifatycznej mogą świadczyć o występowaniu oddziaływań pomiędzy tlenem grupy karbonylowej a wodorem grupy alifatycznej, co może potwierdzać istnienie oddziaływań typu wiązań wodorowych w próbkach T2 i T3. W przypadku próbki T1 różnice tylko w zakresie charakterystycznym dla grupy karbonylowej mogą świadczyć o zmianie uporządkowania w tym terpolimerze w stosunku do czystych polimerów.

The T3 and T4 samples, differing the content of l-lactide and trimethylene carbonate, are amorphous terpolymers exhibiting good shape memory properties. The T2 sample, partly crystalline, also demonstrate shape memory properties, while lower molecular weight T1 one, strongly blocked and crystalline does not exhibit such properties.

Samples were analyzed in a form of pellets in potassium bromide. Infrared spectra were acquired on a DIGILAB FTS-40A Fourier transform infrared spectrometer in the range of  $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$  at a resolution of  $1\text{cm}^{-1}$  and for an accumulated 32 scans. Spectra recorded at elevated temperatures were obtained using Carl Zeiss Jena high-temperature control equipment in the temperature range from 20 to  $250^{\circ}\text{C}$ . The samples were heated under nitrogen at the rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . and FTIR spectra were recorded by  $10^{\circ}\text{C}$ .

Second derivative spectra were calculated using the Savitzky-Golay method, degree of polynomial: 2, number of convolution points: 20.

## Results and discussion

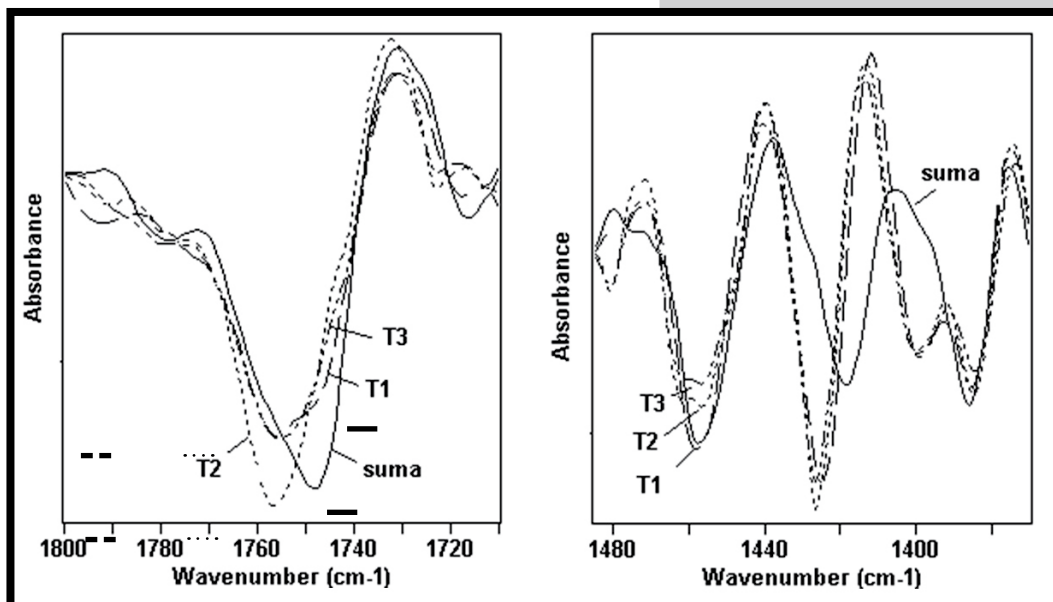
The FTIR spectra recorded for the terpolymers investigated at room temperature differ from the spectrum obtained after adding the FTIR spectra of corresponding pure polymers (polylactide, polyglycolide and trimethylcarbonate) at a relative ratio mainly in the region characteristic for the stretching vibrations of the C=O ester group and the stretching and deformation vibrations of aliphatic groups. The differences observed are rather small and do not indicate on the structure changes. They rather prove that changes at intermolecular interactions (hydrogen bonding) or changes at terpolymer ordering take place.

Considering that the differences observed for analyzes samples are small, the second derivative spectra were calculated.

In the region ascribed to stretching vibrations of the ester carbonyl group in the case of the second derivative spectrum of the sum of pure polymers spectra the band at  $1748\text{cm}^{-1}$  (FIG.1) is obtained, while for the T1 sample broad band with maximum at  $1756\text{cm}^{-1}$  and a shoulder at  $1748\text{cm}^{-1}$  is observed. This indicates that the different interactions appears in terpolymer than in the pure polymers.

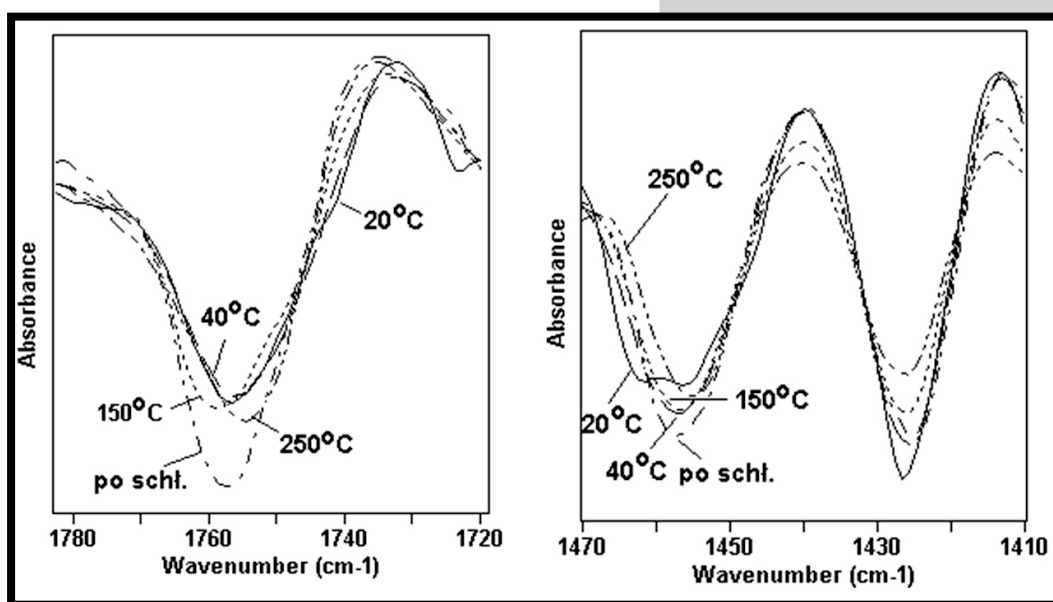
In the case of the second derivative spectra of the T2 and T3 samples, with the same chemical constitution as the T1 one, only one broad band with maximum at  $1756\text{cm}^{-1}$  is observed in that region. Thus, it is strongly shifted in relation to the mathematical sum of pure polymers spectra. It can be also noticed that spectra of these samples differ from the spectrum of the T1 one and it could prove about different interactions existence in the terpolymer T1 and it could be a result of absence of shape memory properties in that case.

Similarly as for the sum of pure polymer spectra, in the region corresponding to stretching vibrations of the aliphatic groups one band at  $1458\text{cm}^{-1}$  appears for the T1 sample, while for the shape memory terpolymers T2 and T3 additionally the band at  $1462\text{cm}^{-1}$  is detected. These differences observed at the regions due to vibrations of the ester carbonyl and aliphatic groups can suggest that the interactions between the oxygen of carbonyl group and the hydrogen from aliphatic groups take place, which could confirm the existence of hydrogen bond type interactions in the case of the T2 and T3 terpolymers. The differences observed for the T1 only for the carbonyl group can prove about different ordering in that sample in relation to pure polymers.



RYS.1. Drugie pochodne widm FTIR dla sumy widm czystych polimerów (—) oraz terpolimerów T1 (---), T2 (...) i T3 (-.-.-).

FIG.1. Second derivative spectra of the sum of pure polymers spectra (—) and terpolymers: T1 (---), T2 (...) and T3 (-.-.-).



RYS.2. Drugie pochodne widm FTIR otrzymane dla terpolimeru T2 w wyższych temperaturach.

FIG.2. Second derivative spectra recorded for terpolymer T2 at elevated temperatures.

Próbka T4 znacznie różni się składem od pozostałych, co odzwierciedla się w uzyskanym widmie i uniemożliwia bezpośrednie porównanie tego widma z widmami pozostałych terpolimerów. Jednak i w tym przypadku występują różnice pomiędzy pochodną widma próbki a pochodną widma sumy widm czystych polimerów w odpowiednim stosunku.

Pasma występujące w zakresie charakterystycznym dla drgań rozciągających grupy alifatycznej dla próbki T4 są szersze i o niższej intensywności niż dla sumy widm czystych polimerów.

W zakresie charakterystycznym dla drgań rozciągających estrowej grupy karbonylowej w przypadku pochodnej widma sumy obserwuje się stosunkowo ostre pasmo przy  $1746\text{cm}^{-1}$ , a dla próbki T4 szerokie przy  $1750\text{cm}^{-1}$  i z widocznym garbem przy ok.  $1760\text{cm}^{-1}$ .

Ponadto obserwuje się także przesunięcia w zakresie charakterystycznym dla drgań deformacyjnych grupy alifatycznej. Pasma występujące w pochodnej sumy widm przy  $1418\text{cm}^{-1}$  przesunęło się do  $1427\text{cm}^{-1}$  a pasmo przy  $1383\text{cm}^{-1}$  znacząco zmniejszyło swą intensywność. Pojawiło się natomiast pasmo przy  $1400\text{cm}^{-1}$ , obserwowane również dla pozostałych terpolimerów.

Opisane więc powyżej różnice, podobnie jak dla terpolimerów T2 i T3, mogą wskazywać także na obecność oddziaływań typu wiązań wodorowych w tym terpolimerze.

The constitution of the sample T4 notably differs from that of the other samples, which is reflected at obtained spectrum and makes impossible direct comparing of that spectrum with these of the other terpolymers. However also in that sample differences between the T4 second derivative spectrum and that of the sum of pure polymers are noticed.

The bands appearing in the region characteristic for the stretching vibrations of the aliphatic group for the sample T4 are broader and lower intensity than these of the sum of pure polymers.

In the region attributed to stretching vibrations of the ester carbonyl group for the sum of pure polymer spectra relatively sharp band with maximum at  $1746\text{cm}^{-1}$  is recorded, while for the T4 sample broad band at  $1750\text{cm}^{-1}$  with a shoulder at about  $1760\text{cm}^{-1}$  is detected.

Moreover also the shifts in the region associated with deformation vibrations of aliphatic groups are observed. The band appearing for the sum of polymer spectra at  $1418$  shifts to  $1427\text{cm}^{-1}$  and the band at  $1383\text{cm}^{-1}$  considerably diminishes its intensity. On the contrary appears the band at  $1400\text{cm}^{-1}$ , which is also observed for the other terpolymers.

The differences ascribed above, similarly as for the T2 and T3 terpolymers, can indicate of the presence of the hydrogen bond type interactions also in the case of that terpolymer.

Celem dokładniejszego zanalizowania tych oddziaływań wykonano widma poszczególnych terpolimerów w wyższych temperaturach.

Dla wszystkich badanych próbek zmiany w zakresie charakterystycznym dla drgań rozciągających grup alifatycznych są porównywalne. Wraz z wygrzewaniem próbek pasma przy 2962, 2921 i 2853 $\text{cm}^{-1}$  przesuwa się w stronę wyższych liczb falowych a ich intensywność się zmniejsza. Po schłodzeniu intensywności pasm wzrastają i stają się porównywalne z intensywnością w widmie otrzymanym w 180°C. Podobnie z położeniem pasm.

Większe różnice dla poszczególnych terpolimerów obserwuje się w zakresie charakterystycznym dla drgań rozciągających estrowej grupy karbonylowej. Podczas wygrzewania próbki T1 do 150°C pasmo to przesuwa się do 1760 $\text{cm}^{-1}$  oraz zwiększa się jego intensywność. Natomiast garb przy 1748 $\text{cm}^{-1}$  zmniejsza swoją intensywność. Dalsze wygrzewanie powoduje dalsze obniżenie intensywności tego pasma. Natomiast pasmo przy 1760 $\text{cm}^{-1}$  przesuwa się z powrotem w stronę niższych liczb falowych, lecz w dalszym ciągu jego intensywność rośnie. W 250°C widoczne jest jedno pasmo przy 1754 $\text{cm}^{-1}$ , które po schłodzeniu przesuwa się do 1757 $\text{cm}^{-1}$ , jeszcze bardziej zwiększając swoją intensywność. Dla próbki T2 intensywność pasma obserwowanego w temperaturze pokojowej przy 1756 $\text{cm}^{-1}$  podczas wygrzewania do 150°C nieco się podwyższa a pasmo przesuwa się do 1759 $\text{cm}^{-1}$ , po czym przesuwa się w stronę niższych liczb falowych osiągając w 250°C położenie przy 1754 $\text{cm}^{-1}$ . Równocześnie pojawia się garb przy 1750 $\text{cm}^{-1}$ . Po schłodzeniu garb zanika, pasmo obserwuje się przy 1757 $\text{cm}^{-1}$ , lecz intensywność dalej się zwiększyła. Podczas wygrzewania próbek T3 i T4 obserwuje się jedynie niewielkie zmiany w widmie w tym zakresie, co może być tłumaczone amorficznością tych terpolimerów. Zmiany obserwowane więc dla próbki T1 i T2 w tym zakresie mogą wynikać z krystaliczności (T1) lub częściowej krystaliczności (T2) tych próbek.

Jednakże dla próbek T2 i T3 obserwuje się również zmiany w zakresie odpowiadającym drganiom deformacyjnym grup alifatycznych. Już w temperaturze 40°C zanika pasmo przy 1462 $\text{cm}^{-1}$  (RYS.2) i w 250°C obserwuje się tylko pasmo przy 1455 $\text{cm}^{-1}$ , które po schłodzeniu nieco zwiększa swoją intensywność przesuwa się do 1447 $\text{cm}^{-1}$ , natomiast pasmo przy 1462 $\text{cm}^{-1}$  nie pojawia się. Ponieważ opisane zmiany w tym zakresie dotyczą zarówno próbki amorficznej jak i częściowo krystalicznej, można je wytłumaczyć jako zmiany związane ze zrywaniem „wiązań wodorowych” obecnych w tych terpolimerach.

## Podsumowanie

Wykorzystując metodę spektroskopii pochodnej w zakresie podczerwieni wykazano istnienie w badanych terpolimerach oddziaływań zarówno związanych z uporządkowaniem jak również typu wiązań wodorowych. Występujące w analizowanych związkach wiązaniach wodorowe prawdopodobnie odgrywają rolę w zdolności pamięci kształtu tych terpolimerów.

In the aim to more precise analyzing of these interactions the spectra at elevated temperatures are recorded.

For the all samples investigated changes observed in the region corresponding to stretching vibrations of the aliphatic groups are comparable. During heating the bands at 2962, 2921 and 2853 $\text{cm}^{-1}$  shift to higher wavenumbers diminishing their intensities. After cooling to room temperature intensities increase being comparable with these obtained at 180°C. Similarly with the positions of them.

More differences are observed in the region arising from stretching vibrations of the ester carbonyl group. During heating of the T1 sample to 150°C this band shifts to 1760 $\text{cm}^{-1}$  increasing its intensity. On the contrast shoulder at 1748 $\text{cm}^{-1}$  decrease its intensity. Further heating causes following increase in intensity of that shoulder, while the band at 1760 $\text{cm}^{-1}$  shifts back to lower wavenumbers although its intensity is continuously increasing. At 250°C only one band at 1754 $\text{cm}^{-1}$  is detected, which after cooling shifts to 1757  $\text{cm}^{-1}$  increasing its intensity.

Intensity of the band observed for the T2 sample at room temperature at 1756 $\text{cm}^{-1}$  during heating to 150°C slightly increases its intensity and the band shifts to 1759 $\text{cm}^{-1}$ . During further heating it shifts to lower wavenumbers and at 250°C reaches 1754 $\text{cm}^{-1}$ . Simultaneously appears a shoulder at 1750 $\text{cm}^{-1}$ . After cooling the shoulder disappears and the band is observed at 1757 $\text{cm}^{-1}$ , although its intensity further increases. During heating of the T3 and T4 samples only small changes in that region of the second derivative spectra are detected. It can be explained by amorphous character of these terpolymers. Thus, changes in that region for the T1 and T2 samples can be a result of crystalline (T1) or partial crystalline (T2) character of them.

However for the T2 and T3 samples changes are also observed at the region corresponding to deformation vibrations of aliphatic groups. Already at 40°C the band at 1452 $\text{cm}^{-1}$  disappears (FIG.2) and at 250°C only one band at 1455 $\text{cm}^{-1}$  is recorded, which after cooling slightly increases its intensity, shifting to 1447 $\text{cm}^{-1}$ . The band at 1462 $\text{cm}^{-1}$  does not appear after cooling. Due to the fact that that ascribed changes concern as well as the amorphous as partly crystalline samples it can be explain as the changes connected with breaking of hydrogen bonds present in these polymers.

## Summary

The second derivative spectroscopy method in infrared region was used to demonstrate the existence in terpolymers investigated interactions connecting as well as with polymer ordering as with hydrogen bonding type interactions. Appearing at terpolymers analyzed hydrogen bonds probably plays role in shape memory ability of these terpolymers.

# ANALIZA TOPOGRAFII POWIERZCHNI MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH, STOSOWANYCH JAKO PODŁOŻA DO HODOWLI CHONDROCYTÓW TECHNIKĄ AFM

JOANNA SZCZERBA<sup>1</sup>, ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>,  
KATARZYNA JELONEK<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
JAN JURUSIK<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, IRENEUSZ BIELECKI<sup>3</sup>,  
ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
UL. NARCYZÓW 1, SOSNOWIEC 41-200, POLSKA

<sup>2</sup>POLSKA AKADEMIA NAUK,  
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, ZABRZE 41-819, POLSKA

<sup>3</sup>ODDZIAŁ LARYNGOLOGII SPSK NR 6, GÓRNOŚLĄSKIE CENTRUM  
ZDROWIA DZIECKA I MATKI W KATOWICACH,  
UL. MEDYKÓW 16, 40-752 KATOWICE, POLSKA

## Streszczenie

Przy pomocy mikroskopu sił atomowych przeprowadzono analizę topografii powierzchni materiałów polimerowych w aspekcie badań adhezji i proliferacji komórek chondrocytów. Hodowle komórkowe prowadzono na płytkach opłaszczonych kopolimerami laktydu z glikolidem lub laktydu z trimetylenowęglenem. Kopolimer statystyczny laktydu z glikolidem 85/15 otrzymany w kopolimeryzacji wobec inicjatora cyrkonowego okazał się obiecującym materiałem o potencjalnym zastosowaniu jako nośnika chondrocytów w terapii defektów tkanki chrzęstnej.

[*Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 55-59*]

## Wprowadzenie

Jednym z największych wyzwań w badaniach z zakresu medycyny regeneracyjnej dotyczących chrząstki szklistej jest odtworzenie, w warunkach in vitro tkanki, której macierz pozakomórkowa charakteryzowałaby się właściwościami biochemicznymi oraz biomechanicznymi zbliżonymi do tkanki natywnej. Ważnym czynnikiem wpływającym na różnicowanie się komórek do pożądanego fenotypu jest dobór biokompatybilnego nośnika o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych oraz strukturze przestrzennej. Właściwości nośnika powinny sprzyjać zasiedlaniu go przez komórki oraz ich namnażaniu i różnicowaniu do takiej postaci, aby mogły pełnić pożądaną funkcję. Interakcje z podłożem wpływają na aktywność oraz fenotyp komórek, a dobór materiału z jakiego będzie ono wykonane daje możliwość kontrolowania procesów różnicowania chondrocytów oraz ich zachowania.

Celem pracy była analiza topografii powierzchni nośników polimerowych w aspekcie zjawisk adhezji i proliferacji komórek tkanki chrzęstnej.

## Materiały i metody

Chondrocyty izolowano z chrzęstnego fragmentu żebra 3 letniego chłopca i umieszczono w pożywce MEM (Sigma) z dodatkiem 10% FBS. Hodowlę prowadzono w polistyrene-

# ANALYSIS OF THE SURFACE TOPOGRAPHY OF POLYMERIC SUBSTRATA FOR CHONDROCYTE CULTURE USING THE AFM TECHNIQUE

JOANNA SZCZERBA<sup>1</sup>, ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>,  
KATARZYNA JELONEK<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
JAN JURUSIK<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, IRENEUSZ BIELECKI<sup>3</sup>,  
ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
NARCYZÓW 1, SOSNOWIEC 41-200, POLAND

<sup>2</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY,  
M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, ZABRZE 41-819, POLAND

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF OTOLARYNGOLOGY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
MEDYKÓW 16, KATOWICE 40-752, POLAND

## Abstract

*The analysis of the surface topography of polymeric materials in aspect of chondrocyte adhesion and proliferation was performed using atomic force microscopy technique. Dishes coated with biodegradable copolymers of lactide with glycolide and lactide with trimetylenocarbonate were used in cell culture. Random poly(L-lactide-co-glycolide) 85/15 obtained in the copolymerization with zirconium initiator proved the promising material, which can be used as the carrier of chondrocytes in therapy of the cartilaginous tissues defects.*

[*Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 55-59*]

## Introduction

One of the greatest challenges of regenerative medicine researches is the reconstruction in vitro of hyaline cartilage with extracellular matrix characterized by biochemical and biomechanical properties similar to the native tissue. The most essential item is a selection of biocompatible cell carrier with appropriate physicochemical properties and the spatial architecture, stimulating cell differentiation and acquisition of desirable phenotype. Properties of the carrier should promote its colonization by cells and stimulate their proliferation. Interactions of cells with the substrate influence the activity and phenotype of cells. Selection of appropriate material to prepare of the cell carrier gives ability to control processes of differentiation and activity of chondrocytes.

The aim of the work was the analysis of the surface topography of polymeric materials in aspect of the phenomena of chondrocyte adhesion and proliferation.

## Materials and methods

The cells were isolated from costal cartilage from a rib of a three-year-old patient. Isolated cells were cultured in polystyrene flasks at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Chondrocytes were seeded on cell culture dishes coated with copolymers of L-lactide, glycolide and trimethylene carbonate. The first material used was a copolymer of glycolide and L-lactide with a molar ratio of monomers 85:15. The second copolymer

nowych naczyniach w temperaturze 37°C, w atmosferze 95% powietrza i 5%CO<sub>2</sub>. Jako podłoża dla chondrocytów wykorzystano kopolimery glikolidu, laktydu oraz trimetylenowęglanu (TMC). Podłoże 1 wykonano z kopolimeru L-laktydu z glikolidem o udziale molowym jednostek komonomerycznych 85/15, a podłoże 2 wykonano z kopolimeru L-laktydu z TMC o udziale jednostek komonomerycznych 70/30. Próbę kontrolną stanowiły chondrocyty rosnące na niemodyfikowanym plastikowym podłożu polistyrenowym.

Topografia powierzchni podłoży oceniana była przy pomocy mikroskopu sił atomowych TopoMetrix Explorer AFM, pracującego w trybie kontaktowym.

Oceny morfologii chondrocytów dokonano po 96h hodowli przy pomocy mikroskopu odwróconego OLYMPUS-IX 70, zaś szybkość proliferacji komórek badano z wykorzystaniem zestawu CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit. Ten sam zestaw umożliwił ocenę procesu zakotwiczenia się chondrocytów na badanych podłożach. Zasada testu opiera się na pomiarze fluorescencji emitowanej przez barwnik CyQUANT GR, wiążący się z kwasami nukleinowymi komórek. Ekspresję podjednostek integrynowych  $\alpha 5$  oraz  $\beta 1$  badano z wykorzystaniem immunoblotingu.

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta, przy użyciu programu STATISTICA 6.0.

## Wyniki i dyskusja

Kluczowe znaczenie dla wdrożenia nowych metod leczenia ubytków tkanki chrzęstnej ma opracowanie biodegradabilnych nośników, które mogłyby być wykorzystywane do wytwarzania trójwymiarowych, resorbowlanych podłoży o mikrostrukturze i właściwościach sprzyjających zasiedlaniu ich przez komórki. Podłoże powinno także zapewnić środowisko, w którym komórki mogą utrzymać zróżnicowany fenotyp, syntetyzować wymagane białka i molekuly macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wpływ na zachowanie i morfologię komórek ma nie tylko skład chemiczny podłoża, ale także jego cechy fizyko-chemiczne, między innymi topografia powierzchni i porowatość. Komórki prawidłowe reagują z bardzo dużą czułością na rzeźbę powierzchni, która wpływa na stopień zakotwiczenia komórek do podłoża. Adhezja z kolei odgrywa istotną rolę w wielu procesach takich jak: proliferacja, różnicowanie komórek, ich apoptoza, migracja, a nawet ekspresja genów i kurczliwość komórek [1,2]. Tylko komórki przytwierdzone do podłoża podejmują syntezę DNA i proliferują, natomiast utrata tego kontaktu powoduje zahamowanie wzrostu i w wielu przypadkach śmierć apoptyczną [3].

Kontrola nad różnicowaniem się i proliferacją komórek jest niezwykle ważna w inżynierii tkankowej, dlatego celem prezentowanej pracy była ocena wpływu mikrostruktury dwóch podłoży polimerowych, na zdolność adhezji, proliferację oraz morfologię chondrocytów.

Po 96h od założenia hodowli, obserwowano jak zastosowane podłoża wpływają na morfologię dojrzałych chondrocytów, które mają tendencję do odróżnicowywania się w warunkach *in vitro* [4]. Tuż po uwolnieniu z tkanki chondrocyty przybierały postać kulistą swobodnie pływającą w pożywce, jednak w ciągu kilku godzin ulegały adhezji do podłoża. Zakotwiczone komórki ulegały rozplaszczeniu na dnie naczynia i traciły kulisty kształt (RYS.1), po czym

was 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate). The control material was standard tissue culture polystyrene. The surface morphology investigations of the polymeric films were performed in air using the atomic force microscope (TopoMetrix Explorer) in contact mode. The morphology of cells was analyzed using the inverted OLYMPUS IX70 microscope. Cell proliferation and adhesion were quantified by means of CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). The basis for this assay is the use of the green fluorescent dye (CyQUANT GR dye), which exhibits strong fluorescence enhancement when bound to cellular nucleic acids.  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrin subunits expression was measured by Western blotting.

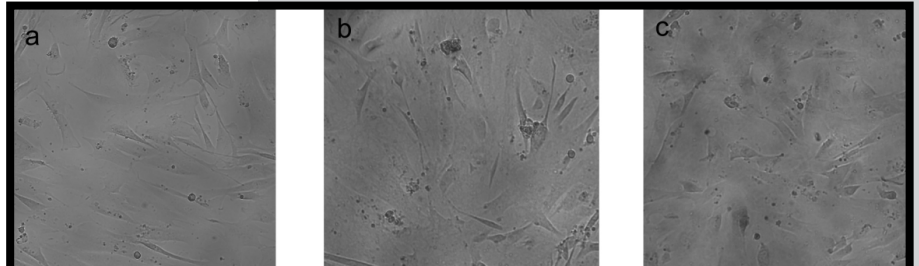
## Results and discussion

Finding new biocompatible carriers, which could be used for production of three-dimensional, resorbable scaffolds with the microstructure and properties supporting colonization by chondrocytes is of crucial importance for implementation of new procedures of therapy against cartilage defects. These scaffolds should provide the environment in which the cells can maintain differentiated phenotype, synthesize required proteins and molecules of the extracellular matrix.

Apart from chemical composition of the substrate, its physical features as well as the topography of surface and its porosity can influence on the behavior and the morphology of cells. The normal cells react with the great sensitivity on the relief of surface, which influences on the amount of cells anchored to the substrate. On the other hand adhesion plays an essential role in many processes such as: proliferation, differentiation, apoptosis, migration and even contractility of the cells and gene expression [1,2]. Only the cells attached to the substratum carry out the DNA synthesis and proliferate, and loss of this contact causes inhibition of growth and in many cases apoptotic death [3].

The precise control of differentiation and proliferation of the cells is extremely important in tissue engineering, and therefore, the aim of the presented work was the evaluation of the impact of microstructure of two polymeric materials on the adhesion, proliferation and morphology of human chondrocytes.

After 96h from starting a culture, the influence of polymeric substrata on morphology of mature chondrocytes was analyzed, the cells that have a tendency to dedifferentiate during *in vitro* propagation [4]. After release of chondrocytes from tissue, they take spherical shape freely floating in medium, however within few hours the cells underwent the adhesion to the substratum. Attached cells underwent flattening at the bottom of the cell culture dish. They lost the spherical shape (FIG.1) and underwent proliferation. The proliferation on the materials studied was only slightly



**RYS.1.** Obraz hodowli chondrocytów po 96 godzinach inkubacji na podłożu a) polistyrenowym, b) opłaszczonym polimerem 1, c) opłaszczonym polimerem 2 (powiększenie  $\times 100$ ).

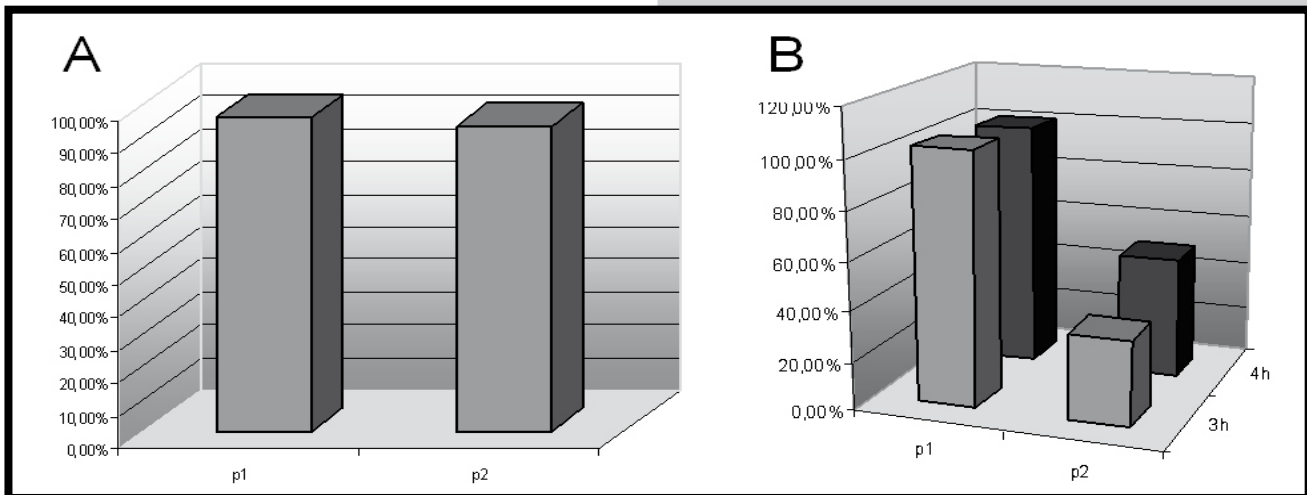
**FIG.1.** Image of chondrocytes after 96 h of the incubation in culture on a) polystyrene, b) 85:15 poly(L-lactide-co-glycolide), c) 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate (100 $\times$  enlargement).

podejmowały proliferację. Proliferacja na zastosowanych podłożach polimerowych była tylko nieznacznie mniejsza w porównaniu do jej szybkości na powierzchni polistyrenowej (RYS.2a). Tak dobry wzrost chondrocytów na tych biomateriałach można tłumaczyć znaczną ilością segmentów laktydylowych łańcucha kopolimerowego w podłożu. Potwierdzają to również wyniki badań Pamuły i wsp. [5], a także Hondy i wsp. [6], którzy sugerują lepszą kompatybilność polimerów zawierających w swoim składzie łańcuchy polilaktydowe w porównaniu z innymi poliestrami.

Z kolei ilość zaadsorbowanych chondrocytów po 3 i 4 godzinach hodowli na podłożach polimerowych różniła się istotnie (RYS.2b). Na podłożu 1 liczba zakotwiczonych chondrocytów była zbliżona do ich liczby w hodowli kontrolnej (RYS.2b). Natomiast na podłożu 2 zakotwiczanie komórek zachodziło znacznie wolniej niż w kontroli (RYS.2b).

decreased compared to the polystyrene surface (FIG.2a). Good growth of chondrocytes on these biomaterials can be explained by the abundance of lactide segments of polymeric chains. The findings of Pamuła et al. [5] as well as of Honda et al. [6] are generally in concordance with our results, moreover these authors suggest the better compatibility of polymers containing polylactid chains in their composition compared with the others polyesters.

On the other hand, the amount of attached chondrocytes after 3 and 4 h incubation on the polymeric materials differed significantly (FIG.2b). On the substratum 1 the amount of attached chondrocytes was similar as in control (FIG.2b). However, on the substratum 2 the anchoring of the cells occurred much slower than in the control (FIG.2b). Striking differences in the surface topography of both substrata could be an important factor influencing the rate of cell an-



**RYS.2. a) liczba chondrocytów po 96 godzinach hodowli na podłożach polimerowych 1 oraz 2 (% kontroli), b) liczba chondrocytów które uległy adhezji (po 3 oraz 4 h inkubacji) do podłoża polimerowego 1 oraz 2 w odniesieniu do hodowli kontrolnej na podłożu polistyrenowym (%).**

**FIG.2. a) Number of the cell after 96 h incubation on the polymer 1 and 2 (% of control), b) number of anchored chondrocytes (3 and 4 h incubation) to the polymer 1 and 2 (% of control on polystyrene base)**

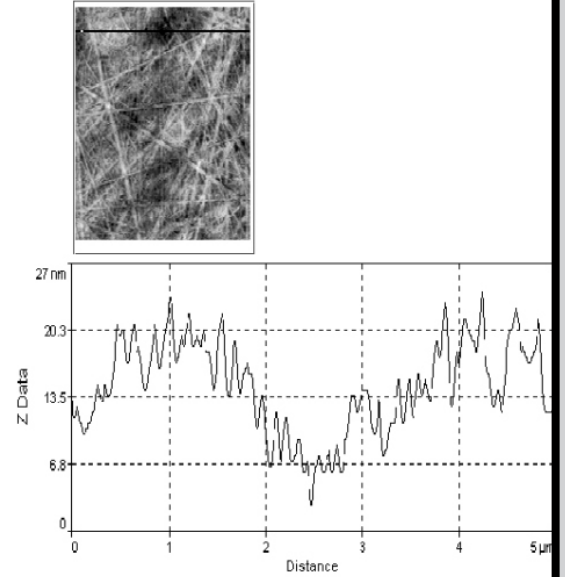
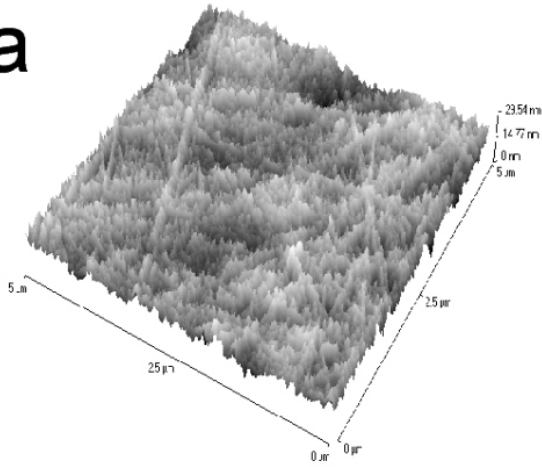
Czynnikami, który mógł mieć znaczący wpływ na szybkość zakotwiczania się komórek były różnice w topografii obu podłoży (RYS.3b,c). Chropowatość w dużym stopniu wpływa na różnice w zdolności zakotwiczania się chondrocytów [7]. Na zachowanie i wygląd komórek mają wpływ nawet bardzo drobne rysy powierzchni o głębokości 6 nm [8]. Podłoże 1 charakteryzowało się gładką powierzchnią z rzadką występującymi wgłębieniami (RYS.3b), natomiast na powierzchni materiału 2 widoczne były stosunkowo płytkie lecz liczne i ostre uwypuklenia i zagłębienia (RYS.3c). Niektórzy autorzy sądzą, że nierówności podłoża o ostrych kształtach mogą mechanicznie uszkadzać komórki [9]. Powierzchnia podłoża 2 wyglądała jak naszpikowana ostro zakończonymi stożkami (RYS.3c), co mogło utrudniać komórkom zakotwiczenie się. Podłoże 1 ze względu na swoją topografię (RYS.3b) pozwoliło najprawdopodobniej na wytworzenie większej ilości połączeń między jego powierzchnią, a integralnymi zakotwiczonymi w błonie komórkowej chondrocytów. Białka te odgrywają kluczową rolę w procesach adhezji komórek. Wiążą one białka cytoszkieletu z białkami substancji międzykomórkowej, co uruchamia kaskadę reakcji wewnątrzkomórkowych decydujących o morfologii oraz aktywności metabolicznej komórek, tym samym wpływając na procesy ich różnicowania.

Zdolność adhezji do danego podłoża w dużej mierze zależy także od składu poszczególnych podjednostek integrzyn [10]. Integrzyn  $\alpha 5 \beta 1$  odgrywa istotną rolę w kon-

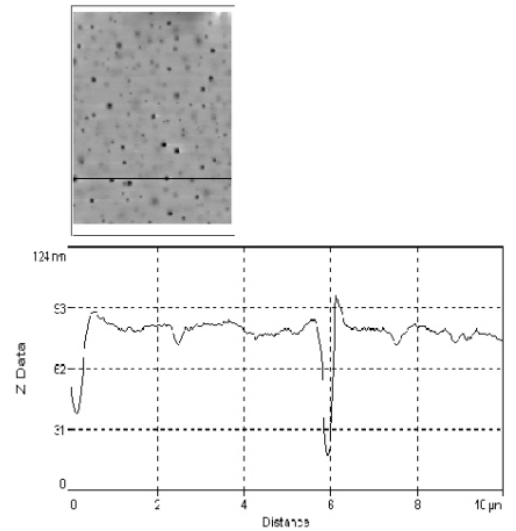
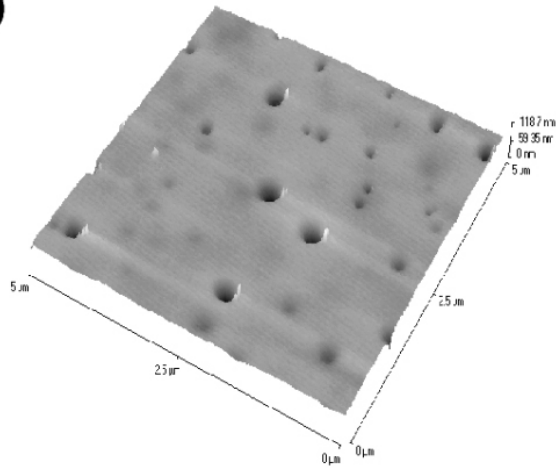
choring (FIG.3b,c). The roughness of surface significantly influences the ability of chondrocytes to attach [7]. Even slight scratches of the surface (6nm depths) can affect behavior and morphology of the cells [8]. The substratum 1 was characterized by a smooth surface with sparsely appearing hollows (FIG.3b). However, on the surface of polymer 2 relatively shallow but numerous and sharp heights and hollows were visible (FIG.3c). Some authors suggest that the sharp irregularities of surface can mechanically damage the cells (9). The surface of material 2 looked as larded with sharp ended cones (FIG.3c), what could make it difficult for cells to attach. The substratum 1 with regard to its topography (FIG.3b) most probably permitted for larger amounts of connections between its surface and integrins, the integral plasma membrane proteins of chondrocytes, than the material 2. These proteins act the key role in the attachment of a cell to the extracellular matrix (ECM) and in signal transduction from the ECM to the cell. They are combining proteins of cytoskeleton with proteins of intercellular substance, what is starting the cascade of intracellular reactions crucial for morphology and metabolic activity of the cells and influencing processes of differentiation. The ability of the cell to adhere to the substrate largely depends on the composition of individual subunits of integrins [10].

Integrins  $\alpha 5 \beta 1$  play an essential role in the control of the process differentiation of chondrocytes. Acting as mechanoreceptors they mediate the influence of mechanical

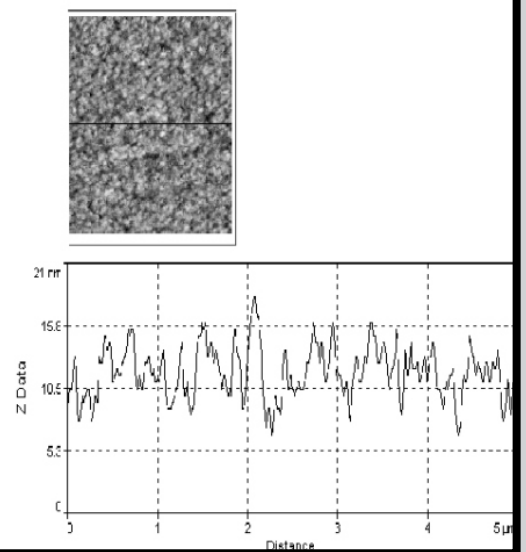
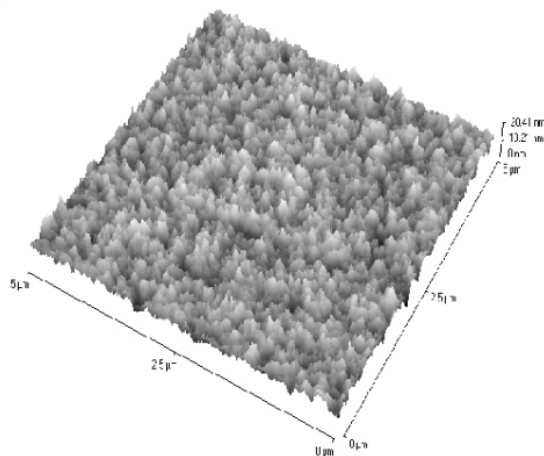
a



b



c



**RYS.3.** Topografia powierzchni podłoży: a) polistyrenowego, b) polimer 1 (85 % L-Laktyd/ 15% Glikolid), c) polimer 2 (70% L-Laktyd/30% TMC). Obraz uzyskany z mikroskopu sił atomowych.  
**FIG.3.** Topology of bases surfaces: a) polystyrene, b) 85:15 poly(L-lactide-co-glycolide), c) 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate). Atomic force microscope image.

troli procesu różnicowania chondrocytów. Działając jako mechanoreceptory pośredniczą one w oddziaływaniu bodźców mechanicznych na fenotyp tych komórek [11]. W obecnej pracy wykazano, że chondrocyty hodowane na powierzchni badanych biomateriałów utrzymywały na wysokim poziomie ekspresję podjednostek integrynowych  $\alpha 5$  oraz  $\beta 1$

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki możemy stwierdzić iż podłoże 1 (85:15 poli(L-laktydo-ko-glikolid) stanowi obiecujący materiał, który może być wykorzystany jako nośnik chondrocytów w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej. Ponadto technika AFM jest użytecznym narzędziem w badaniu topografii podłoży hodowlanych wykonanych z poliestrów alifatycznych.

## Podziękowania

Praca finansowana z grantu MNiSW: N51800731/0433 oraz NN-2-086/07

stimuli on the phenotype of these cells (11). In the current work it was shown that the chondrocytes cultured on the surface of investigated biomaterials had kept the expression of integrin subunits  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  on the high level.

Considering received results we can conclude that polymer 1 (85:15 poly(L-lactide-co-glycolide) is the promising material, which can be used as the carrier of chondrocytes in therapy of the cartilaginous tissues defects. Moreover, the AFM technique appeared as a useful tool in the investigations of topography of the solid substrata made from aliphatic polyesters.

## Acknowledgements

*This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No: N51800731/0433 and NN-2-086/07)*

## Piśmiennictwo

- [1] Yamada K.M., Geiger B.: *Curr Opin Cell Biol.*, 9, (1997), 76-85.
- [2] Gallant N.D., Michael K.E., Garcia A. J.: *Mol Biol Cell.*, 16, (2005), 4329-4340.
- [3] Frisch S.M., Ruoslahti E.: *Curr Opin Cell Biol.*, 9, (1997), 701-706.
- [4] Villar-Suarez V., Calles-Venal I., Bravo I.G., Fernandez-Alvarez J.G., Fernandez-Caso M., Villar-Lacilla J.M.: *J Biomed Biotechnol.*, 2, (2004), 86-92.
- [5] Pamuła E., Dobrzynski P., Bero M., Paluszkiwicz C.: *J. Mol. Structure.*, (2005), 744-747
- [6] Honda M.J., Yada T., Ueda M., Kimata K.: *J Oral Maxillofac Surg.*, 62, (2004), 1510-1516.

## References

- [7] Ishaug-Riley S.L., Okun L.E., Prado G., Applegate M.A., Ratcliffe A.: *Biomaterials.*, 20, (1999), 2245-2256.
- [8] Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoła J.: *Podstawy Cytofizjologii* PWN Warszawa (1998).
- [9] Bacakova L., Filova E., Rypacek F., Svorcik V., Stary V.: *Physiol Res.*, 53, (2004), 35-45.
- [10] El-Amin S.F., Attawia M., Lu H.H., Shah A.K., Chang R., Hickok N.J., Tuan R.S., Laurencin C.T.: *J. Orthop. Res.*, 20, (2002), 20-28.
- [11] Wright M.O., Nishida K., Bavington C., Godolphin J.L., Dunne E., Walmsley S., Jobanputra P., Nuki G., Salter D.M. *J Orthop Res.* 15 (1997) 742-747. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 2003, 14,109-12.