# ENGINEERING OF BIOMATERIA BIOMATERIALÓW VYDZIALU NYDERII STOWARZYSZENIA BIOMATERIALÓW

Number 89-91 Numer 89-91 Volume XII Rok XII

Wydanie specjalne Special edition

DECEMBER 2009 GRUDZIEŃ 2009

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

Editor Redaktor Elżbieta Pamuła

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

#### ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE: ADRES REDAKCJI:

AGH-UST al. Mickiewicza 30/A3 30-059 Cracow, Poland Akademia Górniczo-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



## INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac University Politennica of Bucharest, Romania

LUCIC BACAKOVA Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Romuald Będziński Politechnika Wrocławska / Wrocław University of Technology

Marta Błażewicz Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

Stanisław Błażewicz Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

Maria Borczuch-Łączka Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

TADEUSZ CIEŚLIK Śląski Uniwersytet Medyczny / Medical University of Silesia

Jan Ryszard Dąbrowski Politechnika Białostocka / Białystok Technical University

Andrzej Górecki Warszawski Uniwersytet Medyczny / Medical University of Warsaw

Robert Hurt Brown University, Providence, USA

James Kirkpatrick Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

WOJCIECH MATIA KUŚ Warszawski Uniwersytet Medyczny / Medical University of Warsaw

Małgorzata Lewandowska-Szumieł Warszawski Uniwersytet Medyczny / Medical University of Warsaw

Jan Marciniak Politechnika Śląska / Silesian University of Technology

Sergey Mikhalovsky University of Brighton, Great Britain

Stanisław Mitura Politechnika Łódzka / Technical University of Lodz

Roman Pampuch Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

Stanisław Pielka Akademia Medyczna we Wrocławiu / Wrocław Medical University

J**acek Składzień** Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków / Jagiellonian University, Collegium Medicum, Cracow

Andrei V.Stanishevsky University of Alabama at Birmingam, USA

ANNA ŚIÓSAYCZYK Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

TACIEUSZ TYZASKA Akademia Wychowania Fizycznego, Poznań / University School of Physical Education, Poznań

Dimitris Tsipas Aristotle University of Thessaloniki, Greece

# BI MATERIALS

## Wskazówki dla autorów

• • • • • • •

1. Prace do opublikowania w kwartalniku "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.

2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane\*.

(\*Prace nierecenzowane, w tym materiały konferencyjne, będą drukowane w numerach specjalnych pod koniec roku kalendarzowego.)

3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres redakcji na płytach CD wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.

4. Struktura artykułu:

• TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo

5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach. Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarnobiałe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).

 Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.

7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem. 8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.

9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.

10. Adres redakcji:

Czasopismo

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38 tel./fax: (48 12) 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, apowroz@agh.edu.pl www.biomat.krakow.pl

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41

Konto:

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3 Bank Śląski S.A. O/Kraków, nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001 Opłaty: Cena 1 numeru wynosi 20 PLN

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" should be written in English.

2. All articles are reviewed\*.

(\* Non-reviewed articles, including conference materials, will be printed in special issues at the end of the year.)

3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office on CD with a printout, drawings and photos.

4. A manuscript should be organized in the following order:

• TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words)

Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References

5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...

6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif., .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.

7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.

8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.

9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.

10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.

11. Manuscripts should be submitted for publication to:

#### Journal

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" AGH University of Science and Technology Faculty of Materials Science and Ceramics 30/A-3, Mickiewicza Avenue, 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38 tel./fax: (48 12) 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, apowroz@agh.edu.pl www.biomat.krakow.pl

## Subscription terms

Subscription rates: Cost of one number: 20 PLN

Payment should be made to: Polish Society for Biomaterials 30/A3 Mickiewicz Avenue 30-059 Cracow, Poland Bank Slaski S.A. O/Krakow account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Е	Ν	G	I	Ν	Е	Ε	R	Ν	G	0	F
B		:		M	A	1	ΓE	R	IA	_`	S

1

5

8

9

12

•

# SPIS TREŚCI

# POLYMER BASED SCAFFOLDS FOR TISSUE REGENERATION

A.GLORIA, V.GUARINO, M.G.RAUCCI, R.DE SANTIS, L.AMBROSIO

...........

TYROSINE-DERIVED NANOSPHERE	
FORMULATIONS FOR ENHANCED SKIN DELIVERY	1
P.Batheja, L.Sheihet, S.Salomon, A.Singer, J.Kohn,	
В.Місниіак-Кони	
CORRESPONDENCE BETWEEN TEETH BONE DE-	
STRUCTION AND COMPLICATIONS OF ACUTE	
ODONTOGENIC INFECTION AND ITS FOCAL	
DIFFUSION	4

I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, T.N.SYTCHIK

LIPID PEROXIDATION OF THE ORAL FLUID FOR PATIENTS WITH ABSCESSES AND PHLEGMONS OF ODONTOGENIC AETIOLOGY IN MAXILLOFACIAL AREA A.A.KABANOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA

#### ELASTIC MODULUS DETERMINATION ON OSTEO-POROTIC RAT BONES BY THE THREE\_POINT BEN-DING TEST AND NANOINDENTATIONT 6 J.VONDROVA, J.LUKES, R.SEDLACEK, P.RUZICKA

#### EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF IONIZING RADIATION LOW DOSES IMPACT ON TEETH DEVELOPMENT N.N.CHESHKO, H.A.BERLOV, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA

FINITE ELEMENT ANALYSIS OF ONCOLOGY	
I Zach S Konvickova P Ruzicka	
RESULTS FOR COMPLEX POSTOPERATIVE	
PATIENTS'S REHABILITATION COMBINED	

## WITH ACUPUNCTURE BY CLINICAL AND LABORATORY INDICES T.L.Shevela, I.O.Pohodenko-Chudakova

#### BIOINSPIRED NANOCOMPOSITE STRUCTURES FOR BONE TISSUE REGENERATION BASED ON COLLAGEN, GELATIN, POLYAMIDE AND HYDROXYAPATITE 13 T.SUCHÝ, K.BALÍK, M.ŠUPOVÁ, D.HRUŠKOVÁ, .SUCHARDA,

I.Suchy, K.Balik, M.Supova, D.Hruskova, .Sucharda, M.Černy, R.Sedláček

#### DISORDER OF THE MINERAL METABOLISM OF THE ORAL CAVITY FOR PATIENTS WITH ODON-TOGENIC ABSCESES IN MAXILLOFACIAL AREA AND WAYS FOR ITS CORRECTION WITH STANDARD METHODS OF REHABILITATION Y.M.KAZAKOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA

STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS Abstracted in Applied Mechanics Reviews

# CONTENTS

POLYMER BASED SCAFFOLDS FOR TISSUE REGENERATION A.Gloria, V.Guarino, M.G.Raucci, R.de Santis, L.Ambrosio	1
TYROSINE-DERIVED NANOSPHERE FORMULATIONS FOR ENHANCED SKIN DELIVERY P.Batheja, L.Sheihet, S.Salomon, A.Singer, J.Kohn, 3.Michniak-Kohn	r <b>1</b>
CORRESPONDENCE BETWEEN TEETH BONE DE- STRUCTION AND COMPLICATIONS OF ACUTE DOONTOGENIC INFECTION AND ITS FOCAL DIFFUSION .O.POHODENKO-CHUDAKOVA, T.N.SYTCHIK	4
LIPID PEROXIDATION OF THE ORAL FLUID FOR PATIENTS WITH ABSCESSES AND PHLEGMONS OF ODONTOGENIC AETIOLOGY IN MAXILLOFACIAL AREA A.A.KABANOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA	5
ELASTIC MODULUS DETERMINATION ON OSTEO- POROTIC RAT BONES BY THE THREE-POINT BEN DING TEST AND NANOINDENTATION J.Vondrova, J.Lukes, R.Sedlacek, P.Ruzicka	6
EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF IONIZING RADIATION LOW DOSES IMPACT ON TEETH DEVELOPMENT N.N.Cheshko, H.A.Berlov, I.O.Pohodenko-Chudakova	8
FINITE ELEMENT ANALYSIS OF ONCOLOGY KNEE ENDOPROSTHESIS Zach, S.Konvickova, P.Ruzicka	9
RESULTS FOR COMPLEX POSTOPERATIVE PATIENTS'S REHABILITATION COMBINED WITH ACUPUNCTURE BY CLINICAL AND LABORATORY INDICES T.L.SHEVELA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA	12
BIOINSPIRED NANOCOMPOSITE STRUCTURES FOR BONE TISSUE REGENERATION BASED ON COLLAGEN, GELATIN, POLYAMIDE AND HYDROXYAPATITE T.Suchý, K.Balík, M.Šupová, D.Hrušková, .Sucharda, M.Černy, R.Sedláček	13
DISORDER OF THE MINERAL METABOLISM OF THE ORAL CAVITY FOR PATIENTS WITH ODON FOGENIC ABSCESES IN MAXILLOFACIAL AREA AND WAYS FOR ITS CORRECTION WITH STANDARD METHODS OF REHABILITATION	ı- 15
THE CALINOVA, T. O.T. ORODENKO-ORODAKOVA	_

Wydanie dofinansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego Edition financed by the Minister of Science and Higher Education

 • • • •	DEVELOMENT OF A PHYSIOGNOMIC HIP JOINT R PLACEMENT J.Sykora, S.Konvickova, M.Daniel	<sup>RE-</sup> 17	DEVELOMENT OF A PHYSIOGNOMIC HIP JOINT R PLACEMENT J.Sykora, S.Konvickova, M.Daniel	RE- 17
	MICRO- AND NANOPATTERNED SURFACES FOR GUIDED ADHESION, GROWTH AND PHENOTYPIC MATURATION OF CELLS L.Bacakova, E.Filova, L.Grausova, M.Vandrovcova, M.Parizek, K.Novotna, V.Svorcik, J.Vacik, F.Rypacek, A.Kromka, J.Heitz, A.Shard	18	MICRO- AND NANOPATTERNED SURFACES FOR GUIDED ADHESION, GROWTH AND PHENOTYPIC MATURATION OF CELLS L.BACAKOVA, E.FILOVA, L.GRAUSOVA, M.VANDROVCOVA, M.PARIZEK, K.NOVOTNA, V.SVORCIK, J.VACIK, F.RYPACEK, A.KROMKA, J.HEITZ, A.SHARD	18
	VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON BIOFUNCTIONALIZED CELLULOSE-BASED SCAFFOLDS K.Novotna, L.Bacakova, V.Lisa, P.Havelka, T.Sopuch, J.Klepetar	21	VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON BIOFUNCTIONALIZED CELLULOSE-BASED SCAFFOLDS K.Novotna, L.Bacakova, V.Lisa, P.Havelka, T.Sopuch, J.Klepetar	21
	VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON LOW DENSITY POLYETHYLENE MODIFIED WITH PLASMA DISCHARGE AND BIOFUNCTIONALIZATION M.Parizek, N.Kasalkova, L.Bacakova, K.Kolarova, V.Lisa, V.Svorcik	25	VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON LOW DENSITY POLYETHYLENE MODIFIED WITH PLASMA DISCHARGE AND BIOFUNCTIONALIZATION M.Parizek, N.Kasalkova, L.Bacakova, K.Kolarova, V.Lisa, V.Svorcik	25
	COMPOSITE COLLAGEN-CALCIUM PHOSPHATE HYDROGELS FOR BONE SUBSTITUTION T.E.L. DOUGLAS, C.GKIONI, J.A.JANSEN, S.C.G. LEEUWENBURGH	28	COMPOSITE COLLAGEN-CALCIUM PHOSPHATE HYDROGELS FOR BONE SUBSTITUTION T.E.L. DOUGLAS, C.GKIONI, J.A.JANSEN, S.C.G. LEEUWENBURGH	28
	BLOOD PLATELETS APOPTOSIS IN HEMODIALYZED PATIENTS A.Sobol, M.Kaminska, M.Walczynska, M.Stasiak, J.Szymanski, M.Walkowiak, B.Walkowiak	29	BLOOD PLATELETS APOPTOSIS IN HEMODIALYZED PATIENTS A.Sobol, M.Kaminska, M.Walczynska, M.Stasiak, J.Szymanski, M.Walkowiak, B.Walkowiak	29
	ENDOTHELIAL CELL PROTEOME CHANGED BY CONTACT WITH SURFACES OF BIOMATERIALS P.Komorowski, H.Jerczynska, Z.Pawlowska, M.Walkowiak, B.Walkowiak	30	ENDOTHELIAL CELL PROTEOME CHANGED BY CONTACT WITH SURFACES OF BIOMATERIALS P.Komorowski, H.Jerczynska, Z.Pawlowska, M.Walkowiak, B.Walkowiak	30
	NANOSTRUCTURE OF BOVINE PERICARDIUM TREATED WITH TRYPSIN A.Turek, A.Marcinkowski, B.Trzebicka, B.Cwalina, Z.Dzierżewicz	30	NANOSTRUCTURE OF BOVINE PERICARDIUM TREATED WITH TRYPSIN A.Turek, A.Marcinkowski, B.Trzebicka, B.Cwalina, Z.Dzierzewicz	30
	MORPHOLOGICAL STUDIES OF TISSUES STABILIZED BY GLUTARALDEHYDE AND TANNIC ACID A.Turek, A.Marcinkowski, B.Cwalina, J.Nożyński, Z.Dzierżewicz	32	MORPHOLOGICAL STUDIES OF TISSUES STABILIZED BY GLUTARALDEHYDE AND TANNIC ACID A.Turek, A.Marcinkowski, B.Cwalina, J.Nozyński, Z.Dzierzewicz	32
လ	HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE SOFT TISSUE REACTION AFTER IMPLANTATION OF HERNIA POLYPROPYLENE MESHES B.Żywicka, S.Pielka, D.Paluch, L.Solski, M.Szymonowicz A.M.H. Struszczyk	34	HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE SOFT TISSUE REACTION AFTER IMPLANTATION OF HERNIA POLYPROPYLENE MESHES B.ZYWICKA, S.PIELKA, D.PALUCH, L.SOLSKI, M.SZYMONOWICZ A.M.H. STRUSZCZYK	34
RIAL	EFFECT OF TITANIUM ON THE SINTERING AND MICROSTRUCTURE OF TI-DOPED HYDROXYAPATITE A.Ślósarczyk, A.Zima, Z.Paszkiewicz, J.Szczepaniak	37	EFFECT OF TITANIUM ON THE SINTERING AND MICROSTRUCTURE OF TI-DOPED HYDROXYAPATITE A.Ślósarczyk, A.Zima, Z.Paszkiewicz, J.Szczepaniak	37
MATE	REAKCJE ZACHODZĄCE NA IMPLANCIE WSKUTEK KONTAKTU Z TKANKĄ LUDZKĄ B.Świeczko-Żurek, A.Pałubicka, M.Krzemiński	38	THE REACTIONS OCCURING ON THE IMPLANT A A RESULT OF CONTACT WITH HUMAN TISSUE B.Swieczko-Zurek, A.Palubicka, M.Krzeminski	s 38

• • •

STRUKTURA I ODPORNOŚĆ KOROZYJNA TI ENO-AZOTOWANEGO W NISKIEJ TEMPERA-		STRUCTURE AND CORROSION RESISTANCE OF
TURZE STOPU NITI WYKAZUJĄCEGO PAMIĘĆ KSZTAŁTU J.LELĄTKO, T.GORYCZKA, T.WIERZCHOŃ, M.OSSOWSKI, B.ŁOSIEWICZ, E.RÓWIŃSKI	40	LOW TEMPERATURE NITRIDED/OXIDIZED NITI SHAPE MEMORY ALLOY J.LELATKO, T.GORYCZKA, T.WIERZCHON, M.OSSOWSKI, B.LOSIEWICZ, E.RÓWINSKI
SUPERSPRĘŻYSTE KLAMRY NITI DO ZESPALANIA ZŁAMAŃ KOŚCI TWARZY Z.Lekston, M.Jędrusik-Pawłowska, T.Cieślik, J.Drugac	<b>42</b>	SUPERELASTIC NITI STAPLES FOR FIXATION OF FACE BONE FRACTURES Z.Lekston, M.Jedrusik-Pawlowska, T.Cieslik, J.Drugac
REKONSTRUKCJA TKANKI CHRZĘSTNEJ BIOMATERIAŁAMI POLIMEROWYMI – WYNIKI MA KROSKOPOWE I HISTOLOGICZNE PO 26 I 52 – TYGODNIOWYM OKRESIE OBSERWACJI W.Ścierski, A.Polok, G.Namysłowski, J.Nożyński, L.Turecka, N.Urbaniec, E.Pamuła	47	CARTILAGE TISSUE RECONSTRUCTION BY POLYMER BIOMATERIALS – MACROSCOPIC AND HISTOLOGICAL RESULTS AFTER 26 AND 52 WEEKS OF OBSERVATION W.Scierski, A.Polok, G.Namysłowski, J.Nozynski, L.Turecka, N.Urbaniec, E.Pamula
WARSTWY AZOTOWANE JARZENIOWO NA STOPIE TYTANU TI6AI4V DLA ZASTOSOWAŃ W KARDIOLOGII T.Borowski, A.Sowiński, M.Ossowski, E.Czarnowska, T.Wierzchoń	49	GLOW DISCHARGE NITRIDED LAYERS ON TI6AI4V ALLOY INTENDED FOR CARDIOVASCULAR APPLICATIONS T.Borowski, A.Sowiński, M.Ossowski, E.Czarnowska, T.Wierzchon
WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI TIN METODĄ LITOGRAFII NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ KOMÓREK A.Zajączkowska, M.Brudek, J.Bierła, T.Borowski, R.Lappalainen, T.Wierzchoń, E.Czarnowska	52	THE EFFECTS OF TIN MODIFICATION BY LITHO- GRAPHY ON CELLS BEHAVIOR A.Zajaczkowska, M.Brudek, J.Bierla, T.Borowski, R.Lappalainen, T.Wierzchon, E.Czarnowska
BADANIA POWIERZCHNI PANEWKI STAWU BIODROWEGO PO DZIESIĘCIU LATACH KONTAKTU Z OGRANIZMEM M.Cieślik, K.Mlekodaj, A.M.Janus, T.Łojewski, K.Engvall, A.Kotarba	54	INVESTIGATIONS OF A HIP JOINT SURFACE AFTER 10 YEARS OF USE IN VIVO M.Cieslik, K.Mlekodaj, A.M.Janus, T.Lojewski, K.Engvall, A.Kotarba
OCENA GOJENIA UBYTKÓW KOSTNYCH ŻUCHWY KRÓLIKÓW WYPEŁNIONYCH TWO- RZYWEM KALCYTOWYM – BADANIA WSTĘPNE M.Cieślik, M. Adwent, D.Sabat, Z.Jaegermann, P.Tarabuła, R.Orlicki, T.Cieślik	57	THE EVALUATION OF THE HEALING PROCESS O RABBIT MANDIBLE BONE DEFECTS FILLED WIT CALCITE MATERIAL - INTRODUCTORY EXAMINA TIONS M.CIESLIK, M. ADWENT, D.SABAT, Z.JAEGERMANN, P.TARABUŁA, R.ORLICKI, T.CIESLIK
WPŁYW TEMPERATURY WYGRZEWANIA WARSTW TIO <sub>2</sub> OTRZYMANYCH METODĄ ZOL-ŻEL NA WŁAŚCIWOŚCI KOROZYJNE BIOMEDYCZNEGO STOPU PANACEA P558 B.Burnat T.BŁASZCZYK H.SCHOLL	61	THE INFLUENCE OF HEATING TEMPERATURE OF TIO <sub>2</sub> SOL-GEL LAYERS ON CORROSION PROPERTIES OF PANACEA P558 BIOMEDICAL ALLOY B.BURNAT T.BŁASZCZYK H.SCHOLL
NOWE HYBRYDOWE POWŁOKI DLC-POLIMER JAKO POTENCJALNE POWŁOKI PRZECIW- ZUŻYCIOWE NA IMPLANTY STAWU BIODROWEGO TYPU "RESURFACING" E.CHOIŃSKA, M.M.SPYCHALSKI, Ł.CIUPIŃSKI, W.ŚWIĘSZKOWSKI, VM.TIAINEN, K.J.KURZYDŁOWSKI	66	NEW DLC-POLYMER HYBRID COATINGS AS A POTENTIAL ANTI-WEAR COATINGS FOR RESURFACING HIP IMPLANTS E.Chonńska, M.M.Spychalski, Ł.Ciupinski, W.Swięszkowski, VM.Tiainen, K.J.Kurzydlowski
CHARAKTERYSTYKA WŁASNOŚCI WYTRZY- MAŁOŚCIOWYCH POWŁOK HYDROKSY- APATYTOWYCH A.Dudek	69	CHARACTERISTICS OF ADHESIVENESS IN PLASMA SPRAYED HYDROXYAPATITE COATINGS A.DUDEK
STABILNOŚĆ WARSTWY PLATYNOWEJ OSADZONEJ NA STOPIE NITICo WYKAZUJĄCYM EFEKT PAMIĘCI KSZTAŁTU T.Goryczka, J.Lelątko, E.Rówiński	72	STABILITY OF PLATINUM LAYER DEPOSITED ON NITICO SHAPE MEMORY ALLOY T.Goryczka, J.Lelatko, E.Rówinski

A, T.CIESLIK, J.DRUGACZ TRUCTION - MACROSCOPIC S AFTER 26 47 vski, J.Nozynski, LAYERS 49 LICATIONS VSKI, E.CZARNOWSKA, CATION BY LITHO-52 rla, T.Borowski, ARNOWSKA INT SURFACE 54 , T.LOJEWSKI, ALING PROCESS OF FECTS FILLED WITH UCTORY EXAMINA-57 JAEGERMANN, TEMPERATURE CORROSION 558 BIOMEDICAL 61 **COATINGS AS** ATINGS FOR 66

69

72

40

V • • • • • •	OCENA STANU POWIERZCHNI STALI STOSO- WANEJ NA NARZĘDZIA CHIRURGICZNE ZA POMOCĄ MIKROSKOPU SIŁ ATOMO- WYCH (AFM) M.Gwoździk	74	EVALUATION OF THE SURFACE CONDITION OF STEEL USED FOR SURGICAL INSTRUMENTS BY MEANS OF ATOMIC FORCES MICROSCOPE (AFM) M.Gwozdzik	5 74
	OPTYMALIZACJA GEOMETRII NANORUREK TIO PRZY UŻYCIU ROZMYTEGO SYSTEMU WNIOSKOWANIA S.Sobieszczyk	77	OPTIMALIZATION OF TIO <sub>2</sub> NANOTUBE GEOMETRY USING FUZZY REASONING APPROACH S.Sobieszczyk	77
	NOWA METODA STABILIZACJI ZŁAMAŃ ŚRODKOWEGO PIĘTRA TWARZY PRZY UŻYCIU KLAMER ZE STOPÓW NITI O WŁAŚCIWOŚCIACH SUPERSPRĘŻYSTYCH – BADANIA WSTĘPNE M.Jędrusik-Pawłowska, Z.Lekston, J.Drugacz, M.Kromka-Szydek, T.Cieślik	79	NEW METHOD OF STABILISATION OF THE MID-FACE REGION FRACTURES USING NITI STAPLES WITH SUPERELASTIC PROPERTIES – PRELIMINARY RESULTS M.Jedrusik-Pawlowska, Z.Lekston, J.Drugacz, M.Kromka-Szydek, T.Cieslik	79
	NOWE SEMIKRYSTALICZNE BIORESORBOWALN MATERIAŁY Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU A.Smola, P.Dobrzyński, M.Pastusiak, M.Sobota, J.Kasperczyk	ie 82	NEW SEMI-CRYSTALLINE BIORESORBABLE MA RIALS WITH SHAPE-MEMORY PROPERTIES A.Smola, P.Dobrzyński, M.Pastusiak, M.Sobota, J.Kasperczyk	TE- 82
	WPŁYW PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA SEGMENTOWE POLIURETANY DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH M.Walo, G.Przybytniak	87	RADIATION-INDUCED EFFECTS IN SEGMENTED OLYURETHANE FOR BIOMEDICAL PURPOSES M.Walo, G.Przybytniak	87
	BADANIA IN VITRO CYTOTOKSYCZNOŚCI BIOSZ KIEŁ ZAWIERAJĄCYCH SREBRO L.Ciołek, J.Karaś, A.Olszyna, E.Zaczyńska , A.Czarny, B.Żywicka	<u>-</u> 91	IN VITRO STUDIES OF CYTOTOXICITY OF BIOGLASS CONTAINING SILVER L.Ciolek, J.Karas, A.Olszyna, E.Zaczynska , A.Czarny, B.Zywicka	91
	ANALIZA WYTRZYMAŁOŚCIOWA WIERTEŁ CHIRURGICZNYCH Z WYKORZYSTANIEM METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH M.BASIAGA, Z.PASZENDA	93	STRENGTH ANALYSIS OF SURGICAL DRILLS BY MEANS OF FINITE ELEMENT METHOD M.Basiaga, Z.Paszenda	93
	POZAUSTROJOWE BADANIA NAD TOKSYCZ- NYM ODDZIAŁYWANIEM KOPOLIMERU PLGA Z DODATKIEM HYDROKSYAPATYTU NA LUDZKIE OSTEOBLASTY LINII hFOB 1.19 M.Cieślik, A.Mertas, A.Morawska-chochół, R.Orlicki, A.Owczarek, W.Król	98	IN VITRO EXAMINATIONS OF TOXIC INFLUENCE OF PLGA CO-POLYMER MIXED WITH HYDROXY APATITE UPON HUMAN OSTEOBLASTS LINE hFOB 1.19 M.CIELIK, A.MERTAS, A.MORAWSKA-CHOCHOL, R.ORLICKI, A.OWCZAREK, W.KROL	- 98
	ODPORNOŚĆ KOROZYJNA DRUTÓW ZE STALI NIERDZEWNEJ PRZEZNACZONYCH DLA ORTOPEDII A.Szuła, J.Przondziono, W.Walke	103	CORROSION RESISTANCE OF WIRE MADE OF STAINLESS STEEL FOR ORTHOPAEIDCS A.Szula, J.Przondziono, W.Walke	103
	NANOSTRUKTURALNA WARSTWA TLENKOWA OTRZYMYWANA METODĄ ANODOWANIA NA TYTANIE I JEGO STOPIE Z NIOBEM E.Krasicka-Cydzik, I.Głazowska, A.Kaczmarek, T.Klekiel, K.Kowalski	105	NANOSTRUCTURAL OXIDE LAYER FORMED BY ANODIZING ON TITANIUM AND ITS IMPLANT ALLOY WITH NIOBIUM E.Krasicka-Cydzik, I.Glazowska, A.Kaczmarek, T.Klekiel, K.Kowalski	105
SIALS	PROGNOZOWANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZ- NYCH I KOROZYJNYCH DRUTÓW DLA ORTOPEDII J.Przondziono, W.Walke	110	FORECAST OF MECHANICAL AND CORROSIVE PROPERTIES OF WIRE FOR ORTHOPAEDICS J.Przondziono, W.Walke	110
MATEF	BADANIA MIKROSTRUKTURY POROWATYCH POKRYĆ MODELOWYCH IMPLANTÓW DOKOSTNYCH R.Uklejewski, M.Winiecki, P.Rogala	113	EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS OF POROUS COATINGS MICTROCTRUCTURE OF MODEL ENDOOSSEOUS IMPLANTS R.Uklejewski, M.Winiecki, P.Rogala	113

79

93

•

( )Z ш**Ш** 

ANALIZA NUMERYCZNA I DOŚWIADCZALNA PROTOTYPOWEGO, ROZPRĘŻNEGO GWOŹDZIA ŚRÓDSZPIKOWEGO A.Kajzer, W.Kajzer, J.Marciniak	115
SIŁA WIĄZANIA UKŁADU METAL-CERAMIKA W ZASTOSOWANIACH STOMATOLOGICZNCYH M.Lubas, J.Jasiński, L.Jeziorski	119
MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI BIOMATERIA- ŁÓW CHITOZANOWYCH PRZEZ DODATKI HYDROLIZATÓW KERATYNY J.Skopińska-Wiśniewska, A.Sionkowska, J.Kozłowska, A.Płanecka	123
MIKROSTRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI STOPU TI-6AI-7Nb PO DYFUZYJNEJ OBRÓBCE UTWARDZAJĄCEJ TLENEM T.Moskalewicz, B.Wendler, S.Zimowski, S.Milc, A.Czyrska-Filemonowicz	126
BADANIA ADHEZJI WYBRANYCH STOMATO- LOGICZNYCH WYPEŁNIEŃ KOMPOZYTOWYCH J.BIENIAŚ, A.NIEWCZAS, K.PAŁKA	129
BADANIA ODDZIAŁYWANIA KOMPOZYTU WĘGLOWO-KRZEMOWEGO NA ELEMENTY MORFOTYCZNE KRWI M.Szymonowicz, S.Pielka, D.Paluch , B.Żywicka , E.Karuga, D.Obłąkowska, S.Błażewicz	131
WPŁYW MATERIAŁÓW WĘGLOWYCH NA KRZEPNIĘCIE KRWI M.Szymonowicz, S.Pielka, D.Paluch , B.Żywicka , E.Karuga, D.Obłąkowska, S.Błażewicz	136
WPŁYW DODATKU GRAFITU NA STRUKTURĘ I WŁAŚCIWOŚCI SPIEKANYCH BIOMATERIAŁÓW KOMPOZYTOWYCH NA BAZIE TYTANU P.DEPTUŁA, J.R.DĄBROWSKI	140
TROMBOGENNOŚĆ WARSTW TIN+TI <sub>2</sub> N+αTI(N) WYTWORZONYCH W OBSZARZ PLAZMY NA STOPIE TYTANU TI <sub>6</sub> AI <sub>4</sub> V M.Gonsior, R.Kustosz, M.Sanak, B.Jakiełła, T.Borowski, M.Ossowski, T.Wierzchoń	<u>ت</u> 143
OPRACOWANIE TECHNOLOGII WYTWARZANIA MODYFIKOWANYCH HYDROKSYAPATYTEM WŁÓKNIN WĘGLOWYCH PRZEZNACZONYCH NA PODŁOŻA DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ I.Rajzer, J.Grzybowska-Pietras, S.Morcinek, J.Janicki	145
ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII UV-VIS W ANALIZIE OPTYCZNEJ KREMÓW FOTO- PROTEKCYJNYCH J.Adamczyk, A.Deda, S.Wilczyński, M.Zdybel	148
KOMPOZYTOWE WŁÓKNA POLILAKTYD- HYDROKSYAPATYT OTRZYMYWANE METODĄ PRZĘDZENIA ZE STOPU I.Rajzer, M.Rom, J.Fabia, S.Morcinek, A.Zima, A.Ślósarczyk, J.Janicki	150

NUMERICAL AND EXPERIMENTAL ANALYSIS OF THE NEW, EXPANSION INTRAMEDULLARY NAILS A.Kajzer, W.Kajzer, J.Marciniak	115
SHEAR BOND STRENGTH OF CERAMIC-METAL SYSTEM FOR THE DENTAL APPLICATIONS M.Lubas, J.Jasinski, L.Jeziorski	119
THE MODIFICATION OF BIOMATERIALS PROPERTIES BY ADDITION OF KERATIN HYDROLYZATES J.Skopinska-Wiśniewska, A.Sionkowska, J.Kozlowska, A.Planecka	123
MICROSTRUCTURE AND PROPERTIES OF OXYGEN DIFFUSION STRENGTHENED TI-6AI-7Nb ALLOY T.Moskalewicz, B.Wendler, S.Zimowski, S.Milc, A.Czyrska-Filemonowicz	126
ADHESION STUDIES OF SOME RESTORATIVE COMPOSITES J.BIENIAS, A.NIEWCZAS, K.PALKA	129
STUDIES OF COMPOSITE CARBON/SILICON REACTION ON CELLULAR MORPHOTIC ELEMENTS OF BLOOD M.Szymonowicz, S.Pielka, D.Paluch , B.Zywicka , E.Karuga, D.Obłakowska, S.Blazewicz	131
INFLUENCE OF CARBON MATERIALS ON BLOOD COAGULATION M.Szymonowicz, S.Pielka, D.Paluch , B.Zywicka , E.Karuga, D.Obłakowska, S.Blazewicz	136
THE INFLUENCE OF SINTERING TEMPERATURE ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF TITANIUM-GRAPHITE COMPOSITES P.DEPTUŁA, J.R.DĄBROWSKI	140
THROMBOGENICITY OF TIN+TI <sub>2</sub> N+αTI(N) LAYER PRODUCED IN PLASMA SPACE ON TI <sub>6</sub> AI <sub>4</sub> V ALLOY M.Gonsior, R.Kustosz, M.Sanak, B.Jakiella, T.Borowski, M.Ossowski, T.Wierzchon	143
DEVELOPMENT OF FABRICATION TECHNO- LOGY OF CARBON NONWOVEN FABRICS MODIFIED WITH HYDROXYAPATITE, AS SCAFFOLD FOR TISSUE ENGINEERING I.Rajzer, J.Grzybowska-Pietras, S.Morcinek,	145
APPLICATION OF UV-VIS SPECTROSCOPE IN OPTICAL ANALYSIS OF PHOTOPROTECTION CREAMS J.Adamczyk, A.Deda, S.Wilczynski, M.Zdybel	148
POLY(LACTIC ACID) / HYDROXYAPATITE MELT SPUN COMPOSITE FIBERS I.Rajzer, M.Rom, J.Fabia, S.Morcinek, A.Zima, A.Slosarczyk, J.Janicki	150

BI MATERIALS

V

. . .

VI • • • • • • •	ZACHOWANIE ELEKTROCHEMICZNE STOPU TI-6AI-4V I TI-6AI-7Nb PO RÓŻNYM OKRESIE EKSPOZYCJI W SBF M.Pochrząst, W.Walke, J.Marciniak, D.Kaczmarska	152
	BADANIA FT-IR I EPR ZMIAN STRUKTURY CHEMICZNEJ AMPICYLINY PODCZAS STERYLIZACJI TERMICZNEJ A.Krztoń, B.Liszka, P.Ramos, B.Pilawa	154
	POWSTAWANIE WOLNYCH RODNIKÓW PODCZAS ROZKŁADU TERMICZNEGO MONOAZOTANU IZOSORBITOLU P.Ramos, B.Pilawa, M.Kawka	157
	BADANIA RHIZOMA CALAMI METODĄ EPR K.Pawłowska-Góral, E.Kurzeja, B.Pilawa, P.Ramos	160
	WOLNE RODNIKI W STERYLIZOWANYM TERMICZNIE VERAPAMILU P.Ramos, P.Pepliński, B.Pilawa	163
	WŁAŚCIWOŚCI PARAMAGNETYCZNE BIOMATERIAŁÓW B.Pilawa, J.Adamczyk, M.Zdybel, S.Wilczyński, P.Ramos, D.Czyżyk, M.Kościelniak	166
	WPŁYW FLUCYTOZYNY NA WŁAŚCIWOŚCI PARAMAGNETYCZNE CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES B.Pilawa, M.Zdybel, E.Buszman, T.Witoszyńska, H.Cieśla	168
	PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI WOLNYCH RODN KÓW W STREPTOMYCYNIE STERYLIZOWA- NEJ RADIACYJNIE I TERMICZNIE S.WILCZYŃSKI, P.RAMOS, B.PILAWA, M.PTASZKIEWICZ, J.ŚWAKOŃ, P.OLKO	ı₋ 171
	PARAMAGNETYZM UPIGMENTOWANYCH GRZYBÓW GLEBOWYCH CLADOSPORIUM HERBARUM M.Zdybel, B.Pilawa, E.Buszman, T.Witoszyńska, B.Brotoń	173
	ANALIZA WYTRZYMAŁOŚCIOWA I ODKSZTAŁ- CENIOWA BIOMATERIAŁÓW GRADIENTO- WYCH PRZEZNACZONYCH NA IMPLANTY K.MIGACZ, J.CHŁOPEK	176
	OCENA WYBRANYCH CECH WŁÓKNINOWYCH OBŁOŻEŃ CHIRURGICZNYCH J.Grzybowska-Pietras, J.Malkiewicz, I.Gruszka	180
RIALS RIALS	WPŁYW BUDOWY DWUWARSTWOWYCH BIODEGRADOWALNYCH SYSTEMÓW POLIMEROWYCH NA PROCES UWALNIANIA CYKLOSPORYNY A K.JELONEK, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, B.JARZĄBEK, B.KLENCZAR, M.SOBOTA	183
G I N E E R I	ANALIZA PORÓWNAWCZA SKŁADU PIERWIASTKOWEGO ŚCIAN AORTY BRZUSZNE I TĘTNIAKA AORTY BRZUSZNEJ M.Kobielarz, K.Marycz, S.Szotek, R.Będziński	י 186
		• • • •

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF TI-6AI-4V AND TI-6AI-7Nb ALLOY AFTER DIFFERENT TIME OF EXPOSURE TO SBF M.Pochrzast, W.Walke, J.Marciniak, D.Kaczmarska	152
FT-IR AND EPR STUDIES OF CHANGES OF CHEMICAL STRUCTURE OF AMPICYLINE DURING THERMAL STERILIZATION A.Krzton, B.Liszka, P.Ramos, B.Pilawa	154
FORMATION OF FREE RADICALS DURING THERMAL DECOMPOSITION OF ISOSORBIDE MONONITRATE P.Ramos, B.Pilawa, M.Kawka	157
EPR STUDIES OF RHIZOMA CALAMI K.Pawlowska-Goral, E.Kurzeja, B.Pilawa, P.Ramos	160
FREE RADICALS IN THERMALLY STERILIZED VERAPAMIL P.Ramos, P.Peplinski, B.Pilawa	163
PARAMAGNETIC PROPERTIES OF BIOMATERIALS B.Pilawa, J.Adamczyk, M.Zdybel, S.Wilczynski, P.Ramos, D.Czyzyk, M.Koscielniak	166
EFFECT OF FLUCYTOSINE ON PARAMAGNETIC PROPERTIES OF CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES B.Pilawa, M.Zdybel, E.Buszman, T.Witoszynska, H.Ciesla	168
COMPARISON OF FREE RADICALS PROPERTIES IN RADIOSTERILISED AND THERMAL STERILIZED STREPTOMYCIN S.WILCZYŃSKI, P.RAMOS, B.PILAWA, M.PTASZKIEWICZ, J.SWAKOŃ, P.OLKO	171
PARAMAGNETISM OF PIGMENTED SOIL FUNGI CLADOSPORIUM HERBARUM M.Zdybel, B.Pilawa, E.Buszman, T.Witoszynska, B.Broton	173
STRENGTH AND STRAIN ANALYSIS OF GRADIENT BIOMATERIALS ASSIGNED FOR MEDICAL IMPLANTS K.MIGACZ, J.CHŁOPEK	176
ESTIMATION OF SELECTED PROPERTIES OF NONWOVENS SURGICAL DRAPES J.Grzybowska-Pietras, J.Malkiewicz, I.Gruszka	180
THE INFLUENCE OF COMPOSITION BILAYERED BIODEGRADABLE SYSTEM ON CYCLOSPORINE A RELEASE K.JELONEK, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, B.JARZĄBEK, B.KLENCZAR, M.SOBOTA	183
COMPARISON ANALYSIS OF CHEMICAL ELEMENTS COMPOSITION OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS AND NORMAL ABDOMINAL AORTIC WALLS M.Kobielarz, K.Marycz, S.Szotek, R.Będzinski	186

WPŁYW OBECNOŚCI NANODODATKÓW NA STRUKTRURĘ I WŁAŚCIWOŚCI WŁÓKIEN Z ALGINIANU WAPNIA M.Boguń, T.Mikołajczyk, S.Rabiej, E.Stodolak	189
WPŁYW IŁOŚCI HYDROKSYAPATYTU NA WŁAŚCIWOŚCI NANOKOMPOZYTOWYCH WŁÓKIEN PAN G.Szparaga, T.Mikołajczyk	193
WSTĘPNA OCENA BIOLOGICZNA KOMPO- ZYTÓW POLIOKSYMETYLEN/NANOSREBRO M.Ziąbka, A. Mertas, W.Król, J.Chłopek	197
SKAFOLDY HYDROKSYAPATYTOWE I KOMPOZYTOWE WYTWARZANE METODĄ ROBOCASTING K.Gryń, J. Chłopek	201
WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE POROWATEGO TYTANU MODYFIKOWANEGO POWIERZCHNIOWO – BADANIA IN VIVO B.Szaraniec, K.Jodkowska, J.Chłopek	204
WŁAŚCIWOŚCI SKÓRY LUDZKIEJ UZYSKANE W TESTACH MECHANICZNYCH I TECHNIKĄ SPEKTROSKOPII RAMANA S.Szotek, R.Będziński, M.Kobielarz, M.Gąsior-Głogowska, M.Komorowska, K.Maksymowicz, J.Hanuza, K.Hermanowicz	208
WSTĘPNE BADANIA KOMPOZYTOWEGO STABILIZATORA ZEWNĘTRZNEGO O ZMIENNEJ PODATNOŚCI J.FILIPIAK, R.BĘDZIŃSKI, J.CHŁOPEK	211
DEGRADACJA MIESZANIN POLIMEROWYCH POLIURETANU Z POLILAKTYDEM W SYMULO- WANYM ŚRODOWISKU BIOLOGICZNYM J.GAJOWY, P.BEDNARZ, J.LASKA	214
WPŁYW METODY PRZETWÓRSTWA NA WŁAŚCIWOŚCI POLILAKTYDU J. Chłopek, A. Morawska-Chochół, A. Wietecha	218
MIKRONARZĘDZIA OKULISTYCZNE - KOMPOZYTOWE RETRAKTORY TĘCZÓWKI E.Stodolak, S.Błażewicz, J.Kawala, W.Gregorczyk, R.Leszczyński	221
NANOKOMPOZYTY PVA/(HAP OR SIO <sub>2</sub> )/PCL JAKO MEMBRANY DO STEROWANEJ REGENERACJI KOŚCI (GBR) E.Stodolak, M.Boguń, A.Kolawa-Kozioł, M.Błażewicz, T.Mikołajczyk	227
PROBLEMATYKA LOKALNEGO LECZENIA FARMACEUTYCZNEGO I IMPLANTOWEGO W PRZECIWIEŃSTWIE DO GLOBALNYCH METOD MEDYCZNYCH M.Wójcik	231
ANALIZA ZMĘCZENIOWA TRANSPEDI- KULARNEGO STABILIZATORA KRĘGOSŁUPA M.Kiel, J.Marciniak, M.Basiaga , J.Szewczenko	238

EFFECT OF THE PRESENCE OF NANO- ADDITIVES ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF CALCIUM ALGINATE FIBRES M.Boguń, T.Mikołajczyk, S.Rabiej, E.Stodolak	189
EFFECT OF QUANTITY OF HYDROXYAPATITE ON THE PROPERTIES OF PAN NANO- COMPOSITE FIBRES G.Szparaga, T.Mikolajczyk	193
PRELIMINARY BIOLOGICAL EVALUATION OF POLYOXYMETHYLENE/NANOSILVER COMPOSITES M.Ziabka, A. Mertas, W.Krol, J.Chlopek	197
DEVELOPMENT OF HYDROXYAPATITE AND HYDROXYAPATITE/POLYMER COMPOSITE SCAFFOLDS BY ROBOCASTING K.GRYŃ, J. CHŁOPEK	201
BIOLOGICAL PROPERTIES OF POROUS TITANIUM WITH MODIFIED SURFACE - IN VIVO STUDIES B.Szaraniec, K.Jodkowska, J.Chłopek	204
HUMAN SKIN PROPERTIES DETERMINED BY MECHANICAL TESTS AND RAMAN SPECTROSCOPY S.Szotek, R.Bedzinski, M.Kobielarz, M.Gasior-Glogowska, M.Komorowska, K.Maksymowicz, J.Hanuza, K.Hermanowicz	208
PRELIMINARY TESTS OF COMPOSITE EXTERNAL FIXATOR WITH CHANGEABLE STIFFNESS J.FILIPIAK, R.BĘDZIŃSKI, J.CHŁOPEK	211
DEGRADATION OF POLYMER MIXTURE OF POLYURETHANE AND POLYLACTIDE IN SIMULATED BIOLOGICAL ENVIRONMENT J.GAJOWY, P.BEDNARZ, J.LASKA	214
THE INFLUENCE OF PROCESSING ON POLYLACTIDE PROPERTIES J. Chłopek, A. Morawska-Chochół, A. Wietecha	218
OPHTHALMOLOGIC MICRO-TOOLS – COMPOSITE IRIS RETRACTORS E.Stodolak, S.Błażewicz, J.Kawala, W.Gregorczyk, R.Leszczyński	221
NANOCOMPOSITES PVA/(HAP OR SIO <sub>2</sub> )/PCL AS MEMBRANES FOR THE GUIDED BONE REGENERATION (GBR) E.Stodolak, M.Bogun, A.Kolawa-Koziol, M.Blazewicz, T.Mikolajczyk	227
PROBLEMS OF LOCAL PHARMACEUTICAL AND IMPLANT TREATMENT IN CONTRARY TO GLOBAL MEDICAL METHODS M.Wójcik	231
FATIGUE ANALYSIS OF TRANSPEDICULAR STABILIZER ON LUMBAR PART OF SPINE M.Kiel, J.Marciniak, M.Basiaga , J.Szewczenko	238

BI MATERIAG

VII

. . .

VIII • • • • • • •	ODPORNOŚĆ KOROZYJNA STOPU Co-Cr-W-Ni (L605) W WYBRANYCH PŁYNACH FIZJOLOGICZNYCH W.Kajzer, J.Marciniak	241	CORROSION RESISTANCE OF Co-Cr-W-Ni (L605) ALLOY IN SIMULATED BODY FLUIDS W.Kajzer, J.Marciniak	241
	ADHEZJA KOMÓREK STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS NA POWIERZCHNI STOPU TI6AI4V MODIFIKOWANYCH WARSTWAMI BIOCERAMICZNYMI BELCARZ A., BIENIAŚ J., SUROWSKA B., GINALSKA G.	244	ADHESION OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS CELLS ON TI6AI4V TITANIUM ALLOY SURFACES MODIFIED BY BIOCERAMIC LAYERS BELCARZ A., BIENIAŚ J., SUROWSKA B., GINALSKA G.	244
	BADANIA IN VITRO SZCZELINY BRZEŻNEJ W WARSTWIE WIERZCHNIEJ SYSTEMU BIOMECHANICZNEGO ZĄB – WYPEŁNIENIE KOMPOZYTOWE D.PIENIAK, A.NIEWCZAS, J.BIENIAŚ, K.PAŁKA	247	IN VITRO EXAMINATION OF THE MARGINAL GAP IN THE SURFACE AREA OF THE TOOTH- COMPOSITE FILLING BIOMECHANICAL SYSTEM D.PIENIAK, A.NIEWCZAS, J.BIENIAŚ, K.PAŁKA	247
	ANALIZA BIOMECHANICZNA ZESPOLENIA KOŚĆ ŚRÓDSTOPIA I – ŚRUBY DWUWCHODOWE A.Ziębowicz, A.Kajzer, W.Kajzer, J.Marciniak	250	BIOMECHANICAL ANALYSIS OF THE 1 <sup>st</sup> METATARSAL - COMPRESSION SCREWS SYSTEM A.ZIĘBOWICZ, A.KAJZER, W.KAJZER, J.MARCINIAK	250
	ROZWÓJ POLIMERÓW W OPARCIU O NATURALNE SUROWCE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH M.EL FRAY	253	DEVELOPMENT OF BIO-BASED POLYMERS FOR MEDICAL APPLICATIONS M.EL FRAY	253
	BIOACTIVE CARBON-METAL COATINGS FOR MEDICAL APPLICATIONS B.Rajchel, J.Kwiatkowska, I.Kotela, W.Rajchel, M.Rajchel, J.Rońda	254	BIOACTIVE CARBON-METAL COATINGS FOR MEDICAL APPLICATIONS B.Rajchel, J.Kwiatkowska, I.Kotela, W.Rajchel, M.Rajchel, J.Rońda	254
	BIOFILM FORMATION UNDER ANAEROBIC CONDITIONS ON BIOMATERIAL'S SURFACE W.Jakubowski, T.Biela, M.Kamińska, M.Walkowiak-Przybyło, B.Walkowiak	254	FORMATION UNDER ANAEROBIC CONDITIONS ON BIOMATERIAL'S SURFACE W.Jakubowski, T.Biela, M.Kamińska, M.Walkowiak-Przybyło, B.Walkowiak	254
	POLY(BUTYLENE SUCCINATE) MODIFIED BY DIMERIZED FATTY ACID FOR MEDICAL APPLICATION A.Kozłowska, M.El Fray	255	POLY(BUTYLENE SUCCINATE) MODIFIED BY DIMERIZED FATTY ACID FOR MEDICAL APPLICATION A.Kozłowska, M.El Fray	255
	INFLUENCE OF SURFACE (NANO)ROUGHNESS ON CELL BEHAVIOUR A.Piegat, M.El Fray	257	INFLUENCE OF SURFACE (NANO)ROUGHNESS ON CELL BEHAVIOUR A.Piegat, M.El Fray	257
	COMBINATORIAL DISCOVERY APPROACHES ACCELERATE THE DEVELOPMENT OF BIORESORBABLE MEDICAL IMPLANTS J.KOHN	259	COMBINATORIAL DISCOVERY APPROACHES ACCELERATE THE DEVELOPMENT OF BIORESORBABLE MEDICAL IMPLANTS J.KOHN	259

## POLYMER BASED SCAFFOLDS FOR TISSUE REGENERATION

Antonio Gloria, Vincenzo Guarino, Maria Grazia Raucci, Roberto De Santis, Luigi Ambrosio\*

INSTITUTE OF COMPOSITE AND BIOMEDICAL MATERIALS, NATIONAL RESEARCH COUNCIL, P.LE TECCHIO 80, NAPLES 80125, ITALY. \*MAILTO: AMBROSIO@UNINA.IT

> To attain a successful ECM analogue scaffold, there are several design and material criteria that must be satisfied involving the mimicking of topographical features and geometry on the macro-, micro- and even at nanoscale levels, because each influences cell response to the scaffold.

> In the last years, a successful approach has been represented by the use of composite scaffolds obtained by a combination of phase inversion, salt leaching, filament winding technology. These techniques enable obtaining porous scaffold with controlled micro and macro porosity able to influence positively mechanical properties and cell interactions. In particular, composite materials based on biodegradable polymers (i.e. poly-*ɛ*-caprolactone) endowed with intrinsically bioactive particles (i.e. calcium phosphates) and/or macromolecules (i.e Hyaluronic Acid), offers the possibility to realize a strong bond with natural tissues through more bioactive, structurally and mechanically efficient interfaces, firstly enhancing the capability of the substrate to form new extracellular matrix (ECM) and assuring a more rapid and efficacious integration to the implant site. However, some limitations of traditional process impose to identify innovative strategies for fabricating micro and nanostructures structures.

> In this context, interesting approaches based on the assembly of basic components or building blocks endowed with molecular signals are powerfully emerging to form hierarchically complex structures, able to accurately recapitulate the functional properties of natural complex structures. For connective tissue regeneration (bone, ligaments, meniscus) composite scaffolds are obtained by phase inversion, salt leaching and RP technique to modulate mechanical properties and cell interactions.

> Design of bioactive scaffolds for bone regeneration with appropriate porosity and high pores interconnectivity could be obtained by using  $Poly(\epsilon$ -caprolactone) reinforced with Calcium Phosphates particles and PLA fibres.

> Ester of Hyaluronic Acid reinforced with degradable fibres were processed by composite technology, phase inversion and salt leaching technique to obtain scaffolds for meniscus regeneration. In vivo results demonstrated the possibility to regenerate the meniscus by using an appropriate scaffolds. Imaging and rapid prototyping technologies are implemented to design a "custom made" meniscus scaffold. A critical discussion on the advantages of new approaches has been performed by proposing strategies based on composite to the assembly of elementary components such as fibres implemented through modified electrospinning or sintering techniques.

Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 2

## TYROSINE-DERIVED NANOSPHERE FORMULATIONS FOR ENHANCED SKIN DELIVERY

Priya Batheja<sup>1,2</sup>, Larisa Sheihet<sup>1</sup>, Stefan Salomon<sup>1</sup>, Adam Singer<sup>3</sup>, Joachim Kohn<sup>1</sup>, Bozena Michniak-Kohn<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>New Jersey Center for Biomaterials, 145 Bevier Road, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, NJ, 08854, USA <sup>2</sup>Ernest Mario School of Pharmacy, 160 Frelinghuysen Road, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, NJ, 08854, USA <sup>3</sup>Department of Emergency Medicine, Stony Brook University and Medical Center HSC L4-080 Stony Brook, NY, USA 11794 \*MAILTO: michniak@biology.rutgers.edu)

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 1-3]

#### Purpose

To investigate the skin delivery profiles of polymeric tyrosine-derived nanospheres formulated as aqueous suspensions and hydrogels.

## Introduction and background

Tyrosine-derived nanospheres (NSPs) are formed by the selfassembly of ABA-type amphiphilic triblock copolymers derived exclusively from natural metabolites.

The A-blocks are poly(ethylene glycol), PEG, and the hydrophobic B-blocks are oligomers of desaminotyrosyl-tyrosine alkyl esters (DTR) and non-toxic diacids (FIG.1)[1,2]. . These NSPs are biocompatible and previous studies have established their lack of toxicity in KB cervical carcinoma cells and after injection in mice[.1] The versatility of the polymeric architecture of these NSPs (hydrodynamic diameter of about 70 nm) enables effective binding and delivery of a vast array of ipophilic agents[2]. In these studies we evaluated the potential of NSPs as delivery vehicles for highly lipophilic molecules for passive skin permeation. The efficiency of the nanosphere approach was compared to a non-particulate formulation represented by propylene glycol (PG). Nanospheres loaded with the fluorescent dye Nile Red (NR), which has been previously used for visualizing of micelle and liposome distribution within the skin were used in passive permeation studies. The depth and amount of skin penetration of NR after topical application was evaluated in in vitro and in vivo models. We also formulated the NSPs as hydrogels, and compared their in vitro and in vivo skin delivery profiles to the aqueous NSP formulations. Lastly, we evaluated the potential synergistic effect and formulation characteristics of combinations of NSP-hydrogels with the skin penetration enhancer Azone.

## Methods

The triblock copolymers were synthesized in a one-pot reaction at 20°C using in situ carbodiimide coupling of the PEG and oligo(DTR-XA). The self-assembly of the nanospheres was induced by drop-wise addition of a solution of the copolymer and the lipophilic dye Nile Red (NR) in DMF into phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) with mild agitaBI MATERIALS



FIG.1. Structure of PEG-boligo(DTO-SA)-b-PEG triblock copolymer (ABA triblock copolymer). Mw of PEG=5000 Da and Mw of the oligo(DTO-SA)=15000 Da.

tion. Dve-loaded NSPs were isolated by ultracentrifugation and filtration through 0.22µm filters and their morphology and size distribution was characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS), respectively. Formulations of NR-NSPs dispersed in PBS and in 1% w/v HydroxyPropyl Methyl Cellulose (HPMC) gel made in PG:water 80:20 v/v, with and without 0.2 M Azone were evaluated for NSP morphology (TEM) and release profiles (diffusion through dialysis membranes). The in vitro skin penetration of NR via the above formulations (n=6) was evaluated in human cadaver skin with the aid of static vertical Franz Diffusion cells. In vivo skin penetration studies (n=6) were conducted in a domestic pig with the aid of HillTop Chambers that served to enclose the formulations and confine them to different sites on the back of the pig. Controls included NSPs only and solution of NR in PG: water with and without 0.2 M Azone. The extent and amount of skin penetration of NR in human and porcine skin was evaluated by cryosectioning the treated skin areas and determining the NR penetration into the vertical skin sections by fluorescence microscopy and dye intensity quantification. Analysis of variance was used for statistical analysis and treatments were considered significant if p<0.05.

## **Results and Discussion**

The NSPs demonstrated a spherical morphology (FIG.2) with a relatively narrow size distribution centered around 55 nm (FIG.3). Dispersion of the NSPs in the HPMC gel produced a uniform and stable formulation with insignificant changes in the size and morphology of the NSPs (FIG.4). In addition, the HPMC gel served as a suitable formulation for the co-existence of NSPs and the chemical penetration enhancer Azone. The binding efficiency of NSP to NR was found to be ~ 65% w/w. In vitro release of NR from the NSPs occurred with an initial burst release (~ 5%) followed by a steady fickian diffusion of the NR (~45% release in 24h) (FIG.5). Dispersion of the NR-NSP in HPMC resulted in for-



FIG.2: TEM images of NSP in aqueous solution. Negative staining method (2% uranyl acetate).







FIG.4: TEM of NSP (3 mg/mL) dispersed in 1% w/v HPMC.



FIG.5: Release profile (dialysis equilibrium) of NR-NSP (PBS, 37°C).

BI MATERING OF



mulations with high viscosity, providing close contact of the NSPNR with skin during and after application. In vitro skin penetration (FIG.6 A-D) of NR via the NSP in the epidermis, upper and lower dermis was 5, 7 and 3.5-fold higher than the corresponding NR solution in PG:Water (80:20 v/v) (p<0.05). NR penetration into the upper and lower dermis via the NR-NSP-HPMC gel was 1.4- and 1.8-times higher (p<0.05) than the aqueous formulation of NRNSP. Azone further increased the dermal penetration of NR-NSP-HPMC by 2-fold. Similar results were obtained with the in vivo studies (FIG.6-E, images not shown here), with 2.3-fold (p<0.05) increase in NR permeation into the stratum corneum/epidermis layers when delivered via NSP compared to PG:water. The combined NR-NSP-HPMC gel formulation was found to deposit 1.4- (p<0.05) higher amount of NR in the stratum corneum /epidermis than the aqueous NR-NSP aqueous dispersion. The combination of Azone with the NR-NSP-HPMC formulation demonstrated the highest skin penetration of NR, with a 2.5 fold deposition as compared to NR-NSP-HPMC gel and a 4.5-fold (p<0.05) higher deposition than the formulation of NR in PG:water alone.

Tyrosine-derived nanospheres formulated as aqueous or gel systems significantly enhanced the in vitro and in vivo skin penetration of NR, compared to the corresponding nonparticulate formulation. The in vitro studies demonstrated the enhanced delivery potential of these nanocarriers to the epidermal-dermal junction and deeper skin layers, where psoriases and other diseases originate (FIGs.6, A-D). Formulation of the NSPs in HPMC gel significantly increased their efficacy due to higher skin penetration and a viscosity that provided close skin contact and superior hydration. While the combination of Azone with the NSP significantly enhanced the skin deposition of NR (FIG.6, D and E), the cytotoxicity of Azone limits its use in higher concentrations. Thus, the gel formulation of the NSP, alone or in combination with lower concentrations of an enhancer can be used for delivery of lipophilic agents to deeper skin layers.

## References

Sheihet L., Dubin R., Devore D., Kohn J. Biomacromolecules 2005;6:2726-31;
Sheihet L., Piotrowska K., Dubin R., Devore D., Kohn J. Biomacromolecules 2007;8(3):998-1003.

3

••••••

## CORRESPONDENCE BETWEEN TEETH BONE DESTRUCTION AND COMPLICATIONS OF ACUTE ODONTOGENIC INFECTION AND ITS FOCAL DIFFUSION

I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA\*, T.N.SYTCHIK

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, BELARUSIAN COLLABORATING CENTER FOR EACMFS, MINSK, BELARUS \*MAILTO: IP-C@YANDEX.RU

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 4-5]

Traditional Chinese medicine uses some systems of correspondence. According to the theory of organs, they have projections on different regions: ears, foots and palms, face, tongue and iris. Many examinations are made on the problem of energy connection system between acupoints (AT), acupoints and organs and human body systems, organs and human body systems within the limits of mentioned systems of correspondence and the organism what makes one of components determining its homeostasis [11]. Special medical literature and Annals of Chinese medicine say about one more system of correspondence - connection between teeth bone state and organs and human body systems [5]. This system is seldom used in the modern medicine as well as in the alternative medicine in spit of its informativity [8]. Quantity of pyoinflammatory diseases of odontogenic etiology in maxillofacial area is not reducing our days [9]. Relative quantity of patients with this disease makes 27,2% - 61% of total quantity of hospitalized patients [2] and 10-20% patients hospitalized in special clinic departments [10]. Moreover, a lot of patients have severe complications [3, 4, 7], but very often this disease provokes diffusion of acute odontogenic infection and involves pathologies of organs and human body systems [1, 12]. But connection between severe complications development of odontogenic infection and tooth bone destruction of correcponding tooth (first and second molars of lower jaw) is not examined. There is no information about dependence of tooth bone destruction and focal diffusion of acute odontogenic infection development for this kind of patients. So, all this determines actuality of examination and its expediency.

## Aim

is to determine dependence between tooth bone destruction of first and second molars of lower jaw and complications of acute odontogenic infection and development of its focal diffusion.

## **Objects and methods**

When studying the level of informativity system of correspondence of teeth bone state of the first and second molars of lower jaw (3.6, 3.7, 4.6, 4.7) to the alimentary canal state, including to its initial part – oral cavity, we analyzed 154 cards for the stomatological patient's health [6] and questionnaired the patients went for specialized medical care in stomotological clinics and polyclinics of Minsk. The questionnaire contained the questions regarding the systemic patient's diseases. Studying dependence of the bone destruction of first and second molars located on the lower jaw on the complications of acute odontogenic infection, we examined 80 X-rays (orthopantomograms and roentgenograms of the lower jaw, side view) for patients with following diseases: acute odontogenic osteomielitis complicated with abscesses of mylohyoideus area (21); acute odontogenic osteomielitis complicated with abscesses of pterygoido-mandibular area (20); acute odontogenic osteomielitis complicated with abscesses of submasseteryngeum area (22); acute odontogenic osteomielitis complicated with phlegmona of mouth floor (17). When examining connection of teeth bone tissue destruction with focal diffusion development of acute odontogenic infection according to the organs and body systems, we analyzed 12 archived case histories for patients with acute odontogenic mediastinitis as well as 12 roentgenograms (9 orthopantomograms and 3 roentgenograms, side view of the lower jaw). So, we concluded that patients groups have being selected correctly, they are equal and similar according to the mentioned signs. Achieved results were processed with method of variation statistics on the computer using the program «STATISTIKA».

## Results

When studying the level of informativity of the correspondence system of teeth bone state of the first and second molars of the lower jaw to the alimentary canal and its initial part – oral cavity, we revealed the following.

Patients of the group of examination had gastric diseases. 80% of patients had gastritis and 20% - gastric ulcer.50% of this patients group had 4 involved teeth and were divided in this way: 1) 50% of patients had 2 filled teeth, 1 missed tooth and 1 crown of tooth; 2) 16% - 2 missed teeth, 1 crown of tooth and 1 filled tooth; 3) 17% - 2 missed teeth and 2 crowns of tooth; 4) 17% - 4 filled teeth.40% of examined patients had 3 involved teeth in next combinations: 1) 26% - 3 filled teeth; 2) 24% - 1 filled tooth, 1 crown of tooth, 1 tooth involved with caries; 3) 23% - 1 filled tooth and 2 tooth involved with caries; 4) 27% - 2 filled teeth and 1 crown of tooth.10% of patients had 2 involved teeth: 1) 34% - 2 filled teeth; 2) 42% - 1 filled teeth and 1 missed teeth; 3) 24% - 2 filled tooth.

During examination on the dependence determination between bone teeth destruction development of first and second molars of lower jaw and complications of acute odontogenic infection, we found out that first and second molars were the cause of complications of acute odontogenic infection for 72 of patients (in 90% of examinations) what's close to the special literature data [12]. 1/3 of crowns «causal» teeth were destroyed for 9 patients (13%), " of crowns - destroyed for 35 patients (48%), 2/3 of crowns - 32 patients (23%), 7 patients (5%) had completely destroyed crowns. Results of examinations for teeth bone destruction dependence on the focal diffusion development of acute odontogenic infection classified by organs and human body systems, confirm that patients had complications in 100% of cases. Distribution of described above complications for patients with odontogenic mediostinitis are divided ac-

Complications for patients with odontogenic mediastenitis classified by organs and body systems	Number of patients
Cardiovascular system	6 (50%)
Respiratory system	3 (25%)
Digestive system	2 (16,7%)
Nervous system	1 (8,3%)

TABLE 1. Number of complications of odontogenic mediostitnitis according to the organs and human body systems.

cording to the human body systems and mentioned in the TABLE 1.

It's to be underlined that teeth bone destruction of the correspondent teeth and quantity of complications classified by organs and human body systems for patients with odontogenic mediastinitis made 83%.

## Conclusions

Results we achieved: 1) confirm the high level of informativity of the system of correspondence of teeth bone destruction to the organs systems; 2) confirm dependence between correspondence of teeth bone destruction to the organs systems; 2) confirm dependence between the bone teeth destruction of the first and second molars of the lower jaw and the complications of odontogenic infection; 3) confirm indirectly not only odontogenic nature of mediostinitis but pathogenetic part too which shows odontogenic infection capacity for focal diffusion.

## References

 Chudakov O.P., Leus L.I.. Oral chronic sepsis and focal infection: methodological recommendations. Mn.: MSMI.- 1996.– 40 p.
Kubaev R.E., Shavasi N.M. Clinico-genialogical family tree of children with pyoinflammatory diseases of mandible //Med. scient.

and stud.-method. journal.– 2001.– №3.– P. 152–158. [3]. Matros-Taranetz I.N., Slobodyannik O.L., Shubmesser I.A. Analysis of lethality for patients with acute odontogenic inflammatory diseases in maxillofacial area //Archive of clinic and experim. medicine.– 2003.– Vol.12, №1.– P. 24–27.

[4]. Pohodenko-Chudakova I.O., Yankovitch G.V., Rudaya E.V. Optimization for patients intubation with pyoinflammatory diseases in maxillofacial area //Medicine of critical states. Perspectives, problemes, decisions: art. rev. – Ekaterinburg, 2006. – P. 111–115.

[5]. Shorrenberger K. Manual for Chinese medicine for European doctors. M.: «Balbe».- 2003.- 560 p.

[6]. Stomatological level of health: recommendations /under red. P.A.Leus et al.- M., 1990.- 39 p.

[7]. Surgical infections: manual /under red. I.A.Eruhina, B.R.Gelfanda, L.A.Chlyapnikova.– STp: Piter, 2003.– 864 p.

[8]. Sytchik T.N., Pohodenko-Chudakova I.O. Integrity of elaboration of scientifically based system for diseases prognostication by teeth bone state //Collected materials of the city scient-pract. conf. with international participation «Parin's lectures». Vitebsk: VSMU, 2008.- P. 294–298.

[9]. Timofeev A.A. Textbook on the maxillofacial surgery and surgical stomatology. Kiev: Chervona Ruta-Ture, 2002. – 1024 p.

[10]. Uchakov R.V., Tzarev V.N. Complex approach for antimicrobal therapy for pyoinflammatory odontogenic diseases treatment in maxillofacial area //Ros. stomat. journ.– 2003.– №6.– P. 40–44. [11]. Voronov V.Y. Model of energetic connection system between acupoints. M., 1999.– 194 p.

[12]. Yudina N.A., Skorohod G.A. Inflammatory diseases of periodontium in ischemia developement //Collected materials for city scient.-pract. conf. with international participation «Parin's lectures». Vitebsk: VSMU, 2008.- P. 89–92.

## LIPID PEROXIDATION OF THE ORAL FLUID FOR PATIENTS WITH ABSCESSES AND PHLEGMONS OF ODONTOGENIC AETIOLOGY IN MAXILLOFACIAL AREA

A.A.KABANOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA\*

BELARUSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS, BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS \*MAILTO: IP-C@YANDEX.RU.

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 5-6]

#### Introduction

Maxillofacial surgery development allowed achieving very good results in prophylaxis, treatment and rehabilitation for patients with pyoinflammatory diseases in maxillofacial area. Most of achievements deal with complex approaches development for antimicrobial therapy of mentioned above diseases and there complications prophylaxis using immunomodificated agents, improving of the local treatment of wounds, applying physiotherapy procedures [1,2,3]. At the same time quantity of patients with pyoinflammatory diseases has no tendency for decrease in CIS countries as well as in the world. These patients compose 27% - 60% of the total amount of the hospital patients [5]. The great role of pyoinflammatory diseases clinical course and development of all localization including maxillofacial area is given for the microorganism state (total resistance, sufficient adaptative potential) what is characteristic for the local and total immune response, gualitative and guantitative structure and behavior of biological environment of the human body (serum of blood (SB), oral fluid (OF)) [4]. Our days, study of mechanisms of development and oxidative stress (OS) correction while development of acute infectious inflammatory diseases and critical pathological states is an important task of the modern science. There is necessity for interdisciplinary approach in order to find solutions for problems arisen in surgical infectious pathology [6]. Nevertheless, questions regarding the changes of oral cavity homeostasis, ways of its regulation for pyoinflammatory processes in maxillofacial area are not sufficiently studied.

## Aim of work

is to study lipid peroxidation (LP) activity in the oral fluid for patients with abscesses and phlegmons of odontogenic etiology in maxillofacial area.

## **Objects and methods**

We examined 42 patients (22 males and 20 females) at the age 21–60 years with abscesses and phlegmons of odontogenic etiology in maxillofacial area. It was the main group for examination.

Patients with pyoinflammatory diseases in maxillofacial area had complex treatment consisted of the primary surgical d-bridement (PSD) of the suppurative focus, antibacterial, disintoxication, antiphlogistic therapy procedures combined with the local treatment of septic wounds. Group of control consisted of 30 healthy peoples (15 males and 15 females) of the same age.

OF sampling performed fasting. This test performed according to the anamnestic data of the menstrual cycle for women. OF sampling after stimulation with sterile elastic mastication done. We tested induced LP activity mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ferrous chloride during 20 minutes after its sampling (reaction by Fenton). LP activity was rated by light-sum indices (S) registered with biochemiluminometer BHL 06 device. Antioxidant activity of the OF was evaluated by tangent of angle of incidence of light intensity (tg). Specific activity of the antioxidant defense was calculated as correlation between slope and light-sum indices (tg/S). Obtained results were processed statistically with t-criterion by Student-Ficher.

## Results

When examining LP activity indices of the OF for healthy males, we fixed significant augmentation of the induced LP level when they had inflammatory process (3,9±1,7 for patients, 2,7±0,9 - in the group of control, difference is authentic when p=0,0006). The same changes of the LP activity were fixed for males and females. Males with pyoinflammatory diseases had LP indices equal to 4,32±1,92 comparing with group of control (-3±1,1), difference is authentic when p=0,02. Females with pyoinflammatory diseases had 3,4±1,2 indices of the LP indices of the OF in respect of the control (2,66±0,7) and is authentic when p=0,05. Those indices confirm data about activation of free radical processes during pathological processes. It's to be underlined that sex differences for LP of the OF have more higher indices for healthy and ill males (3,84±1,79) comparing with females of both groups (3,05±1,07, p=0,02). Authentic difference of the induced LP activity level was fixed between ill males (4,32±1,92) and ill females (3,4±1,2, p=0,04). This difference shows higher level of the LP activity for males comparing with females. Antioxidant activity indices of the OF in the group of control made -0,11±0,05 and -0,14±0,04 for ill people, difference is significant when p=0,009. Significant reduction of its antioxidant activity (p=0,04) was fixed for ill males (-0,14±0,05) comparing with control group (-0,1±0,01). Information we achieved, confirms body resistance reduction for patients with pyoinflammatory diseases in maxillofacial area. Results of examinations for LP activity and antioxidant activity of the OF in mentioned above groups taking into consideration patients sex shown on the FIGs. 1 and 2.

## Conclusion

Difference of final indices confirms possibility to use LP indices of the OF as additional diagnostics tests for patients with abscesses and phlegmons of odontogenic etiology in maxillofacial area.

LP activity

3,4

.66

f

ar. of control

🔳 main group

main group

gr. of control

.32





FIG.2. Antioxidant activity.

## References

[1] Bazanov N.N, Usmanov R.F., Rogov A.K. Hyperbaric oxygenation of HE-NE lazer emission application in complex treatment of patients with odontogenic phlegmons of face and neck //Stomatology. – 1992.- №2. – Р.38-40.

[2]. Vassina T.A. Status and perspectives for physico-chemical methods application in pyoinflammatory processes treatment //Antibiotics and chemical therapy. - 1996. - № 4. - P. 54-64

[3]. Grigoryan L.A., Badalyan V.A. Clinical experience for «Imudon» application during surgical out-patient's reception //Stomatology for all. – 2000. - № 3. – P. 8-9.

[4]. Kazakova Y.M. Clinico-experimental basis for acupuncture application in complex treatment of odontogenic abscesses in maxillofacial area: abstract. thes. ... cand. of med. scien: 14.00.21; Belarusian State medical University. - Minsk, 2009. - 25 p.

[5]. Kubaev R.E., Shavazi N.M. Clinico-genialogical analysis of children family frees with pyoinflammatory diseases in maxillofacial area //Med. scien. and teach.-meth. journ.- 2001.- № 3. - P.152-158.

[6]. Kozlyakina N.P. state of parodentium tissues and enzyme secretory function of salivary glands when lipids peroxidation stimulation //Stomatology.- 1986.- V.65, №3. - P. 8-10.

. . . . . . . . . . . . . . . .

## ELASTIC MODULUS DETERMINATION ON **OSTEOPOROTIC RAT BONES** BY THE THREE-POINT BENDING TEST AND NANOINDENTATION

JANA VONDROVA\*, JAROSLAV LUKES, RADEK SEDLACEK, PAVEL RUZICKA

CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, LABORATORY OF BIOMECHANICS, TECHNICKA 4, 166 07 PRAGUE, CZECH REPUBLIC \*MAILTO: vondrova@biomed.fsid.cvut.cz

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 6-8]

## Introduction

Osteoporosis is a generalized systematic skeleton disease that is characterized by retrogression of the mechanical resistance of the bones. This retrogression is a consequence of quantity and quality changes in the bone mass, and it leads to an increased risk of bone fractures. Treatment for osteoporosis must correspond with the causative agent and with the state of the patient.

There is increasing demand for the evaluation of more bone parameters, especially in the area of mechanical stress distribution in the bone, so we have started to study the bone mechanical properties to various types of testing and these are three-point bending test, femoral neck fracture and finally nanoindentation. The main benefit is that the mechanical properties of healthy and treated bones can be compared, and these findings can be confronted with medical tests.

#### Materials and methods

The experiments were performed on 16 rats with an initial body weight of 180-200g that were divided into two groups: I – Alcohol administration, II – baseline control. Alcohol was administered in dose of 15 $\mu$ g per day added to the water. After four months of treatment, the animals were killed by decapitation. The left femur was removed and cleaned of the soft tissue and immediately frozen at a temperature of -20°C. During 24 hours before testing the bones were hydrated in the distilled water at the room temperature.

Biomechanical testing system MTS Mini Bionix 858.02 was used for the three-point bending test (see FIG.1). The bone was placed on two supporting bars (2 mm in diameter) with span 15mm and loaded by rounded bar from medial side of the rat with the loading rate 5mm/min. The program, written for the test control in TestWare software, controls crosshead speed and measures important quantities such as load, displacement and time. We calculated several biomechanical parameters of bone that can be used to characterize the bone integrity, such as the bending strength  $\sigma_{max}$ , flexural rigidity S and the work to failure U [1].

The second experiment was performed with Hysitron TriboLab nanoindentation system (see FIG.2) at the Faculty of Civil Engineering at CTU in Prague. It provides in-situ scanning of topography (SPM) and piezo automation with precision of the indent placement less than  $1\mu$ m. The Berkovich tip works in closed environment on active antivibrating stage. Optic set up works with 1-10x zooming system with the zoom 5x as the default value.

The specimens for this test were prepared from fractured bones by three-point bending testing. Bone was set in a vertical position to its section and casted in epoxy. After curing the bone was cut into c. 1.5mm high cylindr by the precision sectioning saw ISOMET LS and burnished.

Traditional trapezoidal shape of loading curve (15x10x15s;  $F_{max}$ =7mN) was used for the indentation. The automation method was applied on each sample in two different zones. Grid of 3x3 indents in load control regime was used.





FIG.1. Three-point bending test.

FIG.2. Nanoindentation.

#### **Experimental results**

The elastic modulus E, determinated by three-point bending test, was calculated from the force and displacement of the loaders:

$$E = \frac{S \cdot L^3}{48 \cdot I}$$

where S is the extrinsic stiffness, L is distance between two supporting bars and I is the cross-sectional moment of inertia around the axis of bending.

The most common method for analyzing nanoindentation load-displacement data is that of Oliver and Pharr.

The effective modulus Eeff is derived from

$$E_{\rm eff} = \frac{1}{\beta} \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{A}}$$

where A is the projected contact area,  $\beta$  is 1.034 for Berkovich indenter and S is the unloading stiffness.

The effective modulus is related to the specimen elastic modulus through

$$\frac{1}{E_{\text{eff}}} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_i^2}{E_i}$$

where E and v are indentation modulus and Poisson's ratio (0.3 for bone) for the specimen, and Ei and vi are the same quantities for the indenter (1140GPa and 0.07) [2].

The experimental results are shown in TABLE 1.

Spe-	Three-po ding t	oint ben- cesting	Nanoindentation testir		ı testing
cimen no.	E [GPa]	Mean E [GPa]	E <sub>eff</sub> [GPa]	E [GPa]	Mean E [GPa]
1	4.66		3.64	3.32	
2	6.11		3.05	2.78	
3	6.93		3.54	3.23	
4	6.42	5.97 ± 0.49	3.41	3.11	3.11 ±
5	6.19		26.90	24.53	0.16
6	6.36		3.54	3.23	
7	5.50		3.32	3.03	
8	5.23		3.37	3.07	
9	5.86		3.29	3.00	
10	7.30		3.30	3.01	
11	5.32	5.86 ± 0.59	3.08	2.81	
12	6.21		3.38	3.08	3.00 ±
13	4.51		3.23	2.95	0.16
14	6.02		3.00	2.74	
15	6.70		3.49	3.18	
16	5.08		3.52	3.21	

TABLE 1. Values of the elastic modulus E and mean elastic modulus E ± SD.

## Conclusion

Alcohol administration lowers bone bending strength [1] but for result values of the elastic modulus determinated by both tests the differences between groups are not statistic significant. The specimen no.5 shows the excessive values in the nanoindentation. We did not find their cause, hence we excluded it from the calculation of the mean elastic modulus.

## Acknowledgements

The research project has been supported by the research plan MSM 6840770012 "Transdisciplinary research in the field of the biomedical engineering II".

## References

[1] J. Vondrova, P. Ruzicka, R. Sedlacek, et al., The Effect of Alcohol Administration on the Bone Mechanical Properties. Proceedings of the 22nd DAS, Parma (2005), 106-107.

[2] Y. H. An, R. A. Draughn, Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 2000, 263.

. . . . . . . . . . . . . . . .

EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF IONIZING RADIATION LOW DOSES IMPACT ON TEETH DEVELOPMENT

N.N.CHESHKO, H.A.BERLOV, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA\*

Byelorussian State Medical University, Minsk, Belarus 33-239, Pushkin av.; PO BOX 190; 220092, Minsk, Belarus \*MAILTO: ip-c@yandex.ru

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 8-9]

## Introduction

Scientific grounds of solving post-Chernobyl medical, biological, ecological, economic, social and other problems remain as an important task for researchers working in different fields of science.

Our research purpose is to study ionizing radiation low doses (IRLD) in the laboratory experiment.

## Materials and methods

The experiments were carried out on 27 not thoroughbred white female rats. They and their litter were irradiated at the Institute of Radiobiology NAS RB by the «Gammarid-192/120 unit» (Gamma-defectoscope «Gammarid» manufactured by the «Isotop» Enterprise, Leningrad) unit at 110mR/h exposition power from the 1st gestation day up to material selection on the 16th, 18th, 20th gestation day and on the 1st and 3rd postnatal day. The absorbed dose was 0,38–0,56Gy. The controls were not irradiated.

The specimens were fixed in 10% neutral formalin then embedded in paraffin according to the standard method. Sagittal «serial-selective» sections [1] were stained with hematoxylin and eosin, picrofuchsin after van Gieson sum content of DNA and RNA, which was evaluated by 5-mark scale, revealed by the method of Einarson, elastic fibers - by Hart, argyrophil ones - by Bilshovsky (H.Berlov's modification) [2]. Proliferative activity was determined according to the method of A.Kazantseva [3]. The number of cellular layers also was counted. The square, thickness and length of teeth germs (TGs) were measured with «Bioscan – AT» (Model was constructed in Central Scientific-Research Laboratory, Medical Institute, Minsk) automatic image analyser. The measurements were carried in each case of control and experiment 10 times as a minimum. In all, 8329 histological specimens of foetuses' and new-born rats' heads were prepared, 2197 of them showing tooth germs. The data were analysed by variation statistics with the Student's test.

#### Results

While studying IRLD impact on odontogenesis we have revealed some unknown before structures in tooth germs. Thus, we described «concentric structures» in dental lamina and in the inner enamel epithelium, its appearance was delayed in experimental foetuses by IRLD action; pillowlike thickenings in the inner enamel epithelium in controls; inverted into mesenchyme dental buds in experimental rats' foetuses, focal mesenchyme cell invasion into oral cavity. We also have described undermembrane (underenameloblast) cellular layer for the first time. Cyst formation due to radiation exposure was revealed in the inner enamel epithelium.

IRLD suppressed considerably the proliferative activity of tooth germ cells. Total mitotic index in all age animals' groups turned out to be lower than the respective indices in the controls. Thus, in the experimental 16-day old foetuses these values were 7,61±1,32‰, in the controls 25,84±0,45‰ (p<0,001); in 18-day old 19,93±0,55 and 30,85±0,47‰ (p<0,001); in 20-day old 12,15±3,12 and 12,84±0,33‰ (p>0,05); in 1-day old rats 3,43±0,72 and 6,62±0,67‰ (p<0,05); in 3-day old 2,99±0,19 and 7,28±0,0‰ (p<0,001) respectively. Indices differences are statistically significant, except those ones in the 20-day old foetuses (FIG.1).

In the irradiated experimental animals the cellular layers number in basic tooth germ components was reduced. In the experimental 16-day old foetuses and in the controls these values were  $10,35\pm0,65$  and  $20,37\pm1,59$  (p<0,05); in 18-day old  $16,97\pm1,10$  and  $24,95\pm1,35$  (p<0,05); in 20-day old  $27,53\pm5,00$  and  $32,60\pm2,40$  (p>0,05); in 1-day old rats  $6,70\pm0,61$  and  $16,20\pm0,30$  (p<0,001); in 3-day old animals  $7,93\pm0,64$  and  $15,65\pm0,05$  (p<0,001) respectively. We have revealed statistically significant indices differences in all experimental animals, except those ones in 20-day old foetuses (FIG.2).

Using «Bioscan – AT» automatic image analyser we determined enamel organ surface to be the most considerably reduced in the rats exposed to IRLD during ante- and prenatal development periods. In experimental 16-day old



FIG.1. Mitotic activity in the dental germs cells for rats.



FIG.2. Quantity of cells layers in the main components of dental germs for rats.



FIG.3. Area of the emamel organ in the dental germs for rats.



FIG.4. Odontoblasts layer thickness in the dental germs for rats.

foetuses and in the controls the indices were 1,44\*±0,10 and 4,02±0,66µm²l (p<0,001); in 18-day old foetuses 3,85±0,46 and 5,06±0,51µm² (p>0,05); in 20-day old 13,20±0,62 and 16,05±0,70µm² (p<0,01). The differences are statistically significant, except those ones in the 18-day old foetuses (FIG.3).

In the postnatal period, the odontoblast layer thickness showed maximal changes compared to those ones in other basic tooth germ structures. In 1-day old experimental rats and in the controls the indices were 21,50±1,27 and 34,61±2,94 $\mu$ m (p <0,001); in 3-day old 43,68±2,31 and 52,54±2,60 $\mu$ m (p<0,05) respectively. Indices differences are statistically significant (FIG.4).

## Conclusion

IRLD reduced proliferative activity, cellular layers number and, in the majority of cases, tooth germ structure thickess; caused oedema, vacuolization, discomplexation, cell differentiation delay.

## References

 Cheshko N.N. Methods of investigation of odontogenesis. Zdravookhr Belarus 1993; 1: 35-36.

[2]. Berlov H.A. The Bilshovsky's method three modifications for impregnation of argyrophil fibers in celloidin-embedded specimens. Arch Path 1956; 18(2): 124-125.

[3]. Kazantseva I.A. Tumor mitosis pathology in the human organism. Novosibirsk: Nauka; 1981. 144 p.

. . . . . . . . . . . . . . . . .

## FINITE ELEMENT ANALYSIS OF ONCOLOGY KNEE ENDOPROSTHESIS

LUKAS ZACH\*, SVATAVA KONVICKOVA, PAVEL RUZICKA

LABORATORY OF BIOMECHANICS

Faculty of Mechanical Engineering, CTU in Prague Technicka 4, 166 07 Praha 6, Czech Republic \*MAILTO: Lukas.ZACH@fs.cvut.cz

## Abstract

This paper presents a finite element simulation of an oncology knee-joint endoprosthesis in a various degrees of flexion. The simulation has been made in accordance with an ISO 14243 [1-3]. A model of the knee implant (produces by ProSpon, s.r.o. [4]) consists of following parts: femoral stem, femoral replacement, femoral component, PE bushings, and tibial plateau. Results for four positions of flexion (1.53deg, 8.13deg, 15.31deg and 26.33deg) gave better understanding of strain and stress distribution along the endoprosthesis and pointed out also the most crucial areas requiring the attention. These foundlings are useful for individual design of the knee-joint prosthesis and for further development.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 9-11]

## Introduction

Finite element method (FEM) has become a useful tool while study of several reasons of implant's fractures and defects. It is also a valuable and effective tool for biomechanical devices development. Quite fast and easily modifiable models allow studying wide range of problems (static, dynamic) while using different boundary conditions (type of loading).

Fractures and malfunctions of joint and bone implants has different causes. Generally, they can be sorted by two causes – biological and mechanical. Among the biological sources of implant demages, especially implant loosening and infection are well described in literature. In contrary, a stem fracture or a UHMWPE parts defect are typical causes of mechanical defects (see FIG.1).

To understand better the mechanical reasons for oncology knee implants destruction, the presented study has been made. All boundary conditions are in accordance with ISO 14243-3: 2004 [3], where a manner of mechanical testing is defined.

<sup>\*</sup> All parameters of squares text must be multiplied by 10<sup>4</sup>



## Materials and methods

For presented nonlinear contact static analyses, solved in Abaqus CAE, an oncology knee endoprosthesis made by Prospon [4] has been chosen. The implant is made from titanium alloy Ti6Al4V. Femoral (and tibial) replacements are manufactured from UHMWPE - ultrahigh molecular weight polyethylene, PEEK-OPTIMA® is used for sliding bush. Implants are manufactured individually for each patient.

Following TABLE 1 summarize material properties of all parts. Ideally plastic material model of UHMWPE is more described in FIGURE 2.

	Young modulus [MPa]	Max. tensile stress [MPa]	Poisson's ratio
TiAl6V4	113800	900	0,34
PEEK	3650	90	0,44
UHMWPE	820	100	0,44

TABLE 1. Material properties.



FIG.2. Ideally plastic material model of UHMWPE.

As already mentioned, all boundary conditions are in accordance with ISO 14243-3: 2004 [3], where a manner of mechanical testing is defined. Four phases of loading cycle have been chosen, flexion of 1.53 deg, 8.13 deg, 15.31 deg and 26.33deg. Corresponding magnitudes of loading (axial) force F are summarized in TABLE 2. Following FIGURE 3 simplifies the applied boundary conditions.

Knee flexion [deg]	1,53	8,13	15,31	26,33
Axial force F [N]	1887	2433	2600	950

TABLE 2. Axial force magnitudes.



FIG.3. Boundary conditions applied to model of oncology knee endoprosthesis.



## Results

Type of loading given by ISO 14243-1 [1-3] caused corresponding response in all parts of the knee oncology endoprosthesis. The most critical areas on the implant follow.

Stress distribution on surface of femoral stem (FIG.4) is highly influenced by two factors: firstly a magnitude of a loading force and secondly its direction. Augmented values are always in fixations represented by a femoral component. Second important area is on a proximal end of femoral implant fixation which is the most common place of stem break due to high bending.

UHMWPE bushings in a "hinge" between the femoral component and tibial plateau are maybe the most critical plastic part of the endoprosthesis. Though the values between 16-28 MPa (FIG.5) are reached, it is only a case of limited number of elements so these results can be supposed to be "mesh errors". Nevertheless, these parts demand special attention and further study to eliminate an occurrence of PE wear. Especially dynamic tests taking into account cyclic loading would give better insight into the problem.

Femoral component (FIG.6) and tibial plateau (FIG.7) in case of hinge-type endoprosthesis are not as loaded as in case of anatomical total endoprosthesis. Some differences in stress distribution for different loadings are noticeable. For all types of axial forces, maximal stresses for titanium alloy are not reached.



FIG.5. Stress distribution (von Mieses theory) on surface of UHMWPE bushings [MPa].



FIG.6. Stress distribution (von Mieses theory) on surface of femoral component [MPa].

## Conclusions

One of the most common reasons of joint endoprosthesis malfunction leading to a reoperation is a mechanical defect or an implant loosening (or their combination). Appropriate design of the implant can dramatically eliminate this risk. As a useful tool for endoprosthesis development, a finite element method can be used, providing that the anatomical relation or mechanical test standards are kept.

A goal of this paper was to make up a computer simulation of oncology knee implant loading during the mechanical test defined by ISO 14243 [1-3]. The results pointed out the

. . . . . . . . . .



# FIG.7. Stress distribution (von Mieses theory) on surface of tibial stem [MPa].

most critical areas of the endoprosthesis, i.e. UHMWPE bushings and femoral stem made of titanium alloy. The analyses made for four degrees of flexion (1.53 deg, 8.13 deg, 15.31 deg and 26.33deg) can be used for simulation of various designs of the endoprosthesis. Since the oncology implants are produced as an individual replacement, finite element method represents a time and money saving method of the implant production.

## Acknowledgements

This research is supported by a grant of Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic: MPO FI-IM4/125.

## References

[1] ISO 14243-1. Implants for surgery - Wear of total knee-joint prostheses - Part 1: Loading and displacement parameters for wear-testing machines with load control and corresponding environmental conditions for test. 2002.

[2] ISO 14243-2. Implants for surgery - Wear of total knee-joint prostheses - Part 2: Methods of measurement. 2000.

[3] ISO 14243-3. Implants for surgery - Wear of total knee-joint prostheses - Part 3: Loading and displacement parameters for wear-testing machines with displacement control and corresponding environmental conditions for test. 2004.

[4] Prospon, s.r.o., Jiriho Voskovce 3206, Kladno, 272 01, Czech Republic. On-line at: <a href="http://www.prospon.cz/">http://www.prospon.cz/</a>

## RESULTS FOR COMPLEX POSTOPERATIVE PATIENTS'S REHABILITATION COMBINED WITH ACUPUNCTURE BY CLINICAL AND LABORATORY INDICES

T.L.SHEVELA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA\*

BELARUSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS, BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS \*MAILTO: IP-C@YANDEX.RU.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 12-13]

## Introduction

Last decades the method of dental implantation became frequently used among other types of particularized assistance rendered by maxillo-facial surgeons and stomatologist-orthopedist. In spite of huge number of implants and methods of operations, destruction appearance of the bone tissue where implant is inserted - pereimplantit (bone lesion) remains one of severe complication. Its development should be provoked by unequal allocation of working load into the tissue surrounding the tissue, from once side and by loosening of artificial support. This complication should be provoked by infection of surrounding tissues, from other side, it means by pyoinflammatory process development. Our days, acupuncture is widely used in every day rehabilitation procedures for patients with maxillofacial and stomatological diseases. But there is no information in special literature about acupuncture influence on the postoperative inflammatory reaction during dental implantation operations, long-term results are not also studied. So, all this determines urgency of the examination performed.

#### Aim

of work is to study acupuncture influence on the clinical indices of inflammation and biophysical indices of oral fluid microcrystallization for patients after dental implantation.

## **Objects and methods**

We examined 30 patients at the age of 25 - 55 years old underwent dental implantation treatment on the lower and upper jaws (one or two implant) in limits of one segment. Implantation course of delayed implantation in two stages was made for all patients with "Verline" (Belarus). Anesthesia course performed with conducting and infiltration procedures using ultracaini-D-C solution. Group I consisted of 15 persons had standard treatment postoperatively composed of antimicrobial and antiphlogistic medicines as well as medicines for osteointegration. Group II had the same treatment course combined with acupuncture. They applied acupuncture before operation of dental implantation and during it as anesthesia course. Irritation was made with brake (antianxiety) method on the distal acupoints of the common action of strong vegetative direction and on the local acupoints located on the Yan channels of the body going into the maxillofacial area. Its external and internal pathway passed via the segment of interest of jaw or skin projection. Then, we performed 10 sessions every day or in a day. In order to objectivise and fix treatment results according to the terms of the morphological regeneration of the bone tissue of the lower jar (before operation, 3 days after implantation, 7, 14, 21 days, 1 and 2, 6 months after operation, 6 months after prosthesis) we studied the following indices:

- · Shiller-Pissarev test and iodine number by Svrakov;
- peripheric circulation indices (PCI) [1];
- sensitivity index of periodont (SIP) [1];
- three points test for determining of the face configura tion alteration level due to the edema of soft tissue surrounding the jaw postoperatively [3];
- · X-ray pictures were studied 2 months later.

Oral fluid microcrystallization level development was studied with method modified by P.A.Leus (1977) [2]. Change of oral fluid microcrystallization indices for patients was examined twice: during the first day after dental implantation operation and 10 days after operation when postoperative treatment was finished.

## Results

Data received after having examined test results by Shiller-Pissarev and iodine number by Svrakov, PCI and SIP indexes confirmed that periodont tissue state was characterized as physiological norm before dental implantation for 32% of patients of the I group and for 28% of patients of the Il group in the limits of segment we were going to examine. Good compensatory state of the periodont tissue was fixed in 68% and 72% of cases accordingly. Inflammatory reaction was evident in both groups in respect of indices of before operation examination (p<0,01) 3 days after implantation. But there was no significant difference between the 1st and 2nd groups when comparing average indices of Shiller-Pissarev tests and iodine number by Svrakov, PCI and SIP indexes. At the same time, indices of the test for determining of the face configuration alteration level due to the edema of soft tissue surrounding the jaw were significantly less for







FIG.2. Changes of the peripheral indices of the circulation of the blood. patients of the group II (p<0,02).

Significant difference was fixed by the 7 day in the comparing groups according to the indices of Shiller-Pissarev tests and iodine number by Svrakov as well as to the PCI indices (p<0,05) showing advantages of the results of the 2nd group patients. The same results (p<0,05) were fixed on the 14 days results (FIGs. 1 and 2).

We did not fixed significant difference by Shiller-Pissarev tests indices and iodine number by Svrakov in comparing groups by the 21 days. At the same time, difference between average indices of SIP (p<0,01) was fixed what confirmed superiority of the 2nd group results. Examinations made 1 and 2 months later, had the same results. No significant difference fixed 2 months after the operation in the groups of examination. We also obtained positive results according to the X-ray methods of examination. Results we achieved demonstrate change of the oral fluid microcrystallization indices after the dental implantation 2,4±0,07 in respect of indices of control 1,55±0,05 (p<0,001). After the postoperative treatment finished, biophysical test indices were equal to 1,9±0,09 and showed authentically positive changes in respect of the initial indices (p<0,001). Authentic difference of the microcrystallization indices was fixed between the group II and group of control (p<0,01). These indices confirmed that process of osteointegration last in the system jaw - dental implant. Patients of the group of examination had no complications in the future and had successful orthopedic treatment.

#### Conclusion

According to the results we achieved we could conclude that positive advantage of the dental implantation for the patients of the group II was achieved due to acupuncture application in the complex treatment. So, acupuncture treatment combined with therapy and rehabilitation procedures for patients underwent dental implantation operations, should be considered as expedient.

## References

 [1]. Dedova, L.N. Diagnostics of periodont diseases: tech. – method. manual / L.N. Dedova. – Mn.: BSMU, 2004. – 70 p.

[2]. Leus, P.A. Clinico-experimental research of pathogenesis and pathogenetic conservative therapy and caries diseases prophylaxis: abstr. diss. ... dr. med. sciences: 14.00.21 / P.A.Leus; Mosc. med. stom. inst. Named by Semashko N.A. Semashko. – M., 1977. – 30 p.

[3]. Pohodenko-Chudakova I.O. Prophylaxis, treatment and rehabilitation of stomatological diseases using acupuncture therapy (clinico-laboratory and experimental research): anstr. diss. ... dr med. scienc: 14.00.21 / I.O. Pohodenko-Chudakova; GOU «Inst. for qualif. perf. of feder. med.-biol. agency. Russia». – M., 2005. – 44 p.

. . . . . . . . . . . . . .

## BIOINSPIRED NANOCOMPOSITE STRUCTURES FOR BONE TISSUE REGENERATION BASED ON COLLAGEN, GELATIN, POLYAMIDE AND HYDROXYAPATITE

T.Suchý<sup>1, 2\*</sup>, K.Balík<sup>2</sup>, M.Šupová<sup>2</sup>, D.Hrušková<sup>2</sup>, Sucharda<sup>2</sup>, M.Černy<sup>2</sup>, R.Sedláček<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF MECHA-NICAL ENGINEERING,

LABORATORY OF BIOMECHANICS, PRAGUE, CZECH REPUBLIC, <sup>2</sup>INSTITUTE OF ROCK STRUCTURE AND MECHANICS, CZECH ACA-DEMY OF SCIENCES, DEPARTMENT OF COMPOSITES AND CARBON MATERIALS, PRAGUE, CZECH REPUBLIC \*MAILTO: SUCHYT@BIOMED.FSID.CVUT.CZ

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 13-15]

## Introduction

Numerous synthetic bone replacement materials are nowadays available. These both single- and multi-phase (i.e., composite) materials combine the advantages exhibited by each component of the material, with a structure and composition similar to that of natural bone [1,2]. Bone as a natural composite involves two main components, i.e. organic and inorganic materials. The organic portion of the bone comprises cells as well as the fibrous and amorphous part of the extracellular matrix. The fibrous part is formed by collagen (COL) fibres and the amorphous part by various glycoproteins or glycosaminoglycans that play important roles in controlling the function of osteoblasts as well as bone tissue mineralization [1,3]. The inorganic component comprises minerals, particularly hydroxyapatite (HA) and calcium phosphates. Another important feature of natural bone tissue is its nanoarchitecture. It has been observed that nanocrystalline HA promotes the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblasts. Moreover, the deposition of calcium-containing minerals on nanocrystalline HA was higher than on microcrystalline HA [4]. The mechanical properties of the natural bone should also be taken into account when designing an artificial bone implant. Suitable mechanical properties of the artificial material, similar to those of the natural bone, can induce the differentiation of stem cells toward osteoblasts when this cell type is lacking [5]. The aims of this work are the preparation of bioinspired composite materials composed of collagen and gelatin matrix, gelatin and polyamide nanofibers and hydroxyapaptite powder, determination of their mechanical properties and preparation verification.

## Materials and methods

Three types of biocomposites have been prepared. The first type (GELHA) has been prepared by introduction of hydroxyapaptite (HA) powder (particle size 20-70nm, supplied by Berkeley Advanced Biomaterials, Inc., San Leandro, CA, USA) into porcine gelatin (GEL) matrix (Fluka) and mixed by kneading machine (HAAKE, Thermo Electron Corporation, USA) at room temperature at a rotation speed of 15min<sup>-1</sup> for 24 hours (FIG.1a). Mixture has been formed followed by drying at ambient atmosphere, pressure and humidity.



FIG.1. SEM images of GELHA (a) composite (magnification 10000x) and NF-GELHA (b) composite (magnification 5000x). Micrograph of polished section of PAA-COLHA composite (c).

Dried composite sample (75wt.% GEL and 25wt.% HA) was cut into rectangle-shaped pieces for testing of mechanical properties.

14

A basic material of the second type has been provided by Elmarco Ltd. Gelatin nanofibers loaded by HA (NF-GELHA) and has been prepared by followed procedure. Porcine gelatin was dissolved in organic solvent. Nanoparticles of hydroxyapatite (20wt.% to dry matter) were mixed into the solution. In an effort to avoid clumps creation, this mixture was 5 minutes in an ultrasonic bath. Basis weights for gelatine and nHA mixture was app.6 gsm. Nanofibers (FIG.1b) had to be crosslinked (48 hours by glutaraldehyde vapours) due to water solubility. Sixty four layers of NF-GELHA have been placed into the form and pressed at 40°C under the pressure of 35MPa for 5 minutes (Pracovní stroje Teplice, Czech Republic, type HLV 5.1).

The third type (PAA-COLHA) (FIG. 1c) has been prepared by introducing of HA powder (paricle size 20-70nm, supplied by Berkeley Advanced Biomaterials, Inc., San Leandro, CA, USA) into porcine collagen (VUP Brno, CR) and mixed by kneading machine at room temperature at a rotation speed of 20min<sup>-1</sup> for 24 hours (75wt.% COL and 25wt.% HA). After this procedure, polyamide nanofibers (PAA; 1,5g/m<sup>2</sup>, Elmarco Ltd., CR) were added into the mixture (6 wt.% PAA and 94wt.% COLHA) and mixed by kneading machine at a room temperature at a rotation speed of 35min<sup>-1</sup> for 3 hours. The mixture have been placed into the form and pressed at 37°C under the pressure of 0.1MPa (Pracovní stroje Teplice, Czech Republic, type HLV 5.1). Approximate volume fractions of components were 46 vol.% COL, 25 ol.% HA and 29vol.% PAA.

The ultimate tensile strength and Young's modulus NF-GELHA and GELHA composites were determined with Inspekt 100 HT material tester (Hagewald & Peschke, Germany) and in the case of PAA-COLHA with testing system MTS 858.2 Mini Bionix (MTS Systems Corporation, Min-

nesota, USA), both experiments were provided with respect to ISO 527. Differences in HA concentration in matrices has been analyzed by Raman microscopy (Jobin Yvon, Labram HR, equipped with confocal microscope Olympus, exciting source-laser 780nm, step 2µm).



The behavior of the both GELHA and NF-GELHA composites at mechanical tests are similar, distinct brittle cracks appeared at specific load value (FIG.2). In the case of PAA-COLHA,





Material	Tensile strength [MPa]	Young's modu- lus [GPa]	
GELHA	29.9 ± 1.3	2.2 ± 0.3	
NF-GELHA	50.0 ± 2.1	1.2 ± 0.1	
PAA-COLHA	10.2 ± 1.1	0.7 ± 0.1	
Cortical bone	50–150	14-20	
Cancellous bone	10-20	0.05-0.5	





FIG.2. Typical stress-strain curves of examined composites (tensile tests).

#### Results

The purpose of the mechanical testing was to determine the behavior of the composite with regard to the future potential application in bone tissue engineering. The ultimate tensile strength and Young's modulus for all types of composites were determined (see TABLE 1).

measured samples showed elastic behavior without presence of brittle cracks. This fact should be caused by nonhomogenous distribution of polyamide nanofibers and HA particles, respectively nonhomogenous structure caused by preparation (for ilustration see FIG.1). The brittle behavior of GELHA and NF-GELHA composites (in comparison with PAA-COLHA) is also illustrated by higher values of Young's modulus. Based on these results, further optimization of mechanical properties will be carried out by selecting the volume ratio of the fiber reinforcement to the matrix and also reinforcement suitable orientation and layering.

For HA concentration determination the automatically mapping (software Labspec ver. 2.08) has been used. Selected spectrum and collection of measured Raman spectra are depicted in FIG.3. Concentration maps were calculated on the base of band belongs to PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> group at 964cm<sup>-1</sup>. Mapping of HA concentration in examined composites showed a sufficient and comparable HA dispersion in all cases. Better HA dispersion was showed in the case of NF-GELHA composite. This homogeneity can be connected and probably influence the mechanical properties.

## Conclusions

This study has investigated the possibilities of preparation of composite materials based on various reinforcing materials and matrices. The influence of different composite constituents on mechanical properties of composites mainly based on the biodegradable materials was verified. Further optimization of mechanical properties and verification of proper structure composition are subjects of the future research.

## Acknowledgements

This study was supported by the Czech Science Foundation under project No. 106/09/1000, and by Ministry of Education project Transdisciplinary Research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012.

## References

[1] Ramakrishna S., Huang Z.M., Kumar G.V., Batchelor A.W., Mayer J.: 2004, An Introduction to Biocomposites, Vol.1, 1st ed., Imperial College Press, London.

[2] Manikandan M., Naira K.C., Thomasa S., Groeninck G., Comp Sci Tech 61 (2001) 2519–2529.

[3] Murugan R., Ramakrishna S., Comp Sci and Technol. 65 (2005) 2386-2406.

[4] Evis Z., Sato M., Webster T.J., J. Biomed Mater Res A. 78 (2006) 500-7.

[5] Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Fischer D.E., Cell 126 (2006) 677-89.

## DISORDER OF THE MINERAL METABOLISM OF THE ORAL CAVITY FOR PATIENTS WITH ODONTOGENIC ABSCESES IN MAXILLOFACIAL AREA AND WAYS FOR ITS CORRECTION WITH STANDARD METHODS OF REHABILITATION

Y.M.Kazakova, I.O.Pohodenko-Chudakova\*

BELARUSIAN COLLABORATING CENTRE OF EACMFS, BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS \*MAILTO: IP-C@YANDEX.RU

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 15-16]

## Introduction

Examination of the oral fluid (OF) has great potential in different diseases diagnostics now. Its indices describe oral cavity homeostasis as well as human body state in general [6].

Bone is a calcified tissue consisted of cells put into the main hard substance. Inorganic components make 70% of this substance and the principal of them is hydroxyapatite [3]. Due to this, great attention is paid to the ions calcium content and its compounds into the fluid systems of the human body for patients with pathological processes of the bone tissue as well as with pyoinflammatory complications of osteomyelitis presented by abscesses and phlegmons [2,4]. Pyoinflammatory process of any etiology is accompanied by morphological and functional disorders. It means that many enzymatic reactions are involved into the pathological process. Hydrolytic enzyme - acid phosphatase (AP) - should be considered as marker of this process. Many works give up to the examination of AP activity into the biological environment of the human body [1,5]. Last time, more attention is paid for micromorphological indices of the OF and its fractions examination [3]. Indices of the OF microcrystallization describe correctly processes of mineralization of maxillofacial area. But there are few works about changes of the OF microcrystallization indices for patients with pyoinflammatory diseases in maxillofacial area during the treatment. All this confirms the urgency of this work.

## Aim of work

is to study mineral metabolism of the oral cavity for patients with odontogenic abscesses in the maxillofacial area and ways of its correction with standard complex of rehabilitation methods.

## **Objects and methods**

We examined 30 patients with odontogenic abscesses in maxillofacial area. 15 patients had abscesses of mylohyoideus area and 15 patients with abscesses of pterygoid mandibular area. When patients went for medical care, doctors used intraoral approach method for the primary surgical d-bridement (PSD) of the suppurative focus and patients were instituted for the standard course of complex antiphlogistic therapy. Bandages were changed every day.

16

The group of control consisted of 10 healthy persons.

AF activity indices were determined with kinesthetic method using the set for acid phosphatase indices fixation (PBS–«ORGENICS», France). Results were fixed in U/I. Ca<sup>2+</sup> ions content was fixed with electrolyte analyzer AVL 984–S (Graz, Austria) in millimole/I. OF microcrystallization indices were determined by our own method and results fixed in Units. All indices were fixed in different time: before PSD and 5 days after the treatment started.

#### Results

During examination of the AF activity we found its enzyme level composed 32,75 $\pm$ 5,13 and was authentically different from standard (p<0,01) which was 17,7 $\pm$ 1,7. We fixed little reduction of AF and OF indices from 32,27 $\pm$ 5,13 to 27,40 $\pm$ 5,08 during the treatment. Significant difference was not fixed for these indices. Tendency towards the authentic difference with standard indices during the 2nd examination was kept. Thus, change of AF indices confirms the moderate reduction of the inflammation processes against a background of the standard treatment but AF indices didn't reach the standard indices level.

We fixed significant reduction of the Ca<sup>2+</sup> ions during examination of its content in the patient's OF. During the 1st examination this indices was  $0,303\pm0,03$  what was authentically less than standard indices (p<0,01) equal  $0,436\pm0,02$ . We had no chance to achieve the authentic change of Ca2+ iones level in the OF during the treatment. During the 2nd examination this indices made  $0,257\pm0,05$ . To conclude, Ca<sup>2+</sup> iones content in the OF is not restoring when standard treatment applied and remains authentically less that standard indices (p<0,001).

Microcrystallization indices were  $2,0\pm0,15$  in the group of standard. Patients with diseases mentioned above had microcrystallization indices of  $2,5\pm0,06$  when arrived for medical care and it was authentically higher that standard indices (p<0,01). Achieved results confirm that this indices did not changes and remained  $2,5\pm0,06$  during the 2nd examination when standard treatment applied and kept authentic difference with indices of standard (p<0,05) (FIG.1).

According to the final biochemical and biophysical indices for OF of patients with odontogenic abscesses in maxillofacial area, this biological environment responds informatively to the development of the pyoinflammatory process in maxillofacial area. Content level of biologically important substances in it has marked changes concerned with disease development as well as its clinical course and processes of homeostasis normalization due to the complex application of treatment procedures and compensatory systems of the organism what corresponds to the information in



FIG.1. Changes of the mineral metabolism indices in the oral cavity for patients with odontogenic abscesses in maxillofacial area. the literature [3]. Achieved results demonstrate that standard treatment course applied for patients with pyoinflammatory diseases treatment allows us to obtain satisfactory results. But when information analyzed in details, we saw that patients of this group had difference of indices with indices of standard of indices under the study in the OF on the 5 days of examination even. Higher level of AF and OF was kept, Ca<sup>2+</sup> iones level in the OF was not restored and OF indices did not become normal. So, it's necessary to elaborate new more effective and rational complexes of treatment courses for patients with pyoinflammatory diseases treatment.

#### Conclusion

1) Patients with odontogenic abscesses in the maxillofacial area had mineral metabolism process disordered in the oral fluid. It's confirmed by change of microcrystallization, Ca<sup>2+</sup> ions, OF, AF indices changes;

2) Indices of the OF that we chosen for examination are informative. They confirm authentically whether the patient has pyoinflammatory disease: odontogenic abscess in maxillofacial area and reflect mineral metabolism state of the oral cavity;

3) OF should be used for making diagnoses and appreciation of inflammatory process development for patients with odontogenic abscesses in the maxillofacial area;

4) There is no complete normalization of the patient's homeostasis when standard treatment procedures applied.

## References

[1] Beer L. et al. Behavior of alkaline serum phosphatase (AP) and its bone isoenzyme in healing of the osteotomized tibia in rabbits an animal experimental study //Z. Exp. Chir. Transplant. Kunstliche Organe. – 1990. – Vol. 23, № 4. – P. 230–232.

[2] Bernard B.A. Ca, + binding alkaline phosphatase in mechanism of calcification //Calcium regulation and bone metabolism. Basis and clinical aspects. – 1987. – Vol. 9. – P. 413–418.

[3] Borovskiy E.V., Leontyev V.K. Oral cavity biology. N. Novgorod: Rubl. H. NGMA, 2001.– 304 p.

[4] Kashick R.S. et al. Sodium, potassium and calcium in gingival fluid: a study of the relationship of the ions to one another to circadian rhythms, gingival bleeding, purulence, and to conservative periodontal therapy //J. Periodontol. – 1970. – Vol. 41, № 8. – P. 442–448.

[5] Pohodenko-Chudakova I.O., Kazakova Y.M. Prognostication of the pyoinflammatory diseases development of the maxillofacial area according to the biochemical indices of the oral fluid //New technologies in the field military surgery and surgery of peace time injuries : rev. mater. internat. conf. – STp, 2006. – P. 305–306.

[5] Suntzov V.G. et al. Microcrystallization and electroconductivity of the oral fluid for child health //Stomatology and child health: thes. of report. – M., 1996. – P. 111–112.

• • • • • • • • • • • • • • • • •

## DEVELOMENT OF A PHYSIOGNOMIC HIP JOINT REPLACEMENT

#### JAN SYKORA\*, SVATAVA KONVICKOVA, MATEJ DANIEL

Laboratory of Human Biomechanics, CTU in Prague, Faculty of Mechanical Engineering, Department of Mechanics, 4 Technicka str., 166 07, Prague 6, Czech Republic \*MAILTO: J.Sykora@sh.cvut.cz

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 17]

## Introduction

Ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) is the most popular material for manufacturing a hip joint cups. The Abrasion of UHMWPE is the biggest problem of a total hip joint replacement in this time. The wear debris spread to the surroundings of the total replacement and react with tissue that causes to implant loosening. There are two different ways to the reduction wear. Development of new materials and material combination is first way, second way is arrangement of the articulation surfaces geometry (slide pair hip cup – femoral head). We developed a physiognomic total hip joint replacement with arrangement geometry.

## Materials and methods



#### FIG.2.

We indicate on the basis of the comparison our results of mathematical (analytic model) and finite element models (numeric model) of a contact stress distribution, that it is possible to use the finite element method (FEM) for the modeling of the non-weigh bearing part of the total replacement of the hip joint (FIG.1). The point of this technical solution of the new hip cup is to design such a shape of the joint



surface that will be symmetrical towards the hip joint force. The shape is designed as the basic mathematical models of the distribution of the contact stress [1]. Three basic forms of this shape were designed (FIG.2). The cup with the hole was chose as the most suitable [2] (FIG.2 A).

The comparison of the contact stress distribution analytic model of the classic cup and cup with hollow show, that the contact stress distribution of the cup with hollow is more uniform. Decrease of the contact stress gradient by way of modification of the non-weigh bearing area was succeeded. The maximal value of the contact stress was increased by the hollow in the non-weigh bearing area. This maximum was on the edge of the hollow. We substituted this concentrator by fillet edge (FIG.3.A). We attempted to decrease maximal value of the contact stress by this modification. This attempt was successfully (FIG.3.B)

## **Discussion and conclusion**

The manufacture of the hip cups with modification is very exacting and for that reason very expensive then femoral head with modification. Therefore we changed cup modification to femoral head modification.

We created three models of the femoral head with different modification. The shape of these heads was designed





symmetrical towards the hip joint force. This is point of technical solution of the physiognomic total hip joint replacement.

The computations with modified hip cups weren't useless. We demonstrated that it is possible to achieve more uniform contact stress distribution from design of the non-weigh bearing area of the hip. We verified original idea and tried some technical principles that will be use in future.

The FEM models of the modified heads are complete and we waiting for results. These results will be study and compare with previous results.

In next phase of development we will focus on determination of the contact stress distribution by experiment. Resultant contact stress distribution will be compare with FEM computations. We will choose next development way on the basis these results.

## Acknowledgement

The research is supported by the Ministry of Education project: Transdisciplinary research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012.

## References

[1] Daniel M., Sýkora J., Goldman T., Konvičkova S., New design of the acetabular component for total hip replacement., Biomechanics of Man, Spicak, 2004

[2] Daniel M., Sýkora J., Konvičkova S., Development of new design of the acetabular component for total hip replacement., Conference on Biomaterials in Medicine and Veterinary, Rytro, 2005

MICRO- AND NANOPATTERNED SURFACES FOR GUIDED ADHESION, GROWTH AND PHENOTYPIC MATURATION OF CELLS

Lucie Bacakova<sup>1\*</sup>, Elena Filova<sup>1</sup>, Lubica Grausova<sup>1</sup>, Marta Vandrovcova<sup>1</sup>, Martin Parizek<sup>1</sup>, Katarina Novotna<sup>1</sup>, Vaclav Svorcik<sup>2</sup>, Jiri Vacik<sup>3</sup>, Frantisek Rypacek<sup>4</sup>, Alexander Kromka<sup>5</sup>, Johannes Heitz<sup>6</sup>, Alex Shard<sup>7</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,

ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, VIDENSKA 1083, CZ-14220 PRAGUE 4 – KRC, CZECH REPUBLIC <sup>2</sup>DEPARTMENT OF SOLID STATE ENGINEERING, INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY, TECHNICKA 5, CZ-16628 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC <sup>3</sup>NUCLEAR PHYSICS INSTITUTE, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, CZ-25068 REZ NEAR PRAGUE, CZECH REPUBLIC <sup>4</sup>INSTITUTE OF MACROMOLECULAR CHEMISTRY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, HEYROVSKY SQ. 2, CZ-16206 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC <sup>5</sup>INSTITUTE OF PHYSICS, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, CUKROVARNICKA 10, CZ-16253 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC <sup>6</sup>JOHANNES-KEPLER UNIVERSITY LINZ, INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PHYSICS, DEPARTMENT OF APPLIED PHYSICS, ALTENBERGERSTRASSE 69, A-4040 LINZ, AUSTRIA <sup>7</sup>NATIONAL PHYSICAL LABORATORY, HAMPTON ROAD, MIDDLESEX, UK TW11 OLW, UNITED KINGDOM MAILTO: LUCY@BIOMED.CAS.CZ

## Abstract

Micropatterned surfaces were created by UV lightirradiation of polytetrafluoroethylene through a metallic mask, by successive plasma polymerization of acrylic acid and 1,7-octadiene, or by creation of prominences and grooves by deposition of fullerenes C60 through a metallic mask. All these surface types were capable of inducing regionally-selective adhesion, proliferation and phenotypic maturation of vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells or human bonederived MG 63 cells. Nanopatterned surfaces created by tethering GRGDSG oligopeptides through polyethylene oxide chains on a polymeric surface promoted spreading, formation of focal adhesion plaques and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. Surfaces nanopatterned with nanocrystalline diamond gave good support for the adhesion, growth and metabolic activity of osteoblast-like MG 63 cells.

**Key words:** surface patterning, microstructure, nanostructure, biofunctionalization, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, bone cells

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 18-21]

## Introduction

Patterned surfaces are material surfaces containing domains with different chemical and physical properties, such as chemical composition, surface energy, wettability, electrical behavior, or surface roughness and topography. These surfaces were originally developed for applications in electronics, e.g. for constructing semiconductors [1,2]. A marked expansion of patterning technology into the biological disciplines started in the early 1990s, when surfaces containing highly hydrophilic domains non-adhesive for cells, and less hydrophilic domains promoting adhesion and growth of bovine vascular endothelial cells, were created by photolithography [3]. Recently, patterned surfaces have provided a suitable tool for all applications in which we require regionally-selective adhesion of cells, controlled spreading, directed migration and growth, specific spatial organization of cells, induction of their differentiation and functioning, preferential adhesion and growth of certain cell types, interaction and cooperation of various cell types, and also temporal control of these events. These applications involve tissue engineering and various other biotechnologies, such as cell microarrays for use in advanced genomics, proteomics, drug discovery or construction of biosensors [2].

For biological purposes, material patterning usually occurs on a micro- or nanoscale. On micropatterned surfaces, cell proliferation, differentiation or apoptosis is controlled by the size and shape of the cell spreading area, which is determined by the size and shape of the cell-adhesive microdomains [4,5]. On nanopatterned surfaces, cell adhesion, spreading, survival, proliferation activity and differentiation are controlled by manipulating the number, size, shape, chemical composition and spatial distribution of cell-material contacts [6,7].

In this study, we have investigated the adhesion, growth and maturation of vascular and bone-derived cells on three types of micropatterned surfaces and two types of nanopatterned surfaces. Micropatterned surfaces were prepared using three different techniques, namely (1) irradiation of synthetic polymers with ultraviolet (UV) light through a metallic mask, (2) successive plasma polymerization of hydrophilic and hydrophobic compounds, and (3) variation in the material surface roughness and topography by deposition of carbon nanoparticles (fullerenes  $C_{60}$ ) or hybrid metal-fullerene composites through metallic masks. Nanopatterned surfaces were created by (1) functionalization of the material surface by oligopeptides GRGDSG, i.e. synthetic ligands for integrin adhesion receptors, or by (2) deposition of nanocrystalline diamond.

## Material and methods

#### Preparation of micropatterned surfaces

#### **UV-light irradiation**

Polytetrafluoroethylene (PTFE) foils (25µm in thickness; Goodfellow Ltd., Cambridge, UK) were irradiated with UV light generated by an Xe2\*-excimer lamp (Heraeus-Noblelight, Hanau, Germany; center wavelength 172nm, spectral bandwidth 16nm, intensity about 20mW/cm<sup>2</sup>) for 10, 20 or 30 min through a nickel contact mask with holes 100µm in width with center-to-center distances of 300 µm. The irradiation was performed in a reactive atmosphere of NH<sub>3</sub> (purity of 99.995%, Linde, Höllriegelskreuth, Germany). The spot pattern covered 8.7% of the total sample area [8].

#### **Plasma polymerization**

Acrylic acid (AA) and 1,7-octadiene (OD) were polymerised on the inner surface of 24-well multidishes (Costar, Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) using a radio frequency (RF) signal generator (Coaxial Power Systems Ltd., UK). After polymerization of the first polymer, AA, in the form of a continuous layer on the dish bottom, the OD was polymerized through a mask consisting of a copper transmission electron microscope grid (Sjostrand Copper 3.05 mm, Athene Grids UK), with stripe-like gaps that were

75 and 150µm in width and 67.5 or 135µm apart. The AA strips occupied 47% of the resulting patterned surface [9].

#### Deposition of fullerenes C<sub>60</sub> and hybrid metal-fullerene composites

Fullerenes C<sub>60</sub> (purity 99.5%, SES Research, U.S.A.) were deposited as micropatterned films on to microscopic glass coverslips (Menzel Glaser, Germany; diameter 12mm) by the evaporation of C60 in the Univex-300 vacuum system (Leybold, Germany) in the following conditions: room temperature of the substrates,  $C_{60}$  deposition rate  $\leq 10$  L/s, temperature of C<sub>60</sub> evaporation in the Knudsen cells about 450°C, time of deposition up to 50 minutes. The thickness of the layers increased proportionally to the temperature in the Knudsen cell, and the time of deposition. Micropatterned layers were created by deposition of C60 through a metallic mask with rectangular openings with an average size of 128 per 98µm (about 12,500µm<sup>2</sup>) and 50µm spacing. Due to the divergent fullerene beam, however, the C60 molecules could also invade the underside of the ribbing and form a light backing film [10].

Hybrid C60/Ti films of micropatterned morphology were created in a similar manner by co-deposition of  $C_{60}$  and Ti in a ratio of 1:1 (i.e., one  $C_{60}$  molecule per one Ti atom) [11].

#### Preparation of nanopatterned surfaces

#### **GRGDS**-functionalized polymer surfaces

Circular glass coverslips (12mm in diameter, Dispolab, Brno, CR) were silanized with dimethyldichlorsilane, and a uniform poly-L-lactide (PLLA, Mw=365 000) film was cast on the silanized surface from a polymer solution in dioxane by spin-coating (PWM32 Precision Spin Coater, Headway Research, USA). The surface of the PLLA films was then modified with 1:4 mixtures of poly(DL-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide-block-poly(DL-lactide) copolymer (PDLLA-b-PEO), in which 5% of the copolymer molecules carried a synthetic extracellular matrix-derived ligand for integrin adhesion receptors, the GRGDSG oligopeptide, attached to the methoxy end group of the PEO chain [7].

#### Nanocrystalline diamond films

Nanocrystalline diamond (NCD) films were grown on (100) oriented silicon substrates (12mm in diameter) by a microwave plasma-enhanced CVD method in an ellipsoidal cavity reactor (AIXTRON-P6, Germany). The silicon substrates were polished to atomic flatness (rms roughness about 1 nm). Prior to the deposition process, the substrates were mechanically seeded in an ultrasonic bath using 5-10 nm diamond nanoparticles (NanoAmando®) for 40 minutes. The nucleation procedure was then followed by the growth step, provided at a constant methane concentration  $(1\% \text{ CH}_4 \text{ in H}_2)$  and at a total gas pressure of 30mbar. The substrate temperature was 860°C. The silicon substrates were overcoated with an NCD film on both sides, i.e. on the top and bottom side, respectively. Thus, hermetic sealing of the Si substrate minimized any unwanted bio-chemical reaction. Finally, the deposited NCD films were treated in oxygen plasma to enhance the hydrophilic character of the diamond surface [12].

#### Cell source and culture condition

The patterned surfaces were seeded with vascular endothelial cells in the form of commercially available cell lines, namely human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) of the line EA.hy926 [8] or bovine pulmonary artery endothelial cells (line CPAE, ATCC CCL-209, Rockville, MA, U.S.A.). Other cell types used in this study were vascular smooth muscle cells (VSMC) derived from the thoracic rat aorta by

. . . . . . . . . . . . . .

an explantation method [13] and used in passage 4, or human osteoblast-like cells (line MG 63, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). The cell seeding densities ranged from about 6,500 to 32,000cells/cm<sup>2</sup>. The EA.hy926 endothelial cells were cultured in a Dulbecco-modified Eagle Medium (Life Technologies, Vienna, Austria) with 10 % fetal bovine serum (FBS; Life Technologies), 100units/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies), 2.5µg/ml amphotericin B (Sigma) and 1% HAT supplement (Sigma). The CPAE endothelial cells were grown in Minimum Essential Eagle Medium with 2mM L-glutamin, Earle's BSS with 1.5g/l sodium bicarbonate, 0.1mM non-essential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate (all chemicals from Sigma) and 20% of FBS (Sebak GmbH, Aidenbach, Germany). For VSMC and MG 63 cells, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Cat No. D5648), supplemented with 10% of FBS and 40µg/ml of gentamicin (LEK, Ljubljana, Slovenia).

#### Results and discussion

#### Micropatterned surfaces created by UV light irradiation

The degree of selectivity of the cell adhesion to the irradiated microdomains was dependent on the time of exposure of these spots to the irradiation. On PTFE irradiated for 10 minutes only, the cells adhered almost homogeneously to the polymer surface, whereas on the polymer irradiated for 20 or 30 minutes, the cells adhered to the modified spots with a high degree of selectivity, i.e. 70 to 90% of all adhered cells with a mean value averaged over all samples of 79.84±12.35% . This is a very high value when we consider that only 8.7 % of the surface was covered with spots. This cell behavior was probably due to a pronounced formation of polar oxygen-containing groups and positively charged amine groups on the polymer surface, which are known to improve the adsorption of adhesion-mediating molecules (e.g., fibronectin and vitronectin) from the serum of the culture medium (for a review, see [14]). The selectivity of the cell colonization also depended on the time of cultivation. During approximately the first four days of the culture, the adhered cells at the spots proliferated, and this enhanced the differences between the cell population densities on the spots and on the unmodified polymer surface. However, with prolonged time of cultivation (approx. one week and more), the cell clusters were not confined only to the modified spots but extended to the neighborhood. Similar cell behavior was observed with increasing cell seeding densities. The preferential growth of cells on the modified microdomains also depended on the cell type, being more apparent on HUVEC than on VSMC cells. VSMC often migrated out of the irradiated spots and tried to bridge the unmodified regions between these domains (FIG.1A,B) [8,13].

# Micropatterned surfaces created by successive plasma polymerization

On hydrophilic AA domains (advancing water contact angle of about 48ş), both endothelial CPAE cells and VSMC (FIG.1C) adhered and grew preferentially rather than on the hydrophobic OD domains (advancing contact angle of ~76ş). On day 1 and 7 after seeding, the percentage of both CPAE and VSMC cells on AA domains was about 85%. This difference decreased with time of cultivation, especially in VSMC, due to their migration and spanning the hydrophobic OD regions. Thus, on day 7 after seeding, the percentage of cells on the AA domains was about 74% for CPAE but only 63% for VSMC. Nevertheless, both cell types on AA domains were more mature, which was manifested by more apparent Weibel-Palade bodies containing von Willebrand



FIG.1. Vascular or bone-derived cells on micropatterned surfaces created by UV light-irradiation through a metallic mask for 20 min in an ammonia atmosphere (A,B), successive plasma polymerization of acrylic acid and octadiene (C,D) and deposition of fullerenes C60 through a metallic mask (E,F). A: Human umbilical vein endothelial cells, line EA.hy926, day 3 after seeding; B: Rat aortic smooth muscle cells, day 7 after seeding; C: Rat aortic smooth muscle cells, 6 hours after seeding; D: Immunofluorescence of von Willebrand factor in endothelial CPAE cells, day 3 after seeding; E, F: Human osteoblast-like MG 63 cells on surfaces patterned with fullerene C60 prominences of 1043±57nm in height, day 7 after seeding (E), or on binary C60/Ti films with prominences of 351±18nm in height, day 3 after seeding (F).

factor in endothelial CPAE cells (Fig. 1D) and better developed alpha-actin-containing filaments in VSMC. In addition, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) revealed that the concentration of alpha-actin per mg of protein was significantly higher in VSMC on AA strips [9]. Similarly, also in studies by other authors, the maturity, function and resistance of endothelial cells against shear stress were enhanced on micropatterned surfaces [15,16].

#### Micropatterned surfaces created by deposition of fullerenes and metal-fullerene composites

Depending on the temperature and the time of deposition, fullerenes formed bulge-like prominences of various heights. When seeded with human osteoblast-like MG 63 cells, the surfaces with lower prominences (up to  $326\pm5$ nm) were almost homogeneously covered with cells, whereas on the surfaces with the highest prominences of  $1090\pm8$  nm, the cells adhered and grew preferentially in the grooves among the prominences (FIG.1 E, F), and this selectivity increased with time of cultivation. Although these grooves occupied only approximately 41 % of the surface, they contained from 80% to 98% of the cells, and the cell population density in the grooves was about 5 to 57 times higher than on the bulges [10]. This cell behaviour may be due to a synergetic action of hydrophobia and other physicochemical properties of the fullerene bulges less appropriate for cell adhesion, such



FIG.2. Rat aortic smooth muscle cells (A) and human osteoblast-like MG 63 cells (B) on surfaces nanopatterned by tethering GRGDS adhesion oligopeptides through PEO chains (A) or deposition of nanocrystalline diamond (B). Immunofluorescence of vinculin (A) and talin (B), day 3 after seeding.

as their steep rise and the tendency of spherical ball-like fullerene C60 molecules to diffuse out of the prominences towards the grooves [10]. Preferential growth of MG 63 cells in the grooves among the prominences was also observed on microstructured hybrid Ti/C60 films, as well as pure Ti films [11].

# Nanopatterned surfaces created by functionalization with ligands for cell adhesion receptors

On PDLLA surfaces, the adhesion and growth of VSMC was similar as on standard cell culture polystyrene or microscopic glass coverslips. However, the copolymer PDLLA-b-PEO almost completely inhibited the adhesion, spreading and growth of cells. This behavior was due to the high hydrophilicity and mobility of the PEO chains, which disabled the adsorption of cell adhesion-mediating proteins from the serum of the culture medium (e.g., fibronectin, vitronectin). However, functionalization of PEO chains with the GRGDSG oligopeptide almost completely restored the cell adhesion. The cell spreading areas on these surfaces reached average values of 991µm<sup>2</sup> compared to 958µm<sup>2</sup> for PDLLA. In addition, the cells on GRGDSG-grafted copolymers were able to form vinculin-containing focal adhesion plaques (FIG.2A), to synthesize DNA and even proliferate in a serum-free medium, which indicates specific binding to the GRGDSG sequences through their adhesion receptors [7].

# Nanopatterned surfaces created by deposition of nanocrystalline diamond (NCD)

On NCD films (rms roughness of 8.2nm), the osteoblastlike MG 63 cells adhered and grew better than on conventional flat tissue culture polystyrene surfaces. The cells on NCD surfaces were better spread, i.e. adhering by a larger cell-material contact area, and formed well-apparent focal adhesion plaques containing talin and vinculin, i.e. proteins associated with integrin adhesion receptors on cells (Fig. 2B). As revealed by ELISA, these cells also contained a higher concentration of vinculin, measured per mg of protein. In addition, the cells on NCD films usually reached higher population densities than those on standard cell culture polystyrene dishes, and were metabolically more active, as demonstrated by the XTT test [12,17-19]. The beneficial effect of surfaces with nanoscale roughness on cell adhesion and growth has been explained by the adsorption of cell adhesion mediating molecules in an appropriate geometrical conformation, enabling good accessibility of active sites in these molecules to the cell adhesion receptors [20].

## Conclusion

All types of micropatterned surfaces created in this study promoted regionally-selective adhesion, growth and

phenotypic maturation of vascular and bone-derived cells. Nanopatterned surfaces provided good support for the adhesion, spreading, growth and metabolic activity of these cells. All these surfaces could be useful for tissue engineering, construction of cell arrays and biosensors.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (grants No. 1QS500110564, KAN400480701, KAN101120701, IAAX00100902) and the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 305/08/0108). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript. We also thank Mrs. Vera Lisa and Mrs. Ivana Zajanova (Inst. Physiol., Acad. Sci. CR, Prague) for their excellent technical assistance in cell culturing and immunocytochemical techniques.

## References

[1] Britland S., Perez-Arnaud E., Clark P., McGinn B., Connolly P., Moores G.: Biotechnol. Prog. 8: 155-160, 1992.

- [2] Falconnet D., Csucs G., Grandin H.M., Textor M.: Biomaterials 27: 3044-3063, 2006.
- [3] Matsuda T., Inoue K., Sugawara T.: ASAIO Trans. 36: M559-M562, 1990.

[4] Huang S., Chen C.S., Ingber D.E.: Mol. Biol. Cell 9: 3179-3193, 1998.

[5] Moon J.J., Hahn M.S., Kim I., Nsiah B.A., West J.L. Tissue Eng. Part A. 15: 579-585, 2009.

[6] Biggs M.J., Richards R.G., Gadegaard N., Wilkinson C.D., Dalby M.J.: J. Orthop. Res. 25: 273-282, 2007.

[7] Bacakova L., Filova E., Kubies D., Machova L., Proks V., Malinova V., Lisa V., Rypacek F.: J. Mater. Sci. Mater. Med. 18: 1317-1323, 2007.

[8] Mikulikova R., Moritz S., Gumpenberger T., Olbrich M., Romanin C., Bacakova L., Svorcik V., Heitz J.: Biomaterials 26: 5572-5580, 2005.

[9] Filova E., Bullett N.A., Bacakova L., Grausova L., Haycock J.W., Hlucilova J., Klíma J., Shard A.: Physiol. Res. 2008 Nov 4. [Epub ahead of print], PMID: 19093722.

[10] Grausova L., Vacik J., Bilkova P., Vorlicek V., Svorcik V., Soukup D., Bacakova M., Lisa V., Bacakova L.: J. Optoelectron. Adv. Mater., 10: 2071-2076, 2008a.

[11] Vandrovcova M., Vacik J., Svorcik V., Slepicka P., Kasalkova N., Vorlicek V., Lavrentiev V., Vosecek V., Grausova L., Lisa V., Bacakova L. Phys. Stat. Sol. (a), 205: 2252-2261, 2008.

[12] Bacakova L., Grausova L., Vacik J., Fraczek A., Blazewicz S., Kromka A., Vanecek M., Svorcik, V.: Diamond Relat. Mater., 16: 2133-2140, 2007.

[13] Parizek M., Bacakova L., Lisa V., Kubova O., Svorcik V., Heitz J.: Engineering of Biomaterials 9(58-60): 7-10, 2006.

[14] Bacakova L., Filova E., Rypacek F., Svorcik V., Stary V.: Physiol. Res. 53 [Suppl. 1]: S35-S45, 2004.

[15] Yamamoto S., Tanaka M., Sunami H., Ito E., Yamashita S., Morita Y., Shimomura M.: Langmuir 23: 8114-8120, 2007.

[16] Daxini S.C., Nichol J.W., Sieminski A.L., Smith G., Gooch K.J., Shastri V.P.: Biorheology 43: 45-55, 2006.

[17] Grausova L., Kromka A., Bacakova L., Potocky S., Vanecek M., Lisa V.: Diamond Relat. Mater., 17: 1405–1409, 2008b.

[18] Grausova L., Bacakova L., Kromka A., Potocky S., Vanecek M., Nesladek M., Lisa V: J. Nanosci. Nanotechnol., 9: 3524-3534, 2009.

[19] Grausova L., Vacik J., Vorlicek V., Svorcik V., Slepicka P., Bilkova P., Vandrovcova M., Lisa V., Bacakova L.: Diamond Relat. Mater., 18: 578–586, 2009.

[20] Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R. J.: Biomed. Mater. Res. 51: 475-483, 2000.

## VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON BIOFUNCTIONALIZED CELLULOSE-BASED SCAFFOLDS

Katarina Novotna<sup>1\*</sup>, Lucie Bacakova<sup>1</sup>, Vera Lisa<sup>1</sup>, Pavel Havelka<sup>2</sup>, Tomas Sopuch<sup>3</sup>, Jan Klepetar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,

Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Prague 4 – Krc, Czech Republic; <sup>2</sup>VUOS a.s., Rybitvi 296, 533 54 Rybitvi, Czech Republic; <sup>3</sup>Synthesia a.s., Czech Republic, SBU Nitroceluloza, Pardubice 103, 532 17 Pardubice – Semtin, Czech Republic; \*MAILTO: K.NOVOTNA@BIOMED.CAS.CZ

## Abstract

Viscose, dialdehyde cellulose and oxidized 6-carboxycellulose with 2.1 or 6.6wt.% of -COOH groups were prepared. The materials were subsequently functionalized with arginine or chitosan. Both unmodified and biofunctionalized materials were seeded with vascular smooth muscle cells. The morphology of the adhered cells indicated that oxidized 6-carboxycellulose with 2.1% content of -COOH groups was the most appropriate of all tested materials for potential use in tissue engineering. The shape of the cells on this material was elongated, which demonstrates adequate adhesion and viability of the cells, while the morphology of the cells on other tested materials was spherical. Moreover, the stability of 6-carboxycellulose with 2.1wt.% of -COOH groups in the cell culture environment was optimal, with a tendency to degrade slowly with time. The highest stability was found on the viscose samples, whereas there was very low stability on oxidized 6-carboxycellulose with 6.6 wt. % of -COOH groups, and also on dialdehyde cellulose. Functionalization with arginine or chitosan increased the number of adhered cells on the materials, but not markedly. We did not obtain a significant elevation of the cell population densities with time on the tested samples. These results suggest the possibility of using a cellulose-based material in such tissue engineering applications, where high proliferation activity of cells is not convenient, e.g. reconstruction of the smooth muscle cell layer in bioartificial vascular replacements.

**Key words:** oxidized cellulose, tissue engineering, biofunctionalization, chitosan, arginine, vascular smooth muscle cells

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 21-24]

## Introduction

Cellulose, composed of glucose monomers, is a polysaccharide commonly occurring in nature. Oxycellulose is cellulose oxidized by oxidizing agents, such as  $NO_2$  or  $NaCIO_2$ , which induce conversion of the glucose residues to glucuronic acid residues, i.e. compounds containing –COOH groups [1]. The concentration of these groups modulates the pH, swelling in a water environment, degradation time, drug loading efficiency and other behavior of the material [2]. In addition, –COOH groups, which are polar and negatively charged, can be used for functionalizing the oxidized cellulose with various biomolecules. Oxidized cellulose has been widely used for many years as a wound-healing material due to its excellent properties, such as high absorbability, antibacterial and antiviral activity, non-toxicity and effects that prevent the formation of tissue adhesion after surgery [3-6]. Due to its ability to initiate or accelerate blood coagulation at the site where it is applied, oxidized cellulose has been used as a hemostatic material [7]. This material is also promising as a carrier for controlled drug delivery [2]. The possible use of various types and modifications of cellulose-based materials in tissue engineering is under extensive scientific research [8-10]. For example, cellulose fabrics [8] and injectable cellulose-based hydrogels [9] have been successfully tested as carriers for chondrocytes for cartilage regeneration in vitro and in vivo.

In this study, we have investigated the adhesion, growth and morphology of vascular smooth muscle cells on various types of cellulose materials for potential use in soft tissue engineering. Four basic groups of materials were prepared: primal viscose (VIS), oxidized 6-carboxycellulose with 2.1wt.% of –COOH groups (2.1), oxidized 6-carboxycellulose with 6.6% of –COOH groups (6.6) and dialdehyde cellulose from cotton knitting (DAC). The samples were further functionalized with arginine or chitosan. Positively-charged amine groups in these biomolecules were expected to support the adsorption of cell adhesion-mediating molecules and cell adhesion. At the same time, amino acids with the basic side chain (lysin, arginin), as well as chitosan, were expected to balance the relatively acid character of oxidized cellulose molecules [11].

## Material and methods

#### Preparation of biofunctionalized scaffolds

Cellulose-based materials (listed above) in the form of woven fibrous scaffolds were exposed to solutions of arginine or chitosan (USA, Sigma-Aldrich) for 2 hours at laboratory temperature (20°C). The quantities of particular substances used for preparation of the solutions are summarized in TABLE 1. The samples were then washed twice for 2 hours in isopropyl alcohol, and were air-dried. Dialdehyde cellulose from cotton knit functionalized with arginine could not be created because of its high tendency to disintegrate.

Prepared bio- functiona-lized material	Primal textile material [g]	Arginine or chitosan [g]	Acetic acid [ml]	Distilled H <sub>2</sub> O [ml]
VIS_arg	6 g	2 g Arg	0 ml	150 ml
VIS_chit	6 g	6 g Chit	2.5 ml	500 ml
2.1_arg	6 g	1.48 g Arg	0 ml	150 ml
2.1_chit	6 g	6 g Chit	2.5 ml	500 ml
6.6_arg	6 g	4.76 g Arg	0 ml	150 ml
6.6_chit	6 g	6 g Chit	2.5 ml	500 ml
DAC_chit	2.4 g	2.4 g Chit	1 ml	500 ml

TABLE 1. Quantity of ingredients in the arginine or chitosan solution used for functionalization of the primal materials.

#### Cells and culture conditions

The fibrous scaffolds were cut into square pieces (2x2 cm) and sterilized by UV light from both sides, 1 hour for each side. Earlier pre-experiments had shown that UV light sterilization is the most appropriate method for this kind of material, as sterilization in ethanol or by autoclaving have caused morphological, chemical and mechanical instability of samples. After sterilization, the samples were inserted into 12-well culture plates (well diameter 2.2cm; TPP, Switzerland) and fixed to the well bottoms with plastic rings to avoid flotation of the sample. Then they were seeded with vascular smooth muscle cells (VSMC), derived from the complex of the tunica intima and media of the rat thoracic aorta by an explantation method. The cells were used in passage 4 and in a density of 60,000 cells/well (i.e., about 21,000 cells/cm<sup>2</sup>). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, U.S.A., Cat. No D5648; 3 ml/well), supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS; Sebak GmbH, Aidenbach, Germany) and gentamicin (40µg/ml, LEK, Ljubljana, Slovenia), at 370 C in a humidified atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub> in the air. Materials with 6.6wt.% of -COOH groups, especially those non-modified with arginine and chitosan, caused an excessive decrease in the pH of the culture medium, as indicated by the phenol red pH indicator contained in the medium, which changed the colour of the medium from pink to yellow as early as 3 hours after seeding. The medium on these samples was therefore replaced by fresh medium, and after replacing it the same effect did not recur.

On the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day after seeding, the cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich), detached from the materials by a trypsin-EDTA solution (Sigma, U.S.A., Cat. Nº T4174) and counted using a Burker haemocytometer. For each time interval and experimental group, two independent samples were used, and another parallel group of samples was used for evaluating the cell morphology. For visualization, the cells were fixed with 70% cold ethanol (-20°C, 5-10 min) and stained with a combination of the following fluorescence dyes: the cell membrane and cytoplasm was stained with Texas Red C<sub>2</sub>-maleimide (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. No. T6008; 20ng/ml PBS), and the cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.; 5µg/ml PBS) for 1 hour at room temperature. Digital pictures of the cells were taken using a conventional fluorescence microscope (Olympus IX 50, Japan) and a confocal microscope (DM 2500, Leica, Germany).

## Statistical analysis

The quantitative data was presented as mean ± SEM (Standard Error of Mean) from 36 measurements. Multiple comparison procedures were performed by the One Way Analysis of Variance (ANOVA), Student-Newman-Keuls method, using SigmaStat software (Jandel Corp. U.S.A.). P values equal to or less than 0.05 were considered significant.

## **Results and discussion**

FIGURE 1 presents the number of cells on the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day after seeding on various tested scaffolds. As can be seen, on day 2 after seeding, the highest number of cells was found on viscose modified with arginine. Functionalization with arginine also had a beneficial effect on cell colonization in oxidized 6-carboxycellulose with 2.1wt.% or 6.6wt.% of –COOH groups, where the highest number of cells was detected on day 4. Cell colonization was also improved by modifying the cellulosic materials with chitosan. On day 7,



FIG.1. Number of rat aortic smooth muscle cells on days 2, 4 or 7 after seeding on various types of cellulose-based



materials: primal viscose (VIS), viscose functionalized with arginine or chitosan (VIS\_arg; VIS\_chit), dialdehyde cellulose (DAC), dialdehyde cellulose functionalized with chitosan (DAC\_chit), oxidized 6-carboxycellulose with 2.1wt.% of -COOH groups (2.1), oxidized 6-carboxycellulose with 2.1wt.% of -COOH groups functionalized with arginine or chitosan (2.1\_arg; 2.1\_chit ), oxidized 6-carboxycellulose with 6.6 wt.% of -COOH groups (6.6), oxidized 6-carboxycellulose with 6.6wt.% of -COOH groups functionalized with arginine or chitosan (6.6\_arg; 6.6\_chit). Mean ± SEM from 36 measurements from 2 independent samples for each experimental group. ANOVA, Student-Newman-Keuls method applied for multiple comparisons. Statistical significance (p≤0.05) in comparison with other experimental groups is indicated by the names of these groups above the columns.



FIG.2. Morphology of rat vascular smooth muscle cells (arrows) on day 4 after seeding (DM 2500, Leica, Germany).

BI MATERIALS

the highest cell population densities were obtained on DAC and 6-carboxycellulose with 6.6wt% of –COOH groups, both combined with chitosan. On the latter material with chitosan, the cell number was about twice higher than on non-modified 6-carboxycellulose with 6.6wt.% of –COOH groups.

Thus, as expected, the number of adhering cells and their subsequent growth were improved after functionalization of the materials with arginine or chitosan, although relatively slightly. This phenomenon can be attributed to the presence of positively-charged amine groups in these biomolecules. Positively-charged groups have been reported to support the adsorption of cell adhesion-mediating molecules (e.g., vitronectin, fibronectin) from the serum of the culture medium in appropriate geometrical conformations, which increase the exposure and accessibility of the active sites on these molecules, e.g. specific amino acid sequences like RGD, to cell adhesion receptors, e.g. integrins [12]. In addition, the basic character of arginine and chitosan molecules at least partly compensated the acidity of 6-carboxycellulose with 6.6wt.% of -COOH groups, which is a common problem of oxidized cellulose [11].

In addition, a significant contrast was found in the cell morphology, where oxidized 6-carboxycellulose with 2.1wt.% of -COOH groups (unmodified and functionalized with Arg or chitosan) appeared to be the most convenient material for cell adhesion, as the shape of the cells was elongated here. The morphology of the cells on other samples was spherical, which suggests weak spreading and adhesion of cells, and thus lower viability (FIG.2). The most appropriate shape that vascular smooth muscle cells can assume for proliferation is polygonal. For example, in cultures of VSMC obtained from the aorta of neonatal rats, the intensively proliferating cells were large, polygonal in shape and well spread, while the slowly growing cells were generally spindle-shaped and not well spread [13]. In our experiments, the VSMC on the tested materials could not acquire a polygonal morphology due to the knitted design of the materials, where the cells were guided to be arranged along the fibers in the scaffolds. This was probably a reason for their weak proliferation and for the only small increase in the cell population densities with time (i.e. from about 2000-5000 cells/cm<sup>2</sup> on day 2 to 2000-7000 cells/cm<sup>2</sup> on days 4 and 6, FIG.1), together with the acidic character of the cellulose materials and also their tendency to swell and degrade.

Higher oxidation of cellulose led not only to higher acidity, but also to lower stability of this material in the cell culture environment. The content of 6.6wt.% of -COOH groups appeared to be too high from this point of view, as these samples disintegrated in the culture medium after simple handling (e.g. washing in PBS, replacing them in another dish, staining, etc.) In addition, the stability of dialdehyde cellulose proved to be very low, probably because of the specific arrangement of the fibers in its fabric, which resembled a loose network, while in oxidized cellulose or viscose the fibers were densely packed in thick rope-like bundles. The highest stability was observed in the viscose materials, which allowed almost no tendency to degrade. The stability of oxidized cellulose with 2.1wt.% of -COOH was high enough, as it did not disintegrate during sample handling, and its degradation in the cell culture system was relatively slow in comparison with oxycellulose with 6.6wt.% of -COOH and dialdehyde cellulose.

## Conclusion

The results obtained in this study indicate that oxidized cellulose with 2.1wt.% of –COOH groups could be an appropriate material for tissue engineering, due to its relatively

high stability during handling and exposure to the cell culture environment, and particularly its biocompatibility, which can be further improved by modification with biomolecules, e.g. arginine. As this material induces spreading but no considerable proliferation of cells, it could be used in constructing bioartificial tissues or organs where high proliferation activity of cells is not desired, for example in replacements for blood vessels, where high growth of cells on the material or total bioinertness of the material may cause stenosis or other non-physiological behavior of the vascular prosthesis [14,15].

#### Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Industry and Trade of the CR (grant No. 2A-1TP1/073) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the CR (Grant No. 2B06173). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.

## References

[1] Saito T., Kimura S., Nishiyama Y., Isogai A.: Biomacromolecules 8: 2485-2491, 2007.

[2] Zhu L., Kumar V., Banker G. S.: AAPS PharmSciTech 5: e69, 2004.

[3] Mueller P. O., Harmon B. G., Hay W. P., Amoroso L. M.: Am. J. Vet. Res. 61: 369-374, 2000.

[4] Bassetto F., Vindigni V., Scarpa C., Botti C., Botti G.: Aesthetic Plast. Surg. 32: 807-809, 2008.

[5] Petrulyte S.: Dan. Med. Bull. 55: 72-77, 2008.

[6] Vytrasova J., Tylsova A., Brozkova I., Cervenka L., Pejchalova M., Havelka P.: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35: 1247-1252, 2008.

[7] Masova L, Rysava J, Krizova P, Suttnar J, Salaj P, Dyr JE, Homola J, Dostalek J, Myska K, Pecka M.: Sb. Lek. 104: 231-236, 2003.

[8] Vinatier C., Gauthier O., Fatimi A., Merceron C., Masson M., Moreau A., Moreau F., Fellah B., Weiss P., Guicheux J.: Biotechnol Bioeng. 102: 1259-67, 2009.

[9] Müller F. A., Müller L., Hofmann I., Greil P., Wenzel M. M., Staudenmaier R.: Biomaterials 27: 3955-63, 2006.

[10] Pajulo Q., Viljanto J., Lönnberg B., Hurme T., Lönnqvist K., Saukko P.: J. Biomed. Mater. Res. 32: 439-46, 1996.

[11] Nagamatsu M., Podratz J., Windebank A. J., Low P. A.: J Neurol. Sci. 146: 97-102, 1997.

[12] Liu L., Chen S., Giachelli C. M., Ratner B. D., Jiang S.: J. Biomed. Mater. Res. A 74: 23-31, 2005.

[13] Tukaj C., Bohdanowicz J., Kubasik-Juraniec J.: Folia Morphol. (Warsz). 61: 191-198, 2002.

[14] Mol A., Rubbens M. P., Stekelenburg M., Baaijens F. P.: Recent Pat. Biotechnol. 2: 1-9, 2008.

.....

[15] Shinoka T., Breuer C.: Yale J. Biol. Med. 81: 161-6, 2008.

. . . . . . . .

## VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON LOW DENSITY POLYETHYLENE MODIFIED WITH PLASMA DISCHARGE AND BIOFUNCTIONALIZATION

Martin Parizek<sup>1\*</sup>, Nikola Kasalkova<sup>2</sup>, Lucie Bacakova<sup>1</sup>, Katerina Kolarova<sup>2</sup>, Vera Lisa<sup>1</sup>, Vaclav Svorcik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACAD. SCI. CR, VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC <sup>2</sup>INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY, TECHNICKA 5, 166 28 PRAGUE 6 – DEJVICE \*MAILTO: PARIZEK.M@SEZNAM.CZ

## Abstract

Low density polyethylene (LDPE) was modified by an Ar plasma discharge and then grafted with glycine (Gly), bovine serum albumin (BSA) or polyethylene glykol (PEG). Some plasma-treated samples and samples grafted with BSA were exposed to a suspension of colloidal carbon particles (C, BSA+C). Pristine LDPE and tissue culture polystyrene dishes (PSC) were used as control samples. The materials were seeded with rat aortic smooth muscle cells and incubated in a medium DMEM with 10% of fetal bovine serum.

On day 1 after seeding, the cells on LDPE modified with plasma only, Gly, BSA and BSA+C adhered in similar numbers as on PSC, while the values on nonmodified and PEG-modified samples were significantly lower. On day 5, the highest cell numbers were found again on LDPE with Gly, BSA and BSA+C. On day 7, the highest number of cells was found on LDPE modified only with plasma. The latter cells also displayed the largest cell spreading area. The increased cell colonization was probably due to the formation of oxygen-containing chemical functional groups after plasma irradiation, and also due to positive effects of grafted Gly, BSA and BSA in combination with colloidal C particles.

**Key words:** Ar plasma discharge, biomaterials, low density polyethylene, cell adhesion, cell proliferation, grafting, tissue engineering, vascular smooth muscle cells.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 25-28]

## Introduction

Synthetic polymers, such as polyethylene, polystyrene, polyurethane, polytetrafluoroethylene and polyethylene terephthalate, are commonly used in various industrial applications, as well as in biology and medicine. They not only serve as growth supports for cell cultures in vitro, but can also be used for constructing replacements for various tissues or organs, e.g., non-resorbable or semi-resorbable vascular prostheses, artificial heart valves, bone and joint replacements, and implants for plastic surgery (for a review, see [1-3]).

There are two approaches to the application of these materials. The first approach uses highly hydrophobic or extremely hydrophilic surfaces, which do not allow adhesion and growth of cells. This approach is used for creating bioinert blood vessel replacements, where permanent blood flow is necessary, and thus the adhesion of thrombocytes or immunocompetent cells is not desirable, due to the risk of restenosis of the graft (for a review see [2]). An alternative approach, widely accepted in recent tissue engineering, is to create surfaces that support colonization with cells and good integration of the replacement with the surrounding tissues of the patient's organism. This concept is used e.g. for constructing bone prostheses that will persist in the patient's organism for many years, and is being developed for creating bioartificial replacements of blood vessels, parenchymatous organs and even nervous tissue (for a review see [2,3]).

There are various ways of modifying the surfaces of materials to make them convenient for cell adhesion. For this purpose, surfaces have been exposed to ultraviolet (UV) irradiation [4], to a beam of various ions (e.g., oxygen, nitrogen, noble gases or halogens for biological applications [1-3]) or to a plasma discharge [5-7]. For more pronounced changes in the physicochemical properties of the modified surface, some of these processes can be realised in a gas atmosphere, e.g. in acetylene or ammonia [4]. The goal of these irradiation modifications is to create functional chemical groups containing oxygen or nitrogen, like carbonyl, carboxyl or amine groups, on the surface of the material. These groups increase the surface wettability, support the adsorption of cell adhesion-mediating extracellular matrix proteins and stimulate cell adhesion and growth [1-4].

An alternative and more exact approach can involve grafting the polymer surfaces directly with various biomolecules, which can influence the cell behavior in a more controllable manner. Therefore, in this study, low-density polyethylene, i.e. a material promising for biomedical use, was modified by an Ar plasma discharge and subsequent grafting with glycine (Gly), bovine serum albumin (BSA), polyethylene glycol (PEG) and/or colloidal carbon particles (C). On the modified polymer, we evaluated the adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures isolated from rat aorta.

## **Experimental**

#### Preparation of the polymer samples.

The experiments were carried out on low-density polyethylene foils (LDPE) of the Granoten S\*H type (thickness 0.04mm, density 0.922g-cm<sup>-3</sup>, melt flow index 0.8g/10minutes), purchased from Granitol a.s., Moravsky Beroun, Czech Republic. The foils were modified by an Art plasma discharge (gas purity: 99.997%) using a Balzers SCD 050 device. The time of exposure was 50 seconds, and the discharge power was 1.7W. Immediately after plasma modification, the samples were immersed in water solutions of glycine (Gly; Merck, Darmstadt, Germany, product No. 104201), bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Germany, product No. A9418) or polyethyleneglycol (PEG; Merck, Darmstadt, Germany, product No. 817018, m.w. 20 000). Some plasma-treated samples and samples grafted with BSA were exposed to a suspension of colloidal carbon particles (C; Spezial Schwartz 4, Degussa AG, Germany) [8]. Each substance was used in a concentration of 2wt.%, and the time of immersion was 12 hours at room temperature.

#### Cells and culture conditions.

The modified materials were cut into square samples 10-10mm in size, sterilized with 70% ethanol for 1 hour, inserted into 24-well plates (TPP, Switzerland; well diameter 1.5cm) and seeded with smooth muscle cells derived from rat aorta by an explantation method [2,3]. The cells were used in passage 3 and seeded in a density of 17 000cm.

25

BI MATERIAL
The cells were cultivated in 1.5 ml of Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (Sigma, U.S.A.) supplemented with 10% foetal bovine serum (Sebak GmbH, Aidenbach, Germany) for 1, 2, 5 or 7 days (temperature of 37°C, humidified atmosphere of 5% of  $CO_2$  in the air). For each experimental group and time interval, four samples were used. The cells on one sample were rinsed in phosphatebuffered saline (PBS), fixed by 70% cold ethanol (-20°C) and stained with a combination of fluorescent membrane dye Texas Red C2-maleimide (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. No. T6008; 20ng/ml PBS) and a nuclear dye Hoechst # 33342 (Sigma, U.S.A.; 5µg/ml PBS). The number and the morphology of the cells on the sample surface were then evaluated on pictures taken under an Olympus IX 50 microscope, using an Olympus DP 70 digital camera. On the remaining three samples, the cells were rinsed with PBS, released with a trypsin-EDTA solution (Sigma, Cat. No. T4174) and counted in a Cell Viability Analyzer (Vi-CELL XR, Beckman Coulter). Non-modified LDPE and standard tissue culture polystyrene dishes (PSC) were used as control materials.

#### Statistics.

The results were presented as mean ± SEM (Standard

Error of Mean). The statistical significance was evaluated by the ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Values  $p \le 0.05$  were considered as significant.

#### **Results and discussion**

On the first day after seeding, the highest average number of initially adhered cells was observed on the PSC (17,096±3,034cells/cm<sup>2</sup>). On the LDPE samples modified with plasma, and also on the plasma-modified samples grafted with BSA, BSA+C or Gly, the cell numbers ranged from 10,475±1,028cells/cm<sup>2</sup> to 10,951±1,027cells/cm<sup>2</sup>. As revealed by ANOVA, these values were not statistically different from those obtained on PSC. In contrast, the cell population densities on pure LDPE and LDPE modified with PEG and C reached only 4,769±1,400cells/cm<sup>2</sup> and 9,048±388cells/cm<sup>2</sup>, respectively, and these values were significantly lower than those on PSC (FIG.1). This relatively low initial cell adhesion can be explained by an antiadhesive action of PEG, based on its high hydrophilia and the mobility of its chain, which hamper stable adsorption of the cell adhesion-mediating proteins from the serum of the culture medium, mainly vitronectin and fibronectin (for a review, see [9]). Also carbon-modified surfaces, particularly those made



FIG.1. Number of rat aortic smooth muscle cells on day 1, 2, 5 and 7 after seeding on pure LDPE, LDPE modified by Ar plasma discharge (Plasma) and subsequently grafted with bovine serum albumin (BSA), colloidal carbon particles (C), BSA with subsequent exposure to colloidal carbon particles (BSA+C), glycine (Gly) or polyethylene glycol (PEG). A standard cell culture polystyrene dish (PSC) was used as a reference material. Mean ± SEM from 3 independent samples for each experimental group. ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Statistical significance: PS, pLDPE: p≤0.05 compared to the values on pure LDPE and polystyrene dishes.



FIG.2. Morphology of vascular smooth muscle cells on day 1 after seeding on pure LDPE (A), LDPE modified by Ar plasma discharge and subsequently grafted with bovine serum albumin (C), colloidal carbon particles (D), bovine serum albumin and colloidal carbon particles (E), glycine (F) or polyethylene glycol (G). H: cells on a polystyrene culture dish. Stained with Texas Red C2-maleimide and Hoechst #33342. Microscope Olympus IX 50, obj. 20, digital camera DP 70. Bar=200µm.

of amorphous hydrogenated carbon, have often behaved as rather bioinert and do not enhance cell adhesion. They have therefore been used for constructing blood-contacting and hemocompatible devices (for a review, see [10]).

On the second day of the experiment, the cell numbers on all tested samples became similar, although the highest average number of cells still persisted on the polystyrene culture dishes ( $22,670\pm2,234$  cells/cm<sup>2</sup>), and the lowest average cell population density was found again on PEG ( $10,000\pm1,779$  cells/cm<sup>2</sup>)

On day five after seeding, the highest numbers of cells were again obtained on PSC (100,741±10,926cells/cm<sup>2</sup>), and similarly as on day 1, also on samples grafted with BSA (77,534±6,463cells/cm<sup>2</sup>), Gly (77,058±4,200cells/cm<sup>2</sup>) and BSA+C (73,253±14,462cells/cm<sup>2</sup>). On these samples, the cell numbers were significantly higher in comparison with the value on pure LDPE (35,682±7,757cells/cm<sup>2</sup>). In the case of BSA, this result is somewhat surprising, because, like PEG, this protein has been used for constructing surfaces that are non-adhesive for cells (for a review, see [9]). On the other hand, BSA has been reported to promote the adsorption of cell adhesion-mediating molecules in advantageous spatial conformations, supporting the accessibility of specific sites on these molecules (e.g., RGD-containing amino acid sequences) by cell adhesion receptors, such as integrins [11].

As for the beneficial action of glycine on cell adhesion, this molecule enriches the polymer surface with additional polar oxygen-containing groups and positively electrically charged amine groups, which also improve the adsorption of cell adhesion-mediating proteins in appropriate geometrical conformations for binding to cell adhesion receptors [12].

Seven days after seeding, the cell number on plasma-modified LDPE (78,960±4,479cells/cm<sup>2</sup>) became significantly higher than the cell number on pure LDPE (16,658±5,600cells/cm<sup>2</sup>). However, the cell population densities on all tested LDPE samples were significantly lower than on standard polystyrene cell culture dishes (16,6691±6,891µm<sub>.</sub>). Nevertheless, the cells on all modified LDPE samples were able to form confluent layers.

In addition, the cells on the modified LDPE samples were usually better spread. The largest cell adhesion area (2,490±270µm), measured on day 1 after seeding, was found on plasma-irradiated LDPE, and was significantly larger compared to all remaining experimental groups,

where the cell spreading areas ranged from 1,739±110  $\mu$ m<sub>c</sub> (on pure LDPE) to 1,949±280 $\mu$ m<sub>c</sub> (on PSC). The cell spreading area on pure LDPE was significantly the smallest of the values obtained on all tested samples. The cells on all samples were mainly polygonal in shape, and this was more pronounced on the modified samples than on the unmodified LDPE samples (FIG.2).

The improved cell adhesion and growth of cells on samples modified by plasma discharge was most probably due to the creation of oxygen-containing functional groups on the polymer surface. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy has indicated the presence of peroxide, ester, carbonyl, carboxyl, hydroxyl and amide groups and excessive double bonds in polyethylene modified with a plasma discharge [13]. Oxygen-containing groups are known to increase the surface wettability and improve the adsorption of cell adhesion-mediating extracellular matrix molecules from the serum of the culture medium in an appropriate amount, flexibility and spatial conformation, enabling good accessibility of specific sites on these molecules for cell adhesion receptors [1-3].

#### Conclusion

Treating low-density polyethylene with an Ar plasma discharge had positive effects on the adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on this material. This improvement of the cell colonization was probably due to the formation of oxidized structures in the polyethylene surface layer and increased material wettability. The attractiveness of the material for cell colonization was further intensified by grafting the polymer surface with glycine, bovine serum albumin and bovine serum albumin with colloidal carbon particles. However, the exact mechanisms of the positive influence of these modifications on cell adhesion and growth need further investigation.

#### Acknowledgements

. . . . . . . . . .

This study was supported by the Acad. Sci. CR (Grants No. 1QS500110564 and KAN400480701). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.

#### References

[1]. Bacakova L., Svorcik V., Rybka V., Micek I., Hnatowitz V., Lisa V., Kocourek F.: Biomaterials 17: 1121-1126, 1996.

[2]. Bacakova L., Mares V., Bottone M.G., Pellicciari C., Lisa V., Svorcik V.: J. Biomed. Mater. Res. 49: 369-379, 2000.

[3]. Bacakova L., Walachova K., Svorcik V., Hnatowitz V.: J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 12: 817-834, 2001.

[4]. Svorcik V., Rockova K., Ratajova E., Heitz J., Huber N., Bäuerle D., Bacakova L., Dvorankova B., Hnatowitz V.: Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B 217: 307-313, 2004.

[5]. Turos A., Jagielski J., Piatkowska A., Bielinski D., Slusarski L., Madi N.K.: Vacuum, 70: 201-206, 2003.

6. Wang Y., Lu L., Zhang Y., Chen X.: J. Biomed. Mater. Res. A 76: 589-595, 2006.

[7]. Kasalkova N., Kolarova K., Bacakova L., Parizek M., Svorcik V.: Cell adhesion and proliferation on modified PE. Mater. Sci. Forum 567-568: 269-272, 2007. [8]. Van Amerongen A., Wichers J.H., Berendsen L.B.J.M., Timmermans A.J.M., Keizer G.D., Van Doorn A.W.J., Bantjes A., Van Gelder W.M.J.: J. Biotechnol. 30: 185-195, 1993.

[9]. Bacakova L., Filova E., Kubies D., Machova L., Proks V., Malinova V., Lisa V., Rypacek F.: J. Mater. Sci. Mater. Med. 18: 1317-1323, 2007.

[10]. Grinevich A., Bacakova L., Choukourov A., Boldyryeva H., Pihosh Y., Slavinska D., Noskova L., Skuciova M., Lisa V., Biederman H.: J. Biomed. Mater. Res. 88A: 952-966, 2009.

[11]. Koblinski J.E., Wu M., Demeler B., Jacob K., Kleinman H.K.: Matrix cell adhesion activation by non-adhesion proteins. J. Cell. Sci. 118: 2965-2974, 2005.

[12]. Liu L., Chen S., Giachelli C. M., Ratner B. D., Jiang S.: J. Biomed. Mater. Res. A 74: 23-31, 2005.

[13]. Svorcik V., Kolarova K., Slepicka P., Mackova A., Novotna M., Hnatowicz V.: Polym. Degr. Stab.91: 1219-1 225, 2006.

•••••

### COMPOSITE COLLAGEN-CALCIUM PHOSPHATE HYDROGELS FOR BONE SUBSTITUTION

T.E.L. DOUGLAS\*, C. GKIONI, J.A. JANSEN, S.C.G. LEEUWENBURGH

DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, RADBOUD UNIVERSITY MEDICAL CENTER NIJMEGEN, P.O. BOX 9101, 6500 HB NIJMEGEN, THE NETHERLANDS \*MAILTO:T.DOUGLAS@DENT.UMCN.NL

#### Abstract

Collagen is an interesting biomaterial for use as an injectable thermosenstive hydrogel whose gelation can be triggered after implantation by the patient's body temperature. Substances and particles can be incorporated during gel formation. For bone tissue engineering applications mineralizability of the collagen gel is desirable. One option is the incorporation of nanoparticles consisting of calcium phosphate (CaP) which should serve as nucleation sites for further mineralization. In this study, the feasibility of incorporating CaP particles in 3mg/ml collagen gels at CaP:collagen mass ratios of 4:1, 2:1 and 1:1 and their effect on the kinetics of gel formation and the gel mechanical properties were studied. Rheological studies confirmed that gels formed within 10 minutes and speed of formation was only slower at CaP:collagen = 4:1. Incorporation of CaP had no negative effect on gel mechanical strength. These results open the way for mineralization and biocompatibility studies. [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 28-29]

#### Introduction

Collagen is a biocompatible, biodegradable biomaterial which has been widely applied as a material in scaffolds for tissue engineering. Gels can be formed from acidic collagen solutions at 4°C by inducing fibrillogenesis through neutralization, adjustment of ionic strength and increase of temperature to 37°C. Thus collagen is an interesting material for use as an injectable thermosensitive hydrogel whose gelation can be triggered after implantation by the patient's body temperature. Indeed, collagen gels have been used as model systems to study the behavior of osteoblasts (1) in vitro, as drug delivery systems (2) and have been applied in the treatment of bone defects in vivo (3). Substances and particles can be incorporated during gel formation in order to alter the functional properties of the gel. For bone tissue engineering applications mineralizability of the collagen gel is desirable. One option to increase mineralizibility of hydrogels is functionalisation by incorporating nanoparticles consisting of calcium phosphate (CaP) which should serve as nucleation sites for further mineralization (4). In this study, the feasibility of incorporating CaP particles in 3g/ml collagen gels at CaP:collagen mass ratios of 4:1, 2:1 and 1:1 and their effect on the kinetics of gel formation and the gel mechanical properties were studied.

#### Materials and methods

Briefly, collagen I from rat tail was obtained from BD Biosciences, Netherlands. Gels were formed by neutralisation with 1M NaOH and addition of 10 x Phosphate Buffered Saline (PBS) and dilution with dd H<sub>2</sub>O to achieve a final collagen concentration of 3mg/ml with final effective PBS concentration of 0.5. Ingredients were mixed at 4°C. Fibrillogenesis was initiated by raising the temperature to 37°C. Calcium phosphate was formed in the following way: 1.47g Ca(OH)<sub>2</sub> in 9.105ml was reacted with 0.805ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> under agitation to yield 10ml 20% (w/v) Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH) solution, which was neutralised to pH 7.4. To form CaP-collagen composites,



FIGURE 1. Collagen hydrogels containing calcium phosphate (CaP) nanoparticles. CaP-collagen mass ratios from left to right: 4:1, 2:1, 1:, control without CaP).



# FIGURE 2. Time sweeps showing speed of collagen hydrogel formation at different CaP-collagen mass ratios.



FIGURE 3. Flow sweeps showing viscosity of collagen hydrogels at different CaP-collagen mass ratios as a function of shear stress.

CaP suspensions were added during gel formation instead of  $ddH_2O$ . Rheological characterisation of the speed of gel formation (time sweep) and the mechanical properties of the gel after formation (flow sweep) were carried out using a AR2000ex Rheometer (TA Instruments) at 37°C.

#### **Results and discussion**

It was possible to distribute CaP-particles at CaP:collagen mass ratios of 4:1, 2:1 and 1:1 (FIGURE 1) Time sweeps (FIGURE 2) showed no remarkable differences in the kinetics of gel formation between controls without CaP and CaP-collagen mass ratios of 2:1 and 1:1, however gel formation was slower at 4:1. Flow sweeps (FIGURE 3) showed similar patterns for controls and all CaP-collagen mass ratios. These results show that incorporation of CaP particles does not have a negative effect on gel mechanical properties.

#### Summary and future work

This work showed the feasibility of incorporating CaP particles into collagen hydrogels during gelation without adversely affecting the mechanical properties of the gel. Future work will concentrate on the effect of CaP incorporation on the ability of collagen gels to be mineralised and biocompatibility studies.

### Acknowledgements

The authors thank SenterNovem for financial support within the framework of the Self-Healing Materials program and H.Wang for assistance with rheomtery.

### References

Rattner A., Sabido O., Le J., Vico L., Massoubre C., Frey J., Chamson A. Calcif Tissue Int (2000) 66:35–42
 Wallace D.G, Rosenblatt J. Advanced Drug Delivery

Reviews 55 (2003) 1631– 1649 [3] Toung JS, Ogle RC, Morgan RF, Lindsey WH. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1999 Apr;125(4):451-5. [4] Leeuwenburgh S.C.G., Jansesn J.A., Mikos A.G., J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 18, No. 12, pp. 1547–1564 (2007)

### BLOOD PLATELETS APOPTOSIS IN HEMODIALYZED PATIENTS

A.Sobol<sup>1</sup>, M.Kaminska<sup>2</sup>, M.Walczynska<sup>2</sup>, M.Stasiak<sup>3</sup>, J.Szymanski<sup>3</sup>, M.Walkowiak<sup>2\*</sup>, B.Walkowiak<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>UNIVERSITY HOSPITAL NO. 1, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ,

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, LODZ, POLAND MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

#### Abstract

Blood platelet proteome of hemodialyzed uremic patients exhibits significant difference in comparison to the blood platelet proteome of healthy subjects. This alteration is manifested by the presence of high concentrations of low molecular peptides within the whole range of pl. Increased platelet apoptosis has been put forward as a possible cause of this phenomenon (1). The aim of the present research was to assess whether blood platelet populations from hemodialyzed uremic patients exhibit more binding sites for Annexin V (a marker of apoptosis) than control samples from healthy donors. Blood was obtained from uremic patients immediately before and after hemodialysis. At the same time samples from control healthy donors were also collected. Blood was anticoagulated with sodium citrate and was immediately exposed to propidium iodide,

fluorescent labeled Annexin V and CD61 antibodies. The samples were incubated for 10 minutes in the dark and next the labeled samples were processed in a BectonDickinson FACScan flow cytofluorymeter. Our preliminary study was performed for 12 hemodialyzed patients, 13 nondialyzed uremic patients and 12 controls. It was found that the blood platelet population of hemodialyzed patients exhibited significantly higher level of fluorescence intensity attributed to Annexin V. Furthermore, this intensity was comparable before and after hemodialysis and was independent on patient age. The results support the hypothesis that blood platelet contact with artificial surfaces during the process of hemodialysys may be partially responsible for triggering blood platelet apoptosis.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 29-30]

#### Acknowledgement

The work was supported by project No. N N401 227434.

#### References

[1]. Walkowiak B, Kaminska M, Okroj W, Tanski W, Sobol A, Zbrog Z. Przybyszewska-Doros I, "Blood platelet proteome is changed in uremic patients" Platelets, 2007; 18(5): 386-388.

#### •••••

### ENDOTHELIAL CELL PROTEOME CHANGED BY CONTACT WITH SURFACES OF BIOMATERIALS

P.Komorowski<sup>1</sup>, H.Jerczynska<sup>2</sup>, Z.Pawlowska<sup>2</sup>, M.Walkowiak<sup>1</sup>, B.Walkowiak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics, Technical University of Lodz, <sup>2</sup>Department of Molecular and Medical Biophysics, Medical University of Lodz, Poland MAILTO: piotr.komorowski@p.lodz.pl

#### Abstract

Biomaterials used for medical implants or instruments production can cause numerous undesirable effects in human organism. They may affect cells being in a direct contact with them and can cause changes in genes expression, and as a consequence, also in protein profile of these cells. The aim of the present work was to examine an effect of medical steel 316L, poly-para-xylylene (Parylene) and nanocrystalline diamond (NCD) surfaces on protein expression in human endothelial cell line EA.hy 926. Cells were grown in Dulbecco's MEM (DMEM) supplemented with antibiotics (penicillin and streptomycin), glucose, 10% heat inactivated fetal bovine serum and HAT-supplement. After 48h of incubation cells were washed with PBS and treated with lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 2 % IPG buffer pH 4-7, 1% DTT). Proteins were purified from cell lysates with 2-D CleanUp Kit, and concentration was assessed with 2D Quant Kit. After overnight rehydration of IEF strips (pH 4-7, 11cm), in the presence of purified proteins, isoelectric focusing procedure was performed until 40kVh. Then, stripes were equilibrated, and focused proteins were separated in 12,5% polyacrylamide gels (SDS PAGE). Silver stained gels were recorded with ImageScanner and analyzed with ImageMaster 2D Platinium 6.0 (GE Healthcare) software. Numerous changes in protein expression were detected in endothelial cells exposed to artificial surfaces of tested materials (see TABLE I).

[Engineering of Biomaterials, 89-92, (2009), 30]

Biomaterial	Total num- ber of detected spots	Number of matched spots	Number of over -expressed spots	Number of suppressed spots
Medical steel 316	301	187	45	66
Parylene	283	164	59	54
NCD	423	224	38	75
None (con- trol)	339	339	-	-

#### Acknowledgement

The project was supported by grant No. 05/WK/ P01/0001/SPB-PSS/2008.

•••••

### NANOSTRUCTURE OF BOVINE PERICARDIUM TREATED WITH TRYPSIN

ARTUR TUREK<sup>1\*</sup>, ANDRZEJ MARCINKOWSKI<sup>2</sup>, BARBARA TRZEBI-CKA<sup>2</sup>, BEATA CWALINA<sup>3</sup>, ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC, POLAND <sup>2</sup>CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCE, ZABRZE, POLAND <sup>3</sup>DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY, S ILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, GLIWICE, POLAND \*MAILTO: ATUREK@VIP.INTERIA.PL

#### Abstract

Various methods of xenogeneic tissues stabilization have been proposed for the purpose of preparing many tissue-derived biomaterials. One of the most important treatments that may lead to obtaining the good-quality tissue biomaterials seems to be decellularization of such tissues. This process may contribute to the reduction of the most frequent failures resulting from the tissues stabilization. The aim of this work was to determine nanostructure of trypsin-treated bovine pericardium, using atomic force microscopy (AFM). The treatment of bovine pericardium with trypsin in EDTA solution resulted in non significant changes in tissue's morphology. Demonstrated AFM studies of these tissues revealed no failures on the fibers' surface in the nanoscale. Thus, our results confirm the expectation that decellularization may be considered as one of the most promising methods of the allogeneic and xenogeneic tissues stabilization.

*Keywords:* nanostructure, bovine pericardium, collagen fibers, trypsin

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 30-32]

#### Introduction

Nowadays, various methods of xenogeneic tissues stabilization are proposed for the purpose of preparing many tissue-derived biomaterials [1-3]. One of commercial methods of tissues stabilization is the crosslinking of extracellular matrix by glutaraldehyde (GA) action [4,5]. However, GA is responsible for cytotoxic effect [6] and induction of calcification [7]. Moreover, a key role in the premature biodegradation of tissues stabilized in various ways is played by the cellular debris [7] and phospholipids [8]. Decellularization of xenogeneic tissues may contribute to reduction of these failures [9]. The tissue treatment with trypsin in EDTA solution belongs to the most often studied methods of the tissues decellularization [10-12]. However, some risk of connective fibers damage is possible. The aim of this work was to determine nanostructure of bovine pericardium after trypsin treatment, using atomic force microscopy (AFM).

#### Materials and methods

Bovine pericardium from hearts of 5–6 month old domestic cattle (Bos taurus) was obtained from the local abattoir and subsequently transported to the laboratory in buffered physiological saline solution (PBS; pH 6.5) at 4°C according to Simionescu and co-workers [13] procedure for the pericardium selection for bioprosthetic heart valves. Fatty tissue and sections with heavy vasculature were gently removed from prepared samples.

Tissue samples were modified by incubation under continuous shaking in the solution containing trypsin and EDTA (0.5% trypsin and 0.2% EDTA; Sigma), and PBS in the ratio 1:10, at 37°C for 48 hours. During this period, the digestion solution was changed twice [14].

The nanostructures of native and modified tissue samples were evaluated by AFM. AFM imaging was performed using MultiMode 3 (di-Veeco, CA) working in the tapping mode under atmospheric conditions. Two standard AFM signals were registered: the signal corresponding to the topography of the sample (Height) and the differential signal



FIG.1. AFM Deflection (A) and Height (B) images  $(1.0 \times 1.0 \mu m)$  of the native bovine pericardium; (C) represents an axial profile of the collagen fibril taken along the marked line in the Height image (B).





(Deflection), which is useful for direct observation. Before measurements, tissue samples were gently air-dried, at room temperature in the laminar flow box, until the excess of water had evaporated from the samples' surfaces [2]. All AFM images were processed using the software package WSxM (Nanotec Electronica, Spain) [15].

#### **Results and discussions**

FIGURE 1 shows the AFM Deflection (FIG.1A) and Height (FIG.1B) images of native structure of bovine pericardium. Generally, parallel arrangement of collagen fibers was revealed. However, some fibril groups formed by 2-3 fibers and more run in various directions (FIG.1A). Topography analysis of single fiber is presented in FIGURE 1C, where an axial profile taken along the marked line on the surface of collagen fiber in the Height image (FIG.1B) was shown. Collagen fibers in native bovine pericardium showed the regular D-banding pattern characteristic for collagen fibrils type I with the distance of 68-78nm.

The soaking of bovine pericardium in PBS solution with trypsin and EDTA resulted in non significant changes in tissues' morphology. FIGURE 2 shows the AFM Deflection (FIG.2A) and Height (FIG.2B) images of bovine pericardium treated in that manner. Generally, surfaces of trypsin-treated connective tissue samples were free of the extracellular matrix debris. It is important that the collagen fibers structure remains intact as it is clearly visible in FIG.2A. Topography of collagen fiber representing tissue treated with trypsin in EDTA-PBS solution, presented as an axial profile (FIG.2C) taken along the marked line on the fibril surface in the Height image (FIG.2B), reveals regular periodicity. The boundaries between bands are more visible (FIG.2C), which probably results from removal of low molecular proteins from the tissue structure. These data correspond to results of our earlier studies. We have shown that electrophoretic profile of proteins released from porcine pericardium treated in the same way revealed the lack of polypeptides with molecular weight below 24 kDa [12]. Demonstrated results of AFM studies of bovine pericardium treated with trypsin in

EDTA-PBS solution do not reveal any failures on the fibers' surface in the nanoscale.

#### Conclusions

Although the enzymatic decellularization belongs to the most promising methods of allogeneic and xenogeneic tissues stabilization, the biodegradation processes in modified tissues are complex and still not recognized. It has been found upon presented results that enzymatic "purification" of bovine pericardium surface may influence the reduction of biodegradation processes by elimination of cellular debris and immunogenic agents. The most important aspect of this finding is the lack of deterioration of collagen fibers in the tissue surface layer.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by Silesian Medical University.

#### •••• References

[1] Cwalina B., Turek A., Nożyński J., Jastrzębska M., Nawrat Z. Structural changes in pericardium tissue modified with tannic acid. Int J Artif Organs. 28 (2005) 648-53.

[2] Jastrzebska M., Barwiński B., Mróz I., Turek A., Zalewska-Rejdak J., Cwalina B. Atomic force microscopy investigation of chemically stabilized pericardium tissue. Eur Phys J E Soft Matter. 16 (2005) 381-8.

[3] Turek A., Cwalina B., Pawlus-Łachecka L., Dzierżewicz Z. Influence of tannic acid and penicillin on pericardium proteins stability. Engineering of Biomaterials 69-72 (2007) 84-86.

[4] Carpentier A., Lemaigre G., Robert L., Carpentier S., Dubost C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. J Thorac Cardiovasc Surg. 58 (1969) 467-83.

[5] Cwalina B., Turek A., Miśkowiec M., Nawrat Z., Domal-Kwiatkowska D. Biochemical stability of pericardial tissues modified using glutaraldehyde or formaldehyde. Engineering of Biomaterials 23-25 (2002) 64-67.

[6] Gendler E., Gendler S., Nimni, M.E. Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. J Biomed Mater Res. 18 (1984) 727-36.

[7] Levy R.J., Schoen F.J., Anderson H.C., Harasaki H., Koch T., Brown W., Lian J.B., Cumming R., Gavin J.B. Cardiovascular implant calcification: a survey and update. Biomaterials 12 (1991) 707-14.

[8] Pathak C.P., Adams A.K., Simpson T., Phillips R.E. Jr, Moore M.A. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential. J Biomed Mater Res A. 69 (2004) 140-4.

[9] Schmidt C.E., Baier J.M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. Biomaterials 21 (2000) 2215-31.

[10] Cebotari S., Lichtenberg A., Tudorache I., Hilfiker A., Mertsching H., Leyh R., Breymann T., Kallenbach K., Maniuc L., Batrinac A., Repin O., Maliga O., Ciubotaru A., Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. Circulation 114 (2006) 1132-7.

[11] Tudorache I., Cebotari S., Sturz G., Kirsch L., Hurschler C., Hilfiker A., Haverich A., Lichtenberg A. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. J Heart Valve Dis. 16 (2007) 567-73.

[12] Turek A, Cwalina B, Nożyński J. Biochemical and morphological properties of pericardium tissues after decellularization. Engineering of Biomaterials 77-80 (2008) 110-113.

[13] Simionescu D., Simionescu A., Deac R. Detection of remnant proteolytic activities in unimplanted glutaraldehyde-treated bovine pericardium and explanted cardiac bioprostheses. J Biomed Mater Res. 27 (1993) 821-9.

[14] Cebotari S., Mertsching H., Kallenbach K., Kostin S., Repin O., Batrinac A., Kleczka C., Ciubotaru A., Haverich A. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. Circulation 106 (12 Suppl 1) (2002): I63-I68.

[15] Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. Rev Sci Instrum. 78 (2007) 013705.

. . . . . . . . . . . . . . . . .

### MORPHOLOGICAL STUDIES OF TISSUES STABILIZED BY GLUTARALDEHYDE AND TANNIC ACID

Artur Turek<sup>1\*</sup>, Andrzej Marcinkowski<sup>2</sup>, Beata Cwalina<sup>3</sup>, Jerzy Nożyński<sup>4</sup>, Zofia Dzierżewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup>CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,

POLISH ACADEMY OF SCIENCE, ZABRZE, POLAND

<sup>3</sup>Department of Environmental Biotechnology,

SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, GLIWICE, POLAND

<sup>4</sup>Foundation for Cardiac Surgery Development,

Zabrze, Poland

\*MAILTO: ATUREK@VIP.INTERIA.PL

#### Abstract

Despite the disadvantages of glutaraldehyde (GA)stabilization of tissues, it is the method most often used for xenogeneic tissues preparation. Nowadays, partial elimination of drawbacks of this method is achieved by using GA in the mixture with other crosslinking reagents, which completes the stabilization effects and acts synergistically. The aim of this work was to determine microstructure and nanostructure of porcine pericardium stabilized by GA and tannic acid (TA). The microstructure was examined by optical microscopy and the nanostructure by atomic force microscopy (AFM). Different results on the level of micro- and nanostructure were observed. No essential changes in the tissue morphology after crosslinking with GA and TA were observed under optical microscope, but significant morphological differences were revealed in AFM studies.

*Keywords*: glutaraldehyde, tannic acid, porcine pericardium, microstructure, nanostructure

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 32-34]

#### Introduction

Glutaraldehyde (GA) is the crosslinking agent most often used in stabilization of xenogeneic tissues [1]. However, GA is cytotoxic [2] and, moreover, the GA-stabilized tissues are susceptible to premature calcification [3]. Procedures of the tissue stabilization with GA are modified by use of GA low concentrations. Partial elimination of drawbacks in the GAstabilized tissues may also be achieved by using GA in the mixture with other crosslinking reagents, which completes the stabilization effects and acts synergistically. Lately, the attention has been paid on tannic acid (TA) as stabilizing reagent [4-6]. According to these data, the tissue treatment with TA alone or with mixture of GA and TA is proposed as a new method of the connective tissues stabilization. TA-treatment leads to the decrease in the tissue calcification [7] and the increase of extracellular matrix integrity [4].

The aim of this work was to determine microstructure and nanostructure of porcine pericardium stabilized by GA and TA.

#### Materials and methods

. . . . . . . . .

• •

Porcine pericardium from hearts of 5–6 month old domestic pig (Sus scrofa domestica) was obtained from the local abattoir and subsequently transported to the laboratory in buffered physiological saline solution (PBS; pH 6.5) at 4°C according to Simionescu and co-workers [8] procedure for the pericardium selection for bioprosthetic heart valves. Fatty tissue and sections with heavy vasculature were gently removed from prepared samples.

Tissue samples were crosslinked using solution containing 0.2% GA (Sigma) and 2% TA (Sigma), at the temperature  $4^{\circ}$ C, during 4h.

Changes on the level of microstructure were observed using the optical microscope Polyvar (Leica) under magnification 200x. Tissues were stained with hematoxylin and erythrosine. The preparation and documentation were performed using Quantament 500 Plus System.

The nanostructures of native and modified tissue samples were evaluated by atomic force microscopy (AFM). AFM imaging was performed using MultiMode 3 (di-Veeco, CA) working in the tapping mode under atmospheric conditions. Two standard AFM signals were registered: the signal corresponding to the topography of the sample (Height) and the differential signal (Deflection), which is useful for direct observation. Before measurements, tissue samples were gently air-dried, at room temperature in the laminar flow box, until the excess of water had evaporated from the samples' surfaces [5]. All AFM images were processed using the software package WSxM (Nanotec Electronica, Spain) [9].

#### **Results and discussion**

Histological studies of porcine pericardium stabilized with mixture of GA and TA did not reveal any significant changes in microstructure (FIG.1). Tight structure of collagen fiber-rich connective tissue with slits was observed. The crosslinking of porcine pericardium with the mixture of GA and TA (during 4h) influenced the preservation of fibers structure.



FIG.1. Histological image (magnification 200×) of porcine pericardium crosslinked with the mixture of glutaraldehyde (GA) and tannic acid (TA). Tissue stained with hematoxylin and erythrosine.

However, in the nanoscale significant changes in collagen fibers structure representing tissue modified with mixture of GA and TA were revealed by AFM study (FIG.2).

The crosslinking of porcine pericardium with mixture of GA and TA influences the broadening of collagen fibers (compare FIGs.2A and 2D), which results from the forming of additional crosslinks between tropocollagen chains [5,6]. The tissue crosslinking using mixture of GA and TA influences an axial profile (FIG.2C) taken along the marked line in the Height image (FIG.2B), which reveals irregular periodicity of collagen fiber.



FIG.2. AFM Deflection (A) and Height (B) images (483.2nm×483.2nm) of the porcine pericardium crosslinked with the mixture of GA and TA); (C) represents an axial profile of the collagen fiber taken along the marked line in the Height image (B); (D) - Deflection image of the native pericardium.

#### References

[1] Jayakrishnan A., Jameela S.R., Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. Biomaterials 17 (1996) 417-84.

[2] Gendler E., Gendler S., Nimni M.E. Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. J Biomed Mater Res. 18 (1984) 727-36.

[3] Levy R.J., Schoen F.J., Anderson H.C., Harasaki H., Koch T.H., Brown W., Lian J.B., Cumming R., Gavin J.B. Cardiovascular implant calcification: a survey and update. Biomaterials 12 (1991) 707-14.

[4] Cwalina B., Turek A., Nożyński J., Jastrzębska M., Nawrat Z. Structural changes in pericardium tissue modified with tannic acid. Int J Artif Organs. 28 (2005) 648-53.

[5] Jastrzebska M., Barwiński B., Mróz I., Turek A., Zalewska-Rejdak J., Cwalina B. Atomic force microscopy investigation of chemically stabilized pericardium tissue. Eur Phys J E Soft Matter. 16 (2005) 381-8.

[6] Jastrzebska M., Zalewska-Rejdak J., Wrzalik R., Kocot A., Mróz I., Barwiński B., Turek A., Cwalina B. Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations. J Biomed Mater Res A. 78 (2006) 148-56.

[7] Isenburg J.C., Simionescu D.T., Vyavahare N.R. Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall. Biomaterials 26 (2005) 1237-45.

[8] Simionescu D., Simionescu A., Deac R. Detection of remnant proteolytic activities in unimplanted glutaraldehyde-treated bovine pericardium and explanted cardiac bioprostheses. J Biomed Mater Res. 27 (1993) 821-9.

[9] Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. Rev Sci Instrum. 78 (2007) 013705.

### 34 Conclusions

Different results on the level of micro- and nanostructure were observed. No essential changes in the tissue morphology after crosslinking with GA and TA were observed under optical microscope, but significant morphological differences were revealed in AFM studies. These methods of the tissues structure imaging are useful in the research of the tissues stabilization effects.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by Silesian Medical University.

• • • • • • • • • • • • • • • • • •

### HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE SOFT TISSUE REACTION AFTER IMPLANTATION OF HERNIA POLYPROPYLENE MESHES

B.Żywicka<sup>1\*</sup>, S.Pielka<sup>1</sup>, D.Paluch<sup>1</sup>, L.Solsk<sup>1</sup>, M.Szymonowicz<sup>1</sup> A.M.H. Struszczyk<sup>2,3</sup>

 <sup>1</sup> WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH,
 2 PONIATOWSKIEGO STR., 53-326 WROCLAW, POLAND,
 <sup>2</sup>TRICOMED S.A.,
 270 PIOTRKOWSKA STR., 90-361 LODZ, POLAND
 <sup>3</sup>INSTITUTE OF SECURITY TECHNOLOGY "MORATEX",

MARTIN SKLODOWSKIEJ-CURIE STR., 90-965 LODZ, POLAND \*MAILTO: BZYWICKA@CHEKSP.AM.WROC.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 33-37]

#### Introduction

A new type of Dallop® M1) hernia mesh was designed using nonresorbable, monofilament polypropylene yarn by knitting. Resulted implant differs in surface fracture: smooth from one side and coarse on the another and shows significantly high macroporosity (macropore surface - 3,3mm<sup>2</sup>) and low surface weight.

The aim of the study was to evaluate local tissue reaction after designed medical device implantation. The commercial, polypropylene, monofilament hernia mesh (Duramesh™, CE-marked, Sukol Inc) was used as a control. The samples of the designed implant and control were implanted subcutaneously and into the back muscles of the rabbits ( albino New Zealand breed), for 2, 4, 12, 24 and 52 weeks. Macroscopic evaluation indicated the healing process coursed without any complications. Symptoms of low irritation around the subcutaneously implanted samples were present up to 12 weeks due to the constant movements of the samples. In the long time after 26 and 52 weeks neither in case of tested mesh nor in control mesh maintaining inflammation state were macroscopically observed. The histological evaluation of designed hernia mesh Dallop® M presented slight irritation in subcutaneous tissue after 2 weeks that disappeared after 26 weeks of implantation. The process of implant integration caused the formation of thin layer of connective tissue with fat infiltration around the mesh fibres both in subcutaneous and muscle tissue. After 26 week of implantation the connective tissue covering implants had double-layer structure: fibrous connected with the surrounding tissues and loose and rich-cell of the implant side. After 52 weeks, in direct vicinity of mesh fibres, especially in spaces between filaments, were still present small bands of loose rich-cell connective tissue including: fibroblasts, lymphocytes, single giant cells. Moreover, fat infiltration had different degree both around the tested as well as control implant. Reaction of subcutaneous and muscle tissues in term 2-52 weeks on implanted designed Dallop® M polypropylene hernia mesh allows to recognize it as biocompatible material.

1) DALLOP® M is a design code of commercial OP-TOMESH<sup>™</sup> hernia mesh.



FIG.1. A. Designed Dallop® M hernia mesh, B. Commercial Duramesh™ hernia mesh.

#### Materials and methods

The following samples for testing were prepared:

- tested material namely polypropylene hernia mesh Dallop® M, in the form of discs at the diameter of 15mm, subject to ethylene oxide sterilization complies with the requirements as for chemical purity and physical properties stated in Initial Quality Release Conditions for the designed product Dallop® M.

- as a control material polypropylene mesh Duramesh™ (manufactured by Sukol Scientific Inc, Germany).



#### Operations

# In the opinion no. 28/05 dated 21.09.2005 1<sup>st</sup> Local Ethical Commission on Animal Experiments recognized all planned tests within this project as acceptable.

Tests were conducted on 12 rabbits of New Zealand breed of both sexes. In animal quarters animals were kept separately in cages under controlled humidity (28-37%) and temperature (16-20°C). Animals had unlimited access to water and were fed with standard granulated fodder for rabbits LSK. 24 hours before planned procedure rabbits were fasting with access to water. Hair on the back of the animals on the area of 15cm in length and 10cm in width was



removed. On the day of the planned procedure all animals underwent the veterinary examination and were recognized as healthy without clinical symptoms of pathological state.

All implantations of the tested materials were conducted by the same team in the surgery room with maintenance of surgical aseptics. Rabbits were anaesthetized by intramuscular injection of Xylazyne in dose of 5mg/per kg of bodyweight and Zoletil in dose of 15mg/ per kg of bodyweight.

Skin incision at the length of 4-5cm was made, running along spinous processes of the spine in thoracic section. Next, skin was prepared bluntly to the sides of the chest. In back muscles (thoracic longest muscle and lumbus longest muscle - mm. longissimus thorascis et longissimus lumborum) muscle pockets were made by incision in fascia with the use of blunt ended scissors and blunt prepared. In those muscle pockets the tested samples were placed. Muscle pockets were sutured with single resorbable suture Dexon 3-0. Next, the tested samples were placed in subcutaneous tissue securing them with single suture Dexon 3-0 in order to avoid displacement.

Samples in total quantity of 12 per rabbit were implanted according to the below mentioned schema:

- 3 tested samples in back muscle on the right side
- 3 tested samples subcutaneously on the right side
- 3 tested samples in back muscle on the left side

- 3 tested samples subcutaneously on the left side

Samples, both in muscle pockets and in subcutaneous tissue, were placed in the distance between one another not smaller than 2cm.

After implantation of all samples the skin was closed with interrupted sutures with the use of polyamide nonresorbabale sutures Amifil M 3-0. The postoperative wound was rinsed with hydrogen peroxide solution and disinfected with preparation Prevacare. Wounds were not covered with a dressing. Conditions of postoperative maintenance were the same as in the preoperative period. On the 10<sup>th</sup> day after the procedure the sutures at all rabbits were removed.



#### Macroscopic autopsy evaluation

In planned testing terms after 2, 4, 12, 26 and 52 weeks the euthanasia of the rabbits was conducted by intravenous administration of penthoparbitalum. Before the anaesthesia was performed the general health state of the animals was evaluated. During the course of autopsy, firstly, the macroscopic evaluation of the wound was performed and the appearance of all places of samples implantation was rated. Next, the tested material was sampled with surrounding tissues for further histological testing. In the second stage, the appearance of the chosen internal organs was evaluated, mainly of the respiratory and digestive system.

#### **Microscopic evaluation**

Soft tissues namely muscle and subcutaneous with implants were being fixed for 48 hours in 10% water solution of formic formaldehyde in phosphatic buffer. Next, the samples were dehydrated in acetone, transilluminated in xylene and embedded in paraffin blocks. On microtome sections at the thickness of 4µm were cut. Preparations were stained with hematoxylin and eosin (HE) and Van Gieson method (VG) differentiating connective tissue stroma and then were closed in Canadian balsam. Histological preparations were evaluated with light microscope with the use of computer software for analysis and image activation. The classical qualitative- quantitative evaluation was made and also healing in process dynamics was evaluated, next on chosen and most representative preparations the semi-quantitative evaluation was conducted (ISO/DIS 10993-6:2004-2005, Biological evaluation of medical devices - Part 6: Test for local effects after implantation, Annex E which is comparable with new revision of PN-EN ISO 10993-6:2007 Standard).

#### Results

In both groups all animals survived to the planned autopsy dates without clinical illness symptoms. At all animals with performed autopsy the following organs were subjected to examination: hearts, lungs, livers and kidneys; all of them had proper size and colour, without changed shape, without visible pathological changes.

#### **Macroscopic evaluation**

Macroscopic evaluation indicated that the healing process of the tested mesh Dallop® M and the control hernia mesh Duramesh<sup>™</sup> coursed without any complications. Symptoms of low irritation (maintaining hyperaemia, and vascular injection) around the subcutaneously implanted samples were presented up to 12 weeks due to the constant movements of the samples. After 26 and 52 weeks neither in case of tested mesh Dallop® M nor in control hernia mesh Duramesh<sup>™</sup> maintaining inflammation state were observed. For both evaluated meshes in the testing terms the macroscopic image looked similarly.

#### **Microscopic evaluation**

The samples of tested mesh Dallop® M two weeks after implantation were surrounded by the band of loose rich-cell connective tissue with presence of numerous eozinophils. The histological evaluation of hernia mesh Dallop M in comparison with DurameshTM presented slight irritation in subcutaneous tissue after two weeks (which disappeared during next weeks of observation).

The microscopic image of the healing of Dallop® M and Duramesh<sup>™</sup> in testing terms 4,12, 26 and 52 weeks after implantation was similar and no differences were showed. Both in subcutaneous and muscle tissue the process led to formation of thin band of connective tissue with fat infiltration around the mesh fibres. In 26 week after implantation the connective tissue band had double-layer structure: fibrous from the side of surrounding tissues and loose rich-cell from the side of implant. After 52 weeks from implantation, in direct vicinity of mesh threads especially in spaces between filaments, were still present small bands of loose rich-cell connective tissue in which the following could be distinguished: fibroblasts, lymphocytes, single giant cells. Fat infiltration had different degree both around the



FIG.5. Microscopic view 2 FIG.6. Microscopic view 2 weeks after implantation weeks after implantation of tested hernia mesh of tested hernia mesh Dal-Dallop® M into subcuta- lop® Minto subcutaneous neous tissue. Samples tissue. Round fibres surroof mesh with the band unded by the band of loose of loose rich-cell con- rich-cell connective tissue nective tissue. Stain HE. with visible eozynophils. Magn.140x.

Stain HE. Magn.280x.



weeks after implantation weeks after implantation of control hernia mesh of tested hernia mesh Duramesh<sup>™</sup> into subcu- Dallop® M into the muscle taneous tissue. On the tissue. On the bottom, top the samples of mesh the samples of mesh sursurrounded by the band rounded by the band of of loose rich-cell con- loose rich-cell connective nective tissue. Stain VG. tissue; beside the skeletal Magn.280x.

FIG.7. Microscopic view 2 FIG.8. Microscopic view 2 striated muscles. Stain VG. Magn.140x.





mesh Dallop® M into mu- mesh Dallop® M into subscle tissue. In the centre cutaneous tissue. In the the samples of mesh with centre the samples of the loose rich-cell con- mesh, surrounded by fibre nective tissue separating connective tissue. Stain them from the skeletal HE. Magn.56x. striated muscles. Stain VG. Magn.140x.

tested as well as control mesh. From minimal quantity, in the form of single cells accompanying fibrosis, to a few fat layers separating the implant from surrounding tissues. It must be emphasized that the complete healing in process probably has no finished and insignificant inflammatory process still take place mainly between filaments of the tested meshes.

In the employed semi-quantitative score evaluation comparing the tested mesh Dallop® M with mesh Duramesh™ only in the subcutaneous tissue in test period of 2 weeks the result obtained showed slight irritating effect. In further evaluations of subcutaneous tissue reaction namely after



VG. Magn.140x.

FIG.11. Microscopic view FIG.12. Microscopic view 52 weeks after implan- 52 weeks after implantatation of tested hernia tion of tested hernia mesh mesh Dallop® M into sub- Dallop® M into subcutacutaneous tissue. In the neous tissue. The rich-cell centre the samples of connective tissue in the mesh, surrounded by fibre straight neighbourhood of connective tissue. Stain the fibre of mesh is visible. Stain. VG. Magn. 560x



FIG.13. Microscopic view FIG.14. Microscopic view 52 weeks after implanta- 56 weeks after implantion of control herniamesh tation of control hernia Duramesh<sup>™</sup> into subcu- mesh Duramesh<sup>®</sup> into taneous tissue. On the subcutaneous tissue. On right, the round samples left I right side the round of mesh surrounded by sample of mesh surrounthe band of the fibre con- ded by the band of fibre nective tissue with loose connective tissue. In the rich-cell connective tissue straight neighbourhood between filaments. Stain of the fibres of mesh are V.G.. Magn.560x. visible inflammatory cells.

Stain VG. Magn.560x.



FIG.15. Microscopic view FIG.16. Microscopic view 52 weeks after implantation 56 weeks after implantaof tested hernia mesh Dal- tion of tested hernia mesh lop® M into muscle tissue. Dallop® M into muscle In centre, the samples of tissue. Visible the rich-cell mesh surrounded by thin connective tissue between band of fibre connective the fibers of mesh. Stain. tissue with fat infiltration HE. Magn. 560x. between the mesh fibres. Stain. VG. Magn. 56x.

4,12,26 and 52 weeks the result was obtained proving lack of irritating effect. Due to the fact that this result only concerns the subcutaneous tissue, where the samples were implanted and despite using suture for fixation the samples displaced, and the period of only 2 weeks it is probable that irritation was the result of sample displacement. In all test terms in muscles the mesh Dallop® M compared to mesh Duramesh<sup>™</sup> showed no irritating effect.

#### Conclusion

- In histological evaluation in subcutaneous tissue after

2 weeks designed hernia mesh Dallop® M compared to polypropylene hernia mesh Duramesh<sup>™</sup> presented slight irritation; after 4,12, 26 and 52 weeks designed polypropylene hernia mesh Dallop® compared to polypropylene mesh Duramesh<sup>™</sup> presented no irritation.

- In histological evaluation in muscle tissue in all test terms (after 2,4,12,26 and 52 weeks) designed hernia mesh Dallop® M compared to polypropylene mesh Duramesh<sup>™</sup> presented no irritation.

- The process of Dallop® M integration caused the formation of thin layer of connective tissue with fat infiltration around the mesh fibers both in subcutaneous and muscle tissue.

- Reaction of subcutaneous and muscle tissues in test terms 2,4,12,26 and 52 weeks against implanted samples of designed hernia mesh Dallop® M allows to recognize it as fully biocompatible material i range of ISO 10993-6:2005 and PN-EN ISO 10993-6:2007.



FIG.17. Microscopic view 52 weeks after implantation of control hernia mesh Duramesh<sup>™</sup> into muscles tissue. In the centre the round sample of mesh surrounded by the band of fibre connective tissue, The richcell connective tissue in the straight neighbourhood of the fibre the rich-cell connective tissue is visible . Stain VG. Magn.560x.

#### References

The tests were planned and conducted in accordance with the following standards:

- PN-EN ISO 10993-1: 2003 "Biological evaluation of medical devices- Part 1.: Evaluation and test";

- PN-EN ISO 10993-2: 2002 'Biological evaluation of medical devices- Part 2.: Requirements as for animal management";

PN-EN ISO 30993-6:2000 "Biological evaluation of medical devices- Part 6.: Test for local effects after implantation";
 ISO/DIS 10993-6, 2004-2005, Biological evaluation of medical

devices- Part 6: Test for local effects after implantation, Annex E - PN-EN ISO 10993-6:2007 "Biological evaluation of medical devices- Part 6.: Test for local effects after implantation"

•••••

### EFFECT OF TITANIUM ON THE SINTERING AND MICROSTRUCTURE OF TI-DOPED HYDROXYAPATITE

#### A.ŚLÓSARCZYK, A.ZIMA, Z.PASZKIEWICZ, J.SZCZEPANIAK

AGH–UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, AL. MICKIEWI-CZA 30, 30-059 CRACOW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 37]

#### Introduction

Calcium phosphates (CaPs): hydroxyapatite (HA – Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) and  $\beta$ TCP ( $\beta$ Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) are widely used in hard tissue replacement in orthopaedic, maxillofacial surgery and dentistry. Despite of very high biocompatibility and bioactivity, due to poor mechanical strength and low fracture toughness their medical applications are limited to unloaded or low-loaded implants and coatings. One approach in the design of the next generation of CaPs implants is to dope synthetic HAp with small amounts of different elements which affect properties of the obtained materials. In this study we report the influence of titanium additives on sinterability, phase composition, microstructure and flexural strength of the Ti-modified hydroxyapatite ceramics.

#### Materials and methods

Hydroxyapatite powders doped with various concentrations of Ti (0.5; 1.0 and 2.0wt%) were produced by a wet method. In such synthesis CaO, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and TiCl<sub>3</sub> were applied as reactants. The initial powders were pressed under the pressure of 100 MPa to rectangular samples 8×40mm. Samples of undoped HA were prepared for reference. All the samples were sintered at 1250°C for 2h. The apparent density and open porosity of the materials were measured by Archimedes method. Phase composition of the initial powders and sintered materials was examined by X-ray diffraction (Philips diffractometer). The phase quantification was made by the Rietveld method using the program X'pert Pro Plus. The unit cell parameters for HA and  $\alpha$ TCP were determined. Fracture surfaces of the specimens were studied by SEM (Hitachi S4700). Flexural strength was measured by Instron 3345.

#### Results

All the CaPs materials based on Ti modified HA exhibited lower apparent density and higher porosity (Po~9%, Pt~10% for HA with 2 wt.% of Ti) in comparison to reference (not-doped HA) samples (P<sub>o</sub>~4%, P<sub>t</sub>~8%). Ti negatively influenced the densification and sinterability of the initial powders. XRD studies showed that Ti-doped HA decomposed partially to  $\alpha$ TCP and a new crystalline phase, perovskite (CaTiO<sub>3</sub>) was formed. Ti ions partially substituted Ca ions in HA structure which resulted in changes of HA unit cells. SEM studies confirmed the presence of CaTiO<sub>3</sub> homogeneously distributed on the surfaces and the grain boundaries of calcium phosphate. The flexural strength of doped ceramics decreased with increasing titanium amount from 88MPa (undoped hydroxyapatite) to 53MPa for materials with 2wt% addition of titanium.

#### Conclusions

Sintering of Ti-doped HA results in threephasic materials composed of modified HA (with Ti in the structure),  $\alpha$ TCP and perovskite – CaTiO<sub>3</sub> (5.9wt% for the material with 2wt% of Ti). The formation of a solid solution in the HA-TiO<sub>2</sub> system was observed. Titanium additives influence phase composition, sinterability and microstructure of HA ceramics.

#### Acknowledgments

This work has been supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education. Project No R 15 003 03.

### REAKCJE ZACHODZĄCE NA IMPLANCIE WSKUTEK KONTAKTU Z TKANKĄ LUDZKĄ

Beata Świeczko-Żurek<sup>1\*</sup>, Anna Pałubicka<sup>2</sup>, Marek Krzemiński<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Gdańska, Wydział Mechaniczny, Katedra Inżynierii Materiałowej ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, <sup>2</sup>Szpital w Kościerzynie \*MAILTO: bswieczko@mech.pg.gda.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 38-39]

#### Wstęp

Obecność implantu w ciele człowieka powoduje liczne, często nieprzewidywalne skutki. Powodem takiej sytuacji jest duża różnorodność interakcji materiału medycznego z kontaktującą się z nim tkanką. Stwierdzenie to dotyczy głównie oddziaływań i skutków zachodzących na poziomie molekularnym w poszczególnych komórkach kontaktującej się tkanki. Przyczyną tego efektu może być zarówno dyfuzja molekuł uwalnianych z powierzchni implantu, jak i migracja komórek i biologicznie aktywnych makromolekuł, które doznały kontaktu z implantem [1].

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. Nawet w przypadku odległych od siebie dwóch metalicznych implantów powstaje ogniwo galwaniczne. Dodatkowym jednak efektem jest możliwość toksycznego wpływu jonów metali na tkankę oraz pojawienia się reakcji alergicznej [1].

Inne biomateriały, włączając w to ceramiki, szkła, zole, materiały kompozytowe oraz materiały pochodzenia naturalnego, również ulegają stopniowej degradacji w środowisku płynów ustrojowych, stając się źródłem swobodnych substancji mogących stosunkowo łatwo migrować w całym organizmie, przyczyniając się do różnorodnych efektów biologicznych.

Często niedocenianym źródłem zagrożeń są mikroskopijnych rozmiarów pozostałości narzędzi chirurgicznych powstające w wyniku mechanicznego oddziaływania narzędzia z tkanką i z implantem lub ze zużycia implantu [2]. Źle dobrane materiały i złe wykonanie narzędzi oraz błędy operatora mogą być źródłem niespodziewanych reakcji

### THE REACTIONS OCCURING ON THE IMPLANT AS A RESULT OF CONTACT WITH HUMAN TISSUE

Beata Swieczko-Zurek<sup>1\*</sup>, Anna Palubicka<sup>2</sup>, Marek Krzemiński<sup>2\*</sup>

 <sup>1</sup>Faculty of Mechanical Engineering, Technical University of Gdansk
 11/12 Narutowicza str., 80-952 Gdańsk, Poland
 <sup>2</sup>Hospital in Koscierzyna, Poland
 \*MAILTO: bswieczko@mech.pg.gda.pl

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 38-39]

#### Introduction

A presence of an implant in the human body causes numerous, often no predictable results. A reason of such a situation results from a huge diversity of interactions of medical devices with directly surrounding tissues. This statement mainly concerns of interactions and effects taking place at a molecular level of individual cells of the tissues. This effect can results from diffusion of molecules released from an implant surface, as well as from migration of cells and biologically active macromolecules, which were in contact with implant surface [1].

It is obvious, that metallic materials undergo biocorrosion, and it results in presence, in a high concentration, of metallic ions in tissues surrounding an implant. Even, if metallic implants are in a considerable distance they build galvanic elements with all the consequences. Additionally a toxic effect of metallic ions and also allergic effect can appear [1].

Other materials, including ceramics, glasses, sols, composites or natural biomaterials, also undergo a gradual degradation, in contact with body fluids, releasing substances able to relatively freely migrate in a whole body causing variety of biological effects.

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 [2]. 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 [1].



RYS.1. Mikrostruktura stopu Ti-6Al-4V zawierająca fazy ( $\alpha$ + $\beta$ ). FIG.1. The microstructure of Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V alloy containing phase combination ( $\alpha$ + $\beta$ ). RYS.2. Wżery korozyjne widoczne na próbce po 6-cio miesięcznym przebywaniu w bulionie bakteryjnym.

FIG.2. The corrosion holes noticeable on specimens after 6 months` stay in bacteria liquid.

RYS.3. Ubytki w materiale. Mikroskop skaningowy, pow. 50x. FIG.3. The holes in material. Scanning electron microscope, 50x

alergicznych i zapalnych, ale też mogą być przyczyną poważniejszych w skutkach efektów cytotoksycznych, a nawet kancerogennych [1].

Nie bez znaczenia jest podatność powierzchni biomateriału na kolonizację przez drobnoustroje oportunistyczne [3]. Implanty usuwane z ciała biorcy, z powodu groźnych powikłań, zwykle zasiedlone są przez bakterie [4]. Oportunistyczne mikroorganizmy napotykając przyjazną sobie powierzchnię kolonizują ją i wytwarzają na niej struktury biofilmu, utrudniające dostęp komórek układu odpornościowego, a nawet antybiotyków. Biofilm uwalnia toksyczne substancje bakteryjnej przemiany materii, a w sprzyjających sytuacjach uwalnia również bakterie stając się źródłem trudnych do likwidacji stanów zapalnych [5].

Celem badań była obserwacja powierzchni próbek oraz ocena jej degradacji.

#### Materiał i metodyka badań

Materiałem były okrągłe próbki o średnicy 5mm zanurzone w bulionie bakteryjnym (Enterobacter cloacae) na okres 6-ciu miesięcy oraz trzpień endoprotezy usunięty pacjentowi po 8 latach przebywania w organizmie. Przedmioty badań były ze stopu Ti<sub>e</sub>Al<sub>4</sub>V, o składzie chemicznym: Ti, 4,08%V, 6,39%AI, 0,17%Fe, 0,015%C, 0,185%O, 0,005%N, 0,0035%H, i mikrostrukturze jak na RYS.1.

Na RYS.2 zaobserwować można głębokie wżery korozyjne na powierzchni próbki (po 6-cio miesięcznym przebywaniu w bulionie bakteryjnym - Enterobacter cloacae).

RYS.3. pokazuje wyraźne ubytki w materiale w trzpieniu endoprotezy.

#### Podsumowanie

Implant wszczepiony bezpośrednio do żywego organizmu poddawany jest działaniu wszystkich czynników na jakie będzie narażony w cyklu swojego życia.

Wprowadzenie wszczepu do określonego organu wiąże się z koniecznością przeprowadzenia zabiegu operacyjnego, w wyniku którego uszkodzona zostaje określona ilość tkanek miekkich oraz moga zostać wprowadzone drobnoustroje, które w późniejszym okresie spowodują rozwój stanu zapalnego. W związku z powyższym pożądanym byłoby, aby implant, poza nie powodowaniem niepożądanych reakcji w organizmie, był również w stanie radzić sobie z rozwojem drobnoustrojów na styku implant-tkanka.

W przypadku próbek okrągłych zanurzonych w bulionie bakteryjnym zaobserwowano po usunieciu bakterii Enterobacter cloacae głębokie wżery. Natomiast zdjęcia z mikroskopu skaningowego trzpienia endoprotezy wykazały duże ubytki w materiale.

Artykuł prezentuje wstępne badania, które będą kontynuowane w najbliższym czasie.

#### Piśmiennictwo

[1] Walkowiak B.: Biomedyczne skutki kontaktu tkanki z implantem. Inżynieria Biomateriałów, 38-43, 2004, 200-205

[2] 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 alumnia ceramic particles. J. Ortop. Res. 2004, 22.832-8

[3] Jakubowski W., Bartosz G., Niedzielski P., Szymański W., Walkowiak B.: Nanocrystalline diamond surface is resistant to bacterial colonization. Diamond and Related Materials, 2004, 10, 176-9

Not less important is susceptibility of biomaterial surface to opportunistic microbes colonization [3]. Implants removed from a recipient bodies, due to dangerous complications, are usually settled by bacteria [4]. Opportunistic microbes finding friendly surface colonize it and produce structure of biofilm, which makes difficult an access of immune cells and even antibiotics. A biofilm releases toxic substances of bacterial metabolism, and in a favourable situation it releases also bacteria causing inflammations difficult for treatment [5].

The aim of the research was to observe the surface of the specimens and to estimate its degradation.

#### The material and the methods of the research

The round samples with the diameter of 5mm dipped in bacteria liquid (Enterobacter cloacae) for the period of 6 months as well as the endoprothesis removed from the patients body after 8 years. The research materials were made of Ti6Al4V, chemical composition: 4,08%V, 6,39%Al, 0,17%Fe, 0,015%C, 0,185%O, 0,005%N, 0,0035%H, Ti as the rest, and microstructure as shown in Fig.1 were examined.

In FIG.2 the deep corrosion holes can be observed (after 6 months' stay in bacteria liquid - Enterobacter cloacae).

FIG.3 shows significant holes in endoprothesis.

#### Summary

The implant introduced into the body is subjected to activity of all the factors it will be in contact with during its stay in the human body.

Introducing implant into human organs is connected with surgical intervention, which ruins definite quantity of soft tissues. It is accompanied by introducing bacteria, which later on resulted in inflammation. Therefore, it would be expected that the implant was able to deal with the development of bacteria on implant - tissue border.

In case of round samples dipped in bacteria liquid Enterobacter cloacae deep holes were observed after removing them from the liquid. The Fig.3 of the implant from scanning electron microscope showed significant decrease in the material.

The paper presents introductory results of the research, to be carried out in future.

#### References

[4] Leunisse C., van Weissenbruch R., Busscher H.J., van der Meri H.C., Dijk F., Albers F.W.: Biofilm formation and design features of indwelling silicone rubber tracheoesophageal voice prostheses-an electron microscopical study. J. Biomed. Mater. Res. 2001, 58, 556-563

[5] Hendricks S.K., Kwok C., Shen M., Horbett T.A., Ratner B.D., Breyers J.D.: Plasma-deposited membranes for controlled release of antibiotic to prevent bacterial adhesion and biofilm formation. J. Biomed. Mater. Res. 2000, 50, 160-70

### STRUKTURA I ODPORNOŚĆ KOROZYJNA TLENO-AZOTOWANEGO W NISKIEJ TEMPERATURZE STOPU NITI WYKAZUJĄCEGO PAMIĘĆ KSZTAŁTU

J.Lelątko<sup>1\*</sup>, T.Goryczka<sup>1</sup>, T.Wierzchoń<sup>2</sup>, M.Ossowski<sup>2</sup>, B.Łosiewicz<sup>1</sup>, E.Rówiński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Nauki o Materiałach, Uniwersytet Śląski, 40-007 Katowice, Bankowa 12 <sup>2</sup>Wydział Inżynierii Materiałowej, Politechnika Warszawska, 02-507 Warszawa, Wołowska 141 \*MAILTO: jozef.lelatko@us.edu.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 40-42]

#### Wstęp

Stopy NiTi znalazły szerokie zastosowanie w medycynie z powodu takich specyficznych właściwości jak zjawisko pamięci kształtu, pseudosprężystość i biokompatybilność [1]. Wydaje się być doskonałym biomateriałem na zastosowania w ortopedii, stomatologii oraz w chirurgii naczyniowej i miękkiej. Jednakże, aplikacje, szczególnie w implantologii długoterminowej, wymagają zwrócenia szczególnej uwagi na uwalnianie z implantu jonów niklu do otaczającej tkanki kostnej oraz wpływ na metabolizm pacjentów. Nikiel, występujący przede wszystkim w stanie niezwiązanym, może spowodować alergie i wywołać toksyczny efekt, gdy jego ilość w komórkach przekroczy określony poziom [2]. W celu poprawy odporności korozyjnej stopu NiTi i powstrzymania uwalnianie jonów niklu, stosuje się szereg technik pozwalających na modyfikację powierzchni. Szczególnie przydatne w zabezpieczeniu ujemnego wpływu jonów niklu na ciało ludzkie okazały się warstwy wierzchnie utworzone z tlenków i azotków tytanu [3,4]. Ponadto, kombinacja sekwencji warstw zbudowanych z azotków i tlenków dodatkowo wpływa na poprawę odporności korozyjnej i biokompatybilność [5,6].

W pracy zamieszczono wyniki badań tlenkowo-azortkowych warstw wierzchnich pokrywających stop NiTi. Warstwy te wytworzono techniką jarzeniową w niskiej temperaturze.

#### Materiał i metodyka badań

Azotkowo-tlenkowe warstwy były nanoszone na komercyjny stop NiTi o nominalnym składzie chemicznym zawierającym 50.6at.% Ni. Taki skład chemiczny oraz zastosowanie przesycania z temperatury 800°C do wody z lodem, gwarantuje obniżenie temperatury Af do 10°C. Oznacza to, że stop w temperaturze otoczenia posiada strukturę fazy macierzystej B2 i wykazuje pseudosprężyste właściwości.

Warstwy tlenkowo-azotkowe wytworzono na płytkach wykonanych ze stopu NiTi o wymiarach 14x12x0.8mm metodą niskotemperaturowego azotowania jarzeniowego. Powierzchnie płytek do azotowania przygotowywano na drodze szlifowania i polerowania mechanicznego. Końcowe polerowanie prowadzono w zawiesinie SiO<sub>2</sub> o gradacji 0,1µm. Proces azotowania prowadzono w stosunkowo niskiej temperaturze (w zakresie temperatury pomiędzy 200 i 380°C), stosując w trakcie procesu różne czasy i

### STRUCTURE AND CORROSION RESISTANCE OF LOW TEMPERATURE NITRIDED/ OXIDIZED NITI SHAPE MEMORY ALLOY

## J.Lelatko<sup>1\*</sup>, T.Goryczka<sup>1</sup>, T.Wierzchoń<sup>2</sup>, M.Ossowski<sup>2</sup>, B.Łosiewicz<sup>1</sup>, E.Rówiński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Material Science, University of Silesia, 12 Bakowa str.,40-007 Katowice, Poland <sup>2</sup>Warsaw University of Technology, Faculty of Materials Science and Engineering, 141 Woloska str., 02-507 Warsaw, Poland \*MAILTO: jozef.lelatko@us.edu.pl

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 40-42]

#### Introduction

NiTi alloy has been used widely in biomedical fields due to its special properties such as a shape memory effect, superelasticity and good biocopmpatybility [1]. It appears to be an excellent biomaterial for orthopedics, dental application, vascular and organ surgeries. However, these applications, especially as a long term implants, require attention in respect of nickel ion release into the patient's metabolism and surrounding tissue. It has been known that nickel, when is not bounded in the alloy, can cause allergies and taken a toxic effect on the cell if its concentration exceeds a certain level [2]. In order to improve the corrosion resistance of the NiTi alloy and suppress the release of nickel ions, many surface modification techniques have been employed. Titanium oxide and nitride has been found as a good candidate for layers, which sufficiently protect human body [3,4]. Additionally, combining the sequence of the layers increases corrosion resistance and biocompatibility [5,6].

The present work reports results obtained from studies carried out on the nitride-oxide layers covering the NiTi alloy. For layer deposition the glow discharge technique at low temperature was used.

#### Experimental procedure

The nitride-oxide layers were deposited on commercial NiTi alloy with nominal chemical composition: 50.6at.% Ni. Such chemical composition of the alloy with a combination of quenching from 800oC to the iced water ensures that the Af temperature equals to 10oC. It means that alloy reveals the B2 structure at room temperature and posses superelastic properties. Rectangular samples of the alloy with dimension of 14x12x0.8mm were mechanically polished successively with SiC papers down to 1200 grit. Next diamond suspensions were used and final treatment was done using 0.1 $\mu$ m colloidal silica suspension. The layers were formed using glow discharge technique at low temperature (between 200 and 350°C) applying various time and atmosphere conditions.

Structure of obtained surface was examined applying X-ray diffraction using X'Pert Pro diffractometer. First, phase analysis was done using the X-ray grazing diffraction technique (GIXD). Next, thickness, surface roughness, interface roughness, density were calculated from reflectivity measurement. The corrosion resistance was tested in the

atmosfery.

Strukturę otrzymanych warstw wierzchnich badano stosując dyfrakcję promieni rentgenowskich używając dyfraktometru X'Pert Pro. Do analizy fazowej zastosowano technikę dyfrakcji przy stałym kącie padania wiązki pierwotnej (SKP). Następnie, grubość, chropowatość oraz gęstość warstw obliczono z rentgenowskich krzywych reflektometrycznych.

Właściwości korozyjne tleno-azotowanych powierzchni stopu NiTi badano w roztworze Tyrroda stosując elektrochemiczną metodę potencjodynamiczną.

#### Wyniki badań

Sekwencję warstw, wytworzonych na stopie NiTi podczas procesu tleno-azotowania jarzeniowego określono na podstawie dyfraktogramów zmierzonych metodą SKP. Stwierdzono, że na powierzchni warstw otrzymanych w temperaturze 200-250°C tworzy się tlenek tytanu TiO<sub>2</sub> o grubości ok. 3nm (TABELA 1). Idąc od powierzchni, pomiędzy warstwą utworzoną z TiO<sub>2</sub> a osnową NiTi tworzy się warstwa TiN. Podwyższenie temperatury procesu, jak również wydłużanie jego czasu skutkuje wzrostem grubości warstw. W konsekwencji struktura wytworzonych warstw staje się bardziej złożona. Pomiędzy zewnętrzną warstwa złożoną z tlenku i azotku tytanu a osnową NiTi stwierdzono występowanie dwóch faz międzymetalicznych: Ni<sub>3</sub>Ti i Ni<sub>2.67</sub>Ti<sub>1.33</sub>. Więcej szczegółów dotyczących wytworzonych warstw dostarczyły obliczenia wykonane na podstawie zmierzonych krzywych reflektometrycznych. Otrzymane wyniki zestawiono w TABELI 1. Całkowita grubość warstw utworzonych z TiN i TiO<sub>2</sub> podczas procesu tleno-azotowania prowadzonego w zakresie temperatury 200-250°C mieściła się pomiędzy 17nm a 26nm. Należy zauważyć, że wytworzone warstwy charakteryzują się niską chropowatością. Świadczy to o dobrej jakości tych warstw.

Przedstawione w TABELI 2 wyniki wskazują na bardzo wysoką odporność korozyjną warstw tleno-azotowanych, dla których proces był prowadzony w niskiej temperaturze. Otrzymane wartości są dwukrotnie wyższe w porównaniu ze stopami poddanymi pasywacji [7]. Wyniki te wskazują na podwyższenie właściwości korozyjnych stopów z warstwami wytworzonymi w wyższej temperaturze oraz przy wydłużonym czasie procesu. Znaczny wpływ na odporność korozyjną stopu NiTi posiada także skład chemiczny atmosfery zastosowany podczas nagrzewania. Szczególnie wysokie parametry odporności korozyjnej posiadają warstwy wytworzone przy następujących warunkach procesu: nagrzewanie w 5%H<sub>2</sub>/350°C/1,5h/N<sub>2</sub>+400°C/15min/O<sub>2</sub>.

Parametry procesu Parameters of the proces	E <sub>corr.</sub> [mV]	E <sub>br</sub> [V]	j <sub>br.</sub> [mA cm <sup>-2</sup> ]
200°C/10min	-382	2,208	53,44
250°C/10min	-471	2,36	12,2
250°C/10min (more 0 <sub>2</sub> )	-339	2,35	4,56
heating Ar + $H_2/300^{\circ}C/1,5h/N_2$ + 300°C/30min/0 <sub>2</sub>	-145	2,42	24,83
heating 5%H <sub>2</sub> /350°C/1,5h/N <sub>2</sub> +400°C/15min/O <sub>2</sub>	-8	2,87	40,11
380°C/15min/N <sub>2</sub> +5% air	-83	1,94	-

TABELA 2. Oporność korozyjna warstw mierzona w roztworze Tyrroda.

TABLE 2. The corrosion resistance of the nitrided/ oxidized NiTi alloy measured in the Tyrod's solution using the cyclic potentiodynamic polarization method.

Parametry procesu Parameters of the proces	Faza Phase	Grubo Thickness [nm]	Chropowaro powierzchni Surface roughness [nm]	G sto Density [g cm <sup>.3</sup> ]
	NiTi	-	1.44	6.06
200°C/10min	TiN	13.7	1.05	5.09
	TiO <sub>2</sub>	3,2	0,97	4.05
	NiTī	-	1,67	6,18
250°C/10min	TiN	13,7	079	4,95
	TiO <sub>2</sub>	3,24	096	4,04
25.000 /10 min	NiTi	-	2,44	5,77
$250^{\circ}$ C/10min	TiN	23,5	1,14	4,63
$(1101 \text{ e} \text{ O}_2)$	TiO <sub>2</sub>	2,94	0,81	3,44
heating Ar + H <sub>2</sub> /300°C/1,5h/N <sub>2</sub> +300°C/30min/O <sub>2</sub>	Ni <sub>3</sub> Ti, Ni <sub>2.67</sub> Ti <sub>1.33</sub> , TiN, TiO <sub>2</sub> , Ni <sub>2.44</sub> Ti <sub>0,77</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-
heating 5% H <sub>2</sub> /350°C/1,5h/N <sub>2</sub> +400°C/15min/O <sub>2</sub>	Ni <sub>3</sub> Ti, Ni <sub>2.67</sub> Ti <sub>1.33</sub> , TiN,	-	-	-
	Ni <sub>3</sub> Ti	-	4,66	7,18
380°C/15min/	Ni <sub>2</sub> Ti <sub>4</sub> O	19,2	3,44	4,17
$N_2$ +5% air	TiN	9,48	2,89	5,41
	Ni <sub>3</sub> TiO <sub>5</sub>	9,72	0,91	2,74

TABELA 1. Wyniki badań warstw wierzchnich uzyskane z pomiarów metodami: SKP i reflektometrii. TABLE 1. The results obtained from the X-ray grazing diffraction (GIXD) the reflectivity (XRR) measurements.

physiological Tyrod's solution using the cyclic potentiodynamic polarization.

#### **Results and discussion**

Sequence of the layers, which were formed during nitriding/oxidizing process on the NiTi surface, was determined from GIXD measurements. It was found that at the top of the layers deposited at temperatures 200-250°C, TiO<sub>2</sub> about 3nm thin layer was created (TABLE 1). Going deeper, between the TiO<sub>2</sub> phase and the NiTi matrix the TiN phase was formed. Increase of processing temperature as well as a time of nitriding/oxidizing resulted in increase of the thickness. In consequence structure of the layers was more complex. Between the outer nitride/oxide sublayer and NiTi matrix a presence of two intermrtalic phases: Ni<sub>3</sub>Ti and Ni<sub>2.67</sub>Ti<sub>1.33</sub> were stated. On the top of the nitride/oxide layer the oxides of such as  $Ni_3TiO_5$  or  $Ni_{2.44}Ti_{0,77}O_4$  were identified. More details of the layers were obtained from the X-ray reflectivity measurement. Obtained values are presented in TABLE 1. Total thickness of the layers, which were formed, from the TiN and TiO<sub>2</sub> phase during the process at temperature range of 200–250°C, was between 17 and 26nm. It is worthy to notice that relatively low value of the surface roughness was obtained. It proves theirs high quality.

The results obtained from corrosion measurement (TA-BLE 2) show very high corrosion resistance of the nitrided/ oxided at low temperature NiTi alloy. These values are more

### 42 Podsumowanie

Proces niskotemperaturowego tleno-azotowania jarzeniowego przeprowadzony w zakresie temperatury 200-250°C prowadzi do wytworzenia cienkich (18÷30nm) warstw wierzchnich zbudowanych z azotku tytanu i tlenku tytanu. Taka modyfikacja powierzchni znacznie podwyższa odporność korozyjną stopów NiTi oraz umożliwia ich zastosowanie na implanty medyczne, w których wykorzystuje się efekt pamięci kształtu lub właściwości pseudosprężyste. Podwyższenie temperatury procesu do 300°C lub wyższej powoduje wzrost grubości wytworzonych warstw oraz poprawę właściwości korozyjnych. Równocześnie struktura tych warstw staje się bardziej złożona. Pomiędzy warstwą zbudowaną z tlenków i azotku tytanu tworzy się podwarstwa zbudowana z faz międzymetalicznych - Ni<sub>3</sub>Ti i Ni<sub>2 67</sub>Ti<sub>1 33</sub>. Z kolei, na powierzchni wytworzonej warstwy identyfikowano złożone tlenki takie jak Ni<sub>2.44</sub>Ti<sub>0.7704</sub> lub Ni<sub>3</sub>TiO<sub>5</sub>.

#### Podziękowanie

Praca w całości wykonana i finansowana w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N507 4587 33

#### Piśmiennictwo

[1]. C.M. Wayman, J. Met., 6 (1980), p. 129

[2]. G.C. McKay, R. Mac Macnair, C. MacDonald, M.H. Grant, Biomaterials, 17 (1996) p. 1339

[3]. D. Starosvetsky, I. Gotman, Surf. and Coat. Tech., 148 (2001), p. 268

[4]. Y. Fu, X. Wu, Y. Wang, B. Li, S. Yang, App. Surf. Sci., 157 (2000), p. 167

### SUPERSPRĘŻYSTE KLAMRY NITI DO ZESPALANIA ZŁAMAŃ KOŚCI TWARZY

$$\label{eq:linear} \begin{split} \textbf{Z}. \textbf{Lekston}^{1^*}, \ \textbf{M}. \textbf{J} \textbf{e} \textbf{d} \textbf{r} \textbf{u} \textbf{s} \textbf{k} \textbf{-} \textbf{P} \textbf{a} \textbf{w} \textbf{l} \textbf{o} \textbf{w} \textbf{s} \textbf{k} \textbf{a}^2, \ \textbf{T}. \textbf{C} \textbf{i} \textbf{e} \textbf{s} \textbf{l} \textbf{i} \textbf{k}^2, \\ \textbf{J}. \textbf{D} \textbf{r} \textbf{u} \textbf{g} \textbf{a} \textbf{c} \textbf{z}^2 \end{split}$$

<sup>1</sup>Instytut Nauki o Materiałach, Uniwersytet Śląski, 40-007 Katowice, Bankowa 12 <sup>2</sup>Klinika Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej, Śląski Uniwersytet Medyczny, 40-027 Katowice, Francuska 20/2 \*MAILTO: zlekston@us.edu.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 42-46]

#### Wprowadzenie

Stopy NiTi wykazujące zjawiska pamięci kształtu i supersprężystość są obecnie rozpowszechnione w wielu medycznych zastosowaniach, jako łuki ortodontyczne, klamry do osteosyntezy, stenty, narzędzia chirurgiczne i endodontyczne [1]. Implanty i wyroby medyczne NiTi mają than twice times higher than that obtained for TiO<sub>2</sub> layers after passivation [7]. The better established value was for the layers deposited at higher then  $300^{\circ}$ C temperatures with elongated processing time. These results show that the composition of the atmosphere, applied during heating of the alloy, up to temperature of the process significantly influences the parameters of the corrosion resistance. Especially, high corrosion parameters were received applying following condition: heating 5%H<sub>2</sub>/350°C/1,5h/N<sub>2</sub>+400°C/15min/O<sub>2</sub>.

#### Summary

The nitriding/oxidizing glow discharge process carried out at temperature of 200-250°C allowed to obtain the thin (18÷30nm in thickness) surface layer, which consisted of titanium nitride and titanium oxide phases. Such modification improves the corrosion resistance of the NiTi alloy, which can be used for implants revealing shape memory effect or superelasticity properties. Increase of the temperature of the process up to 300°C and higher causes that the layer is thicker and posses high corrosion resistance. Simultaneously, the structure of the layer comes to be more complex. Between nitride/oxide layers the sublayer of intermetallic Ni<sub>3</sub>Ti and Ni<sub>2.67</sub>Ti<sub>1.33</sub> phase are formed. On the top of these layers the complex oxides were identified.

#### Acknowledgement

This work was supported financially by the Ministry of Science and High Education (project no. N N507 4587 33)

#### References

[5]. J. Lelatko, P. Paczkowski, T. Goryczka, T. Wierzchoń, Z. Paszenda, H. Morawiec, Engin. of Biomat., 47-53 (2005), p. 133
[6]. T. Goryczka, P. Pączkowski, J. Lelątko, T. Wierzchoń H. Morawiec, Solid State Phenomena 130 (2007) p. 151
[7]. H. Morawiec, J. Lelatko, G. Stergioudis, T. Goryczka, A. Winiarski, P. Paczkowski, Engin. of Biomat., 37 (2004), p. 32

### SUPERELASTIC NITI STAPLES FOR FIXATION OF FACE BONE FRACTURES

#### Z.Lekston<sup>1\*</sup>, M.Jędrusik-Pawłowska<sup>2</sup>, T.Cieślik<sup>2</sup>, J.Drugacz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, UNIVERSITY OF SILESIA, 12 BANKOWA STTR., 40-007 KATOWICE, POLAND <sup>2</sup>DEPARTMENT OF SKULL AND MAXILLOFACIAL SURGERY, SILESIAN MEDICAL UNIVERSITY, 20/2 FRANCUSKA STR., 40-027 KATOWICE, POLAND \*MAILTO: ZLEKSTON@US.EDU.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 42-46]

#### Introduction

The superelastic and shape memory NiTi alloys are nowadays widely used for several medical applications, such as: orthodontic arches, osteosynthesis staples, stents, surgical tools and endodontic instruments [1]. The NiTi implants and medical products have good mechanical properties, high corrosion resistance and excellent biocompatibility [2]. dobre własności mechaniczne, wysoką odporność korozyjną i są biokompatybilne [2]. Efekty pamięci kształtu i supersprężystość są związane z odwracalną, termosprężystą przemianą martenzytyczną pomiędzy wysokotemperaturową fazą macierzystą B2 i niskotemperaturową fazą martenzytyczną B19' indukowaną termicznie lub naprężeniowo [3]. W praktycznych zastosowaniach elementy ze stopów NiTi można wykorzystać w czterech stanach fazowych: fazy macierzystej B2, romboedrycznej fazy R, martenzytu niskotemperaturowego B19' lub martenzytu indukowanego naprężeniowo - jako supesprężyste. Kiedy materiał jest w stanie martenzytycznym lub fazy R, jest miękki i ciągliwy i może być łatwo deformowany. W stanie supersprężystym jest wysoko elastyczny (gumo-podobny), natomiast w stanie austenitycznym jest sztywny i twardy. Implant z pamięcią kształtu deformowany w stanie martenzytycznym odzyskuje swój pierwotny kształt podczas przemiany odwrotnej przy nagrzewaniu w zakresie temperatur od As do A<sub>f</sub>. Supersprężystość jest związana z formowaniem naprężeniowo-indukowanego martenzytu. Wtedy, po zwolnieniu naprężenia, implant odzyskuje swój wyjściowy kształt, przy stałej temperaturze, powyżej A<sub>f</sub>. Kompresyjne klamry NiTi sa stosowane do wewnetrznej stabilizacji złamań kości w ortopedii i chirurgii szczękowo-twarzowej [4-7]. Powszechnie są używane dwa warianty klamer NiTi: pierwszy jako klamry pamięciowe aktywowane ciepłem ciała pacjenta, które odzyskują swój kształt poniżej 37°C i drugi wariant, jako klamry aktywowane ciepłem kontrolowanego źródła zewnetrznego, które odzyskuja swój kształt powyżej temperatury ciała pacjenta. Do fiksacji małych fragmentów kostnych mogą być użyte klamry NiTi, które są supersprężyste w temperaturze pokojowej.

W Klinice Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej ŚUM w Katowicach, w dotychczasowych badaniach klinicznych, stosowano klamry NiTi z pamięcią kształtu odzyskujące kształt pod wływem ciepła ciała pacjenta do zespoleń złamań żuchwy. Niedogodności związane z koniecznością ochładzania klamer w zimnej soli fizjologicznej lub ciekłym azocie i odkształcania ich w niskiej temperaturze, poniżej M<sub>r</sub>, przed umieszczeniem w wywierconych otworach fragmentów kostnych można uniknąć używając supersprężyste klamry, których końcówki mogą być łatwo, mechanicznie wyprostowane w temperaturze pokojowej przy użyciu narzędzi chirurgicznych.

Celem podjętych badań było wytworzenie prototypowych, małych klamerek NiTi wykazujących własności supersprężyste przeznaczonych do klinicznych zespoleń złamań kości twarzy oraz sprawdzenie i porównanie na modelach czaszki w warunkach laboratoryjnych, sposobów zakładania i stabilności zespoleń złamań typu Le Fort I oraz złamań kości jarzmowej przy użyciu klamer pamięciowych odzyskujących kształt pod wpływem ciepła ciała pacjenta oraz klamer supersprężystych.

#### Materiał i metody

W badaniach użyto druty NiTi o składzie chemicznym Ti-50,8at.% Ni i średnicach 1,1mm, 1,2mm i 1,3mm. Przemiany fazowe i ich temperatury charakterystyczne po różnej obróbce cieplnej badano metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej przy użyciu kalorymetru DSC-7 Perkin Elmer podczas chłodzenia i nagrzewania próbek w zakresie temperatur -100÷+60°C. Własności wytrzymałościowe i supersprężystość drutów mierzono w testach rozciągania na maszynie wytrzymałościowej Instron i podczas cyklicznego trójpunktowego zginania na specjalnie skonstruowanym stanowisku pomiarowym wyposażonym w tensometryczny przetwornik siły (Hottinger) i różnicowy, transformatorowy The shape memory effects and superelasticity are based on thermal or stress-induced reversible, thermoelastic martensitic transformation between the high-temperature parent phase B2 (austenite) and the low-temperature B19' phase (martensite) [3]. For practical applications, NiTi can have four different states: parent phase (austenite), rhombohedral R-phase, low-temperature martensite and stress-induced martensite (superelastic). When the material is in martensite or R-phase state, it is soft and ductile and can be easy deformed. Superelastic NiTi is highly elastic (rubber-like), while austenitic NiTi is guite strong and hard. A shape-memory implant deformed in the martensitic state regains its previous shape during the reverse transition when heated in the temperature range A<sub>s</sub> to A<sub>f</sub>. The superelastic behaviour is associated with the formation of a reversible stress-induced martensite. Then, after releasing the stress, the implant recovers the initial shape, at constant temperature above A<sub>f</sub>. A shape-memory NiTi compression staples are widely used for internal fixation of bone fractures in orthopaedic and cranio-maxillofacial surgery [4-7]. In general, two variants NiTi staples are being used: the first is a body temperature activated staples which recover their shape below 37°C, and the second is heat activated staples which recover their shape above body temperature upon controlled external source. For fixation of small bone fragments, the NiTi staples which are superelastic at the room temperature can be used.

In the Department of Skull and Maxillofacial Surgery, Silesian Medical University in Katowice, in the previous clinical studies, the body-activated shape memory staples were applied for the fixation of mandible fractures. The inconveniences connected with the need of cooling the staples in cooled physiological saline or liquid nitrogen and deformation them at the low temperature, below  $M_f$  temperature, before placing them in the drilled holes in the bone fragments can be avoided by using of superelastic staples which ends can be easily mechanical straighten at the room temperature by using surgical tools.

The aim of these studies was forming small NiTi staples prototypes with superelastic properties designed for clinical joining of face bones fractures. In laboratory experiments on the skull models, the manners of fixation the facial fractures by using body-activated shape memory and superelastic staples were compared. The stability of fixation the face bone Le Fort I fracture and the zygomatic bone fracture were verified.

#### Material and methods

The NiTi wires with the chemical composition Ti-50.8 at.%Ni of diameters 1.1mm, 1.2mm and 1.3mm were used in this studies. The phase transformations and their characteristic temperatures after different heat treatments were measured by DSC-7 Perkin Elmer calorimeter during cooling and heating in the temperature range -100÷+60°C. Superelastic properties and the strength of wires were measured both by tensile tests on the Instron strength machine and during cyclic three-point bending of wires on a specially constructed measure station, equipped with an Hottinger force converter and a linear variable differential transformer (LVDT). Compression staples forces were measured using a digital force gauge FG-5000A.

#### **Results and discussion**

. . . . . . . . .

The wires have good mechanical properties in the delivered state. On the tensile curves, the stress plateau is visible which proves that the stress-induced martensitic takes place



RYS.1. Krzywe zrywania drutów NiTi zarejestrowane podczas rozciągania w maszynie wytrzymałościowej Instron.

FIG.1. The tensile stress-strain curves of the NiTi wires during strengthening on the tensile testing machine.

czujnik przemieszczeń liniowych (Peltron-LVDT). Siły ściskające klamer mierzono na stanowisku pomiarowym wyposażonym w cyfrowy dynamometr FG-5000A.

#### Wyniki badań i dyskusja

Druty w stanie dostarczenia mają dobre własności mechaniczne. Na krzywych rozciągania widoczne jest plateau naprężeń świadczące o zachodzącej pod wpływem naprężeń przemianie martenzytycznej (RYS.1). Podczas cyklicznego rozciągania i odciążania tych drutów w zakresie deformacji do około 8% obserwowano charakterystyczne pętle supersprężystości (RYS.2).

Krzywe zależności sił od strzałki ugięcia zarejestrowane podczas trójpunktowego zginania i odciążania drutów o różnych średnicach również potwierdziły ich dobrą supersprężystość (RYS.3). Na wykresach widoczne jest wyraźne plateau sił w szerokim zakresie odkształceń zarówno podczas naprężania jak i odciążania drutów. Poziom generowanych sił podczas przemiany martenzytycznej indukowanej naprężeniami oraz przemiany odwrotnej przy odciążaniu zależy od średnicy drutu . Dla drutów wybranych do przygotowania klamer supersprężystych poziom sił generowanych przy odciążaniu wynosił od 10 do16N. Cykliczne odkształcanie drutów w próbach zginania wykazało stabilność i powtarzal-



RYS.3. Pętle supersprężystości zarejestrowane podczas trójpunktowego zginania drutów NiTi o różnych średnicach.

FIG.3. The loops of superelasticity registered during three-point bending tests the NiTi wires with various diameters.

ш 🗰





FIG.2. The loops of superelastic behavior registered during cyclic loading and unloading of NiTi wire with diameter 1.2 mm.

(FIG.1). During cyclic loading and unloading these wires in the deformation range of about 8%, the characteristic superelastic loops were observed (FIG.2).

The curves of dependency the forces on the diffraction arrow registered during three-point bending and lengthening the wires of various diameters, also prove their good superelasticity (FIG.3). On the diagrams there is visible the plateau of forces in wide range of deformation, as well as during tension, as well during lightening the wires. The level of generated forces during martensitic transformation indicated by tensions and invert transformation, during lengthening, depends on the wire diameter. For the wires chosen for preparing the superelastic staples, the level of generated forces during lightening was between 16 to 10N. The cyclic wire deformation in the bending tests occurs the stability and recurrence of superelastic properties (FIG.4).

The staples for fixation of bone fractures were formed under the flame of gas burner at the same time bending their ends up using the pliers for forming the wires. From wires with diameter 1.3mm, 1.2mm and 1.1mm were formed the staples with the length of the span between 7 to 15 mm which bended ends have length from 4-6mm. The angles of end bending have 30 and 45° counting from rectangular staple shape. For raising the transformation temperature and for obtaining the superelastic properties



RYS.4. Powtarzalność własności supersprężystych podczas cyklicznego zginania drutu NiTi o średnicy 1.2 mm.

FIG.4. Repeatability of superelastic properties during cyclic bending of NiTi wire with 1.2mm diameter.



#### RYS.5. Krzywe DSC zarejestrowane podczas chłodzenia i nagrzewania drutów NiTi. FIG.5. The DSC curves recorded during cooling and heating of NiTi wires.

ność własności supersprężystych (RYS.4).

Klamry do zespoleń złamań kości kształtowano na goraco w płomieniu palnika gazowego podginając ich końcówki kleszczami do formowania drutów. Z drutów o średnicach 1.3mm, 1.2mm i 1.1mm uformowano klamry o długościach przęsła od 7 do 15mm z podgiętymi końcówkami o długości 4-6 mm. Kąty podgiecia końcówek wynosiły około 30 i 45° licząc od prostokątnego kształtu klamry. Dla podwyższenia temperatur przemian i uzyskania własności supersprężystych podczas odkształcania klamer w temperaturze pokojowej klamry wyżarzano w temperaturze 400°C w czasie 15 minut. Wpływ obróbki cieplnej na przemiany fazowe i ich temperatury charakterystyczne pokazano na krzywych DSC na RYSUNKU 5. Maksymalne siły supersprężystych klamer z drutów o różnych średnicach po odgięciu ich końcówek do 90° wynoszą od 10 do 25N (RYS.6).

Supersprężyste klamry NiTi użyte do eksperymentalnego zespalania złamań kości twarzy pokazano na RYSUNKU 7. Klamry z wklęsłym przęsłem potrzebne są do stabilizacji złamania szczęki. Na RYSUNKU 8 pokazano zestaw klamer NiTi z szablonami ze stali nierdzewnej potrzebnymi do precyzyjnego wywiercenia otworów w odłamach kostnych w celu uzyskania kompresyjnego zespolenia złamania.

Poniżej pokazano dwa sposoby zakładania takiej samej klamry przy zespalaniu złamania kości jarzmowej. Na RY-SUNKU 9 klamra ochłodzona w ciekłym azocie i odkształcona ponizej temperatury M<sub>f</sub>, do kształtu prostokatnego szablonu jest wsuwana w otwory wywiercone w kości i odzyskuje kształt pod wpływem ciepła ciała, działając jako klamra pamięciowa. Taka sama klamra otwarta w temperaturze pokojowej, powyżej temperatury A<sub>f</sub>, specjalnie zaprojektowanym, rozwierającym końcówki, narzędziem chirurgicznym może być łatwo wprowadzona do wywierconych otworów w kości jako klamra supersprężysta. Wycofanie narzędzia i wsunięcie klamry do otworów powoduje samoczynne, sprężyste podgięcie końcówek zapewniające docisk odłamów kostnych. Zakładanie klamry supersprężystej przy użyciu rozwieraka i kleszczy chirurgicznych na modelu podczas zespalania złamania kości jarzmowej pokazano na RYSUNKU 10.

Na RYSUNKACH 11 i 12 pokazano eksperymentalne zespolenia złamania kości jarzmowej i kości szczęki supersprężystymi klamrami NiTi.

#### Podsumowanie

Supersprężyste klamry NiTi mogą być wykonane z do-



RYS.6. Zależność sił supersprężystych klamer NiTi od kąta podgięcia końcówek. FIG.6. Dependency of forces of superelastic NiTi staples on angle of bending the ends.



RYS.7. Kształty superspręży-<br/>stych klamer NiTi do zespalania stych klamer NiTi z szablonami<br/>złamań kości twarzy.ze stali nierdzewnej.FIG.7. Shapes of superelastic FIG.8. Sets of NiTi superelastic<br/>NiTi staples for fixation of face staples with stainless-steel<br/>bone fracturesstandard staples.

during staples deformation at the room temperature, the staples were annealed in the temperature of 400°C in the time of 15min. The influence of thermal treatment on the phase transformations and their characteristic temperatures are shown on the DSC curves (FIG.5). The maximal forces value of superelastic staples made from the wires of different diameters after bending their ends to 900 were from 10 to 25 N (FIG.6)

The superelastic staples shapes used for experimental fixation of face fractures are visible on FIG.7. The staples with concave span are needed for stabilization of the jaw fracture. The set of superelastic NiTi staples with standard stainless-steal staples needed to precise drilling of holes in the bone fragments in order to obtain compression fixation of fracture is shown on the FIGURE 8. Below are shown two manners of installing the same staple during fixation of zygomatic bone fracture. On the FIGURE 9, the staple cooled in the liquid nitrogen and deformed below the Mf temperature, to the rectangular standard shape and is inserted into the holes drilled in the bone and recovered the shape under the influence of human body temperature acting like shape-memory staple. The same staple opened at the room temperature, above the Af temperature, special designed, opening the ends by opening pliers can be easily inserted into bone drilled holes as the superelastic staple. Removing the clamping pliers and insertion the staple into drilled holes causes automatic, elastic bending the ends assuring clamping the bone fragments. Installation the superelastic staple by using the opening pliers and clamping pliers on the model during fixation of zygomatic bone fracture is shown on the FIGURE 10.

On the FIGURES 11 and 12 is shown experimental fixation of zygomatic bone fracture and jaw fractures by



RYS.9. Wsunięcie klamry RYS.10. Zakładanie klampamięciowej odkształco- ry supersprężystej odnej w niskiej temperatukształconej w temperaturze po ochłodzeniu jej w rze pokojowej rozwierająciekłym azocie. cymi kleszczami. FIG.9. Insertion the NiTi FIG.10. Installation the memory staple deformed NiTi superelastic staple in the low temperature deformed in the room after cooling it in liquid temperature by opening nitrogen. pliers.

starczonych drutów poprzez kształtowanie na gorąco i wyżarzanie w temperaturze 400°C w czasie 15 minut. Klamry z drutów o małych średnicach mogą być użyte do zespalania kości twarzy jako klamry supersprężyste, które mogą być mechanicznie otwierane w temperaturze pokojowej przy użyciu kleszczy rozwierających końcówki i wprowadzone w otwory wywiercone w odłamach kostnych.

Podczas operacji, po odsłonięciu złamania, fragmenty kostne muszą być ustawione w prawidłowym położeniu anatomicznym. W kościach po obu stronach szczelin złamań wiertłem o średnicy zbliżonej do średnicy klamry trzeba wywiercić otwory do głebokości około 5mm w odległości odmierzonej przy użyciu prostokątnego szablonu ze stali nierdzewnej identycznego z pamięciową lub supersprężystą klamrą po odgięciu końcówek. Ponieważ w temperaturze pokojowej klamry mają podgięte końcówki do kąta około 30°, przed wprowadzeniem klamry w wywiercone otwory kostne, końcówki muszą być odgięte do kształtu klamry szablonowej. Odgięcie klamry z pamięcią kształtu musi być wykonane w niskiej temperaturze, co jest możliwe po ochłodzeniu klamry w wysterylizowanej oziębionej soli fizjologicznej lub po oziębieniu w ciekłym azocie. O wiele łatwiej jest wprowadzić klamry supersprężyste, które mogą być mechanicznie odgięte w temperaturze pokojowej przy użyciu rozwierających szczypiec i implantowane w wywiercone w kościach otwory.

Użycie klamer pamięciowych lub supersprężystych zamiast tytanowych płytek i śrub jest łatwiejsze i skraca czas operacji.



RYS.11. Zespolenie zła- RYS.12. Zespolenie złamania kości jarzmowej mania szczęki Le Fort I supersprężystymi klam-supersprężystymi klamrami NiTi. rami NiTi. FIG.11. Fixation of zygo- FIG.12. Fixation of Le matic bone fracture by Fort I face bone fractuusing superelastic NiTi re by superelastic NiTi staples. staples.

superelastic NiTi staples.

#### Summary

NiTi superelastic staples can be produced from delivered wires by hot forming and then annealing at 400°C for 15 minutes. Staples from the wire of a small diameter can be used for fixation of face bones fractures as superelastic staples which may be mechanically opened at room temperature with a pincer and inserted into the drilled bone holes.

During the operation, after uncovering the fracture, the bone fragments must be set in the anatomically correct position. In the bones on both sides of the fracture the holes must be drilled to the depth of approximately 5mm in a distance of a standard, rectangular stainless steel staple identical to the shape-memory or superelastic staple after straightening their ends. At the room temperature the staples have their ends bent at an angle of approximately 30°, before inserting a staple into the drilled holes the ends must be bent to the standard staple shape. The bending of the shape memory staples must be performed at the low temperature, which is possible after cooling the staple in sterilized iced saline or after cooling in liquid nitrogen. It is much easier to insert superelastic staples which may be mechanically opened at the room temperature with a opening pliers and implanted into the drilled bone holes.

The use of shape memory or superelastic NiTi staples instead of titanium plates and screws is easier and assure shortening of the operation time.

#### Piśmiennictwo

[1] L. G. Machado, M. A. Savi., Medical applications of shape memory alloys. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36 (2003) 683-691.

[2] S. A. Shabalovskaya., Surface corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material. Biomed. Mater. Eng. 12 (2002) 69-109.

[3] K. Otsuka., X. Ren. Physical metalurgy of Ti-Ni-based shape memory alloys. Progr. Mat. Sci. 50 (2005) 511

[4] J. Drugacz, Z. Lekston, H. Morawiec, K. Januszewski., Use of TiNiCo Shape Memory Clamps in the Surgical Treatment of Mandibular Fractures. J. Oral Maxillofacial Surgery 53 (1995) 665-701. References

[5] Z. Laster, A. D. MacBean, P. R. Ayliffe, L. C. Nawlands., Fixation of a frontozygomatic Fracture with a shape-memory staple. Brit. J. of Oral and Maxillofac. Surg. 39 (2001) 324-325.

[6] P. G. Sysolyatin, V. E. Gyunter, A. V. Starokha, I. A. Makarova, S. P. Sysolyatin, V. N. Denisov, B. Q. Rahman., The use of Ni-Ti implants in maxillofacial surgery. Proceedings of the First International Conf. on Shape Memory and Superelastic Technologies. Pacific Grove, California, USA, 1994, 471-475.

[7] S. D. Strackee, F. H. M. Kroon, K. E. Bos., Fixation methods in mandibular reconstruction using fibula grafts: A comparative study into the relative strength of three different types of osteosynthesis. Head and Neck, January 2001, 1-7.

\_\_\_\_

. . . . . . . . . . . . . . . .

### REKONSTRUKCJA TKANKI CHRZĘSTNEJ BIOMATERIAŁAMI POLIMEROWYMI – WYNIKI MAKROSKOPOWE I HISTOLOGICZNE PO 26 I 52 – TYGODNIOWYM OKRESIE OBSERWACJI

Wojciech Ścierski<sup>1\*</sup>, Aleksandra Polok<sup>1</sup>, Grzegorz Namysłowski<sup>1</sup>, Jerzy Nożyński<sup>2</sup>, Lucyna Turecka<sup>1</sup>, Natalia Urbaniec<sup>1</sup>, Elżbieta Pamuła<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Oddział Kliniczny Laryngologii w Zabrzu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, <sup>2</sup>Pracownia Histopatologii Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu <sup>3</sup>Katedra Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie \*MAILTO: wojscier@mp.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 47-49]

#### Wprowadzenie

Rekonstrukcja ubytków tkanki chrzestnej w obrebie narządów głowy i szyi takich jak tchawica, krtań, ucho zewnętrzne oraz przegroda nosa stanowi nadal duży problem zarówno dla otolaryngologów jak i chirurgów plastycznych. Do dnia dzisiejszego nie znaleziono zarówno idealnej metody leczenia chirurgicznego ubytków i perforacji chrzastki, jak i odpowiedniego biomateriału, którym można by ja zastąpić. W dostępnej literaturze istnieje szereg doniesień na temat prób zastosowania resorbowalnego kopolimeru laktydu i glikolidu (PLG) należącego do grupy poliestrów alifatycznych oraz kwasu hialuronowego w rekonstrukcji tkanki chrzęstnej [1-5]. Brak informacji o wykorzystaniu PLG i jego kompozycji z kwasem hialuronowym (PLG-Hyal) w chirurgii rekonstrukcyjnej małżowiny usznej i nosa skłoniły autorów do przeprowadzenia własnych badań w tym zakresie.

Celem pracy była ocena dwóch różnych biomateriałów, których cechy mechaniczne i właściwości biologiczne pozwalają przypuszczać, iż mogłyby one w skuteczny sposób zastąpić rusztowanie chrzęstne przegrody nosa.

#### Materiał i metodyka

Do badań wykorzystano dwa rodzaje biomateriałów: resorbowalny kopolimer L-laktydu z glikolidem (PLG) zawierający 85% mol L-laktydu i 15% mol glikolidu oraz kopolimer L-laktydu z glikolidem modyfikowany kwasem hialuronowym (PLG-Hyal). Materiały te zostały zmodyfikowane w zakresie mikrostruktury i chemicznej budowy powierzchni w taki sposób, aby nadać im właściwości chondrogenne i zapewnić dobrą integrację z tkankami otaczającymi. Badania eksperymentalne przeprowadzono na 50 królikach, które podzielono na dwie grupy. W znieczuleniu ogólnym z cięcia wzdłuż brzegu małżowiny usznej wypreparowano ochrzęstną i chrząstkę na powierzchni 4x3cm. Następnie usuwano fragment chrzastki o wymiarach 1x1cm, który uzupełniano przy pomocy biomateriału. W grupie pierwszej 25 zwierząt ubytek chrzęstny małżowiny uzupełniono za pomocą PLG, natomiast w grupie drugiej 25 zwierząt

### CARTILAGE TISSUE RECONSTRUCTION BY POLYMER BIOMATERIALS – MACROSCOPIC AND HISTOLOGICAL RESULTS AFTER 26 AND 52 WEEKS OF OBSERVATION

Wojciech Ścierski<sup>1\*</sup>, Aleksandra Polok<sup>1</sup>, Grzegorz Namysłowski<sup>1</sup>, Jerzy Nożyński<sup>2</sup>, Lucyna Turecka<sup>1</sup>, Natalia Urbaniec<sup>1</sup>, Elżbieta Pamuła<sup>3</sup>

<sup>1</sup>OTOLARYNGOLOGICAL DEPARTMENT OF SILESIAN MEDICAL UNIVERSITY IN ZABRZE <sup>2</sup>HISTOPATOLOGICAL DEPARTMENT SILESIAN CENTER OF HEART DISEASE IN ZABRZE <sup>3</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, UNIVERSITY OF MINING AND METALLURGY IN CRACOW \*MAILTO: WOJSCIER@MP.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 47-49]

#### Introduction

Reconstruction of cartilage tissue defects in the head and neck region (trachea, larynx, external ear and nasal septum) is still a problem for plastic and otolaryngological surgeons. The scientists did not find the ideal methods of surgical technique as well as the proper biomaterial for the cartilage tissue reconstruction. In the literature described several attempts of application resorbable copolymer poly(L-lactide-co-glycolide) (PLG) and hyaluronate acid (Hyal) for the cartilage reconstruction [1-5]. The lack of information concerning the application of composite PLG and hyaluronate acid in the cartilage tissue reconstruction was the reason of our studies.

The aim of our study was to evaluate two different biomaterials with proper mechanical and biological features for cartilage tissue reconstruction in head and neck region.

#### Material and methods

. . . . . . . . . . . . . . . . . .

Two different type of biomaterials were used for our study: resorbable copolymer poly(L-lactide-co-glycolide) (PLG) and composite material consists of PLG and hyaluronate acid (Hyal). PLG was used as a scaffold. A thin layer of Hyal was deposited on the surface as well in the pore walls of PLG in order to provide biologically active molecules promoting differentiation and regeneration of the tissue. The studies were performed on the 50 animals - rabbits divided into 2 groups. The animals were operated in the general anesthesia. The incision was done along the edge of the rabbit's auricle. Perichondrium and cartilage of the auricle on the surface 4x3cm were prepared. Subperichondrically 1x1cm fragment of the cartilage was removed by the scissors. This fragment was then replaced by the biomaterials: PLG in the first group of 25 rabbits and PLG-Hyal in the second group 25 rabbits. The macroscopic and histological examination were done 26 and 52 weeks after the implantation. Biomaterials as well as the surrounding tissues were assessed. The statistical analysis comprised semi- quantity estimation of the inflammatory process, multinucleated resorbing cell, fibrosis and vascularization.



48

ten sam ubytek uzupełniono przy pomocy PLG-Hyal. Badając proces gojenia przeprowadzono ocenę makroskopową i histologiczną po 26 i 52 tygodniach obserwacji. Oceniono zarówno biomateriały, jak i otaczającą tkankę chrzęstną małżowiny usznej. Analiza statystyczna zmian mikroskopowych obejmowała ocenę półilościową, rangową obfitości nacieku zapalnego, obecności komórek resorpcyjnych wielojądrowych, włóknienia oraz waskularyzacji.

#### Wyniki i ich omówienie

#### Ocena makroskopowa biomateriału

We wszystkich przypadkach zwierząt stwierdzono makroskopowo prawidłowy proces wgajania obu biomateriałów polimerowych w tkankę chrzęstną małżowiny usznej królików. W przypadku PLG obserwowano większą chropowatość i nierówność powierzchni materiału oraz zmianę zabarwienia z białej na szarożółtą w odróżnieniu od gładkiej i białej powierzchni PLG-Hyal, wykazującego makroskopowo o wiele większe podobieństwo do tkanki chrzęstnej. Stwierdzono całkowite wypełnienie ubytku tkanki chrzęstnej przez oba biomateriały polimerowe, brak cech stanu zapalnego i martwicy wokół rany pooperacyjnej przez cały okres obserwacji zwierząt.

#### Badania histologiczne implantu

#### Dwudziesty szósty tydzień po implantacji

Półroczny okres poimplantacyjny charakteryzował się zmniejszeniem nasilenia odczynu zapalnego. W grupie po implantacji PLG ilość i wielkość ziarniniaków zmniejszała się - na obwodzie przybywało komórek tkanki łącznej przy zmniejszaniu się ilości komórek zapalnych, zwłaszcza limfocytów (RYS.1a). Chrząstka nie wykazywała zmian mikroskopowych, ochrzęstna ulegała włóknieniu, a pod ochrzęstną spotykano grupki komórek tkanki tłuszczowej żółtej (RYS.1b). W dwudziestym szóstym tygodniu po implantacji PLG-Hyal również dostrzegano włókniejące obwodowo ziarniniaki resorpcyjne z obecnością komórek wielojądrzastych, ze spadającą ilością limfocytów RYS.1c).

#### Pięćdziesiąty drugi tydzień po implantacji

Roczny okres obserwacyjny w przypadku polimeru PLG wykazywał wyraźnie postępujące włóknienie obrzeża ziarniniaków resorpcyjnych, ciągły spadek ilości limfocytów oraz obkurczanie się komórek wielojądrzastych (RYS.2a). Komórki te ulegały zmniejszeniu - wykazywały wzrost zasadochłonności cytoplazmy i obkurczenie się licznych jąder komórkowych. Wewnątrz ziarniniaków dostrzegano resztki bezpostaciowej cytoplazmy oraz fragmenty chro-

matyny. Powyższe obrazy sugerowały proces rozpadu komórek wielojądrowych na komórki mniejsze (RYS.2b). W przypadku rocznej obserwacji implantowanego polimeru PLG-Hyal podobnie pojawiało się włóknienie obwodowe ziarniniaków, podział komórek wielojądrzastych na mniejsze komórki z utratą i zagęszczeniem ich cytoplazmy. W odróżnieniu od grupy rocznej obserwacji PLG komórki olbrzymie posiadały więcej jąder komórkowych. Znacznemu zmniejszeniu uległa też liczba limfocytów - do pojedynczych komórek dostrzegalnych pod dużym powiększeniem (RYS.2c).

Wyniki badań histologicznych w przypadku PLG oraz PLG-Hyal wykazywały jednakowy przebieg wypełniania

#### **Results and discussion**

#### Macroscopic evaluation of biomaterials

In all the animals the proper macroscopic process of healing both biomaterials in to the auricle cartilage tissue were observed. In the case of PLG more roughness and unevenness surface as well as the changing of color from white to yellow-grey were stated in comparison to white and smooth surface of PLH-Hyal. The PLG-Hyal was macroscopically more similar to cartilage tissue then PLG. Although in all the cases total filling of cartilage defects, lack of strong inflammatory process and necrosis around the postoperative wound were found.

#### Histological evaluation of implants

#### 26th week after implantation of biomaterials

Six months of observation after biomaterial implantation was characterized by the decreasing of inflammatory process. In the group of PLG the amount and size of granulation was decreased – on the periphery the amount of connective tissue cells increased and the inflammatory cells decreased, especially lymphocytes (fIG.1a). In the cartilage we didn't find the pathological microscopic changes, the perichondrium was still fibrosis and in the subperichondrium layer the yellow fat cells were observed (FIG.1b). In 26th week PLG-Hyal observation period granulation tissue with periphery fibrosis and decreasing number of lymphocytes also were found (FIG.1c).

#### 52th week after implantation of biomaterials

52th week after implantation of PLG was characterized by the periphery granulation progressive fibrosis, lymphocytes amount decreasing and multinucleated cells contraction (FIG.2a). Inside the granulation cytoplasm remnants and fragments of chromatin were observed. These findings suggested degranulation of multinucleated cells on the smaller one (FIG.2b). In the case of PLG-Hyal the similar observation were stated – the periphery fibrosis of granulation and division of multinucleated cells. Unlike PLG, in the group with PLH-Hyal the multinucleated cells had more amount of nuclei. The distinct decreasing of lymphocytes amounts were also observed (FIG.2c).

The histological results in case of PLG as well as PLG-Hyal revealed the similar healing process and cartilage defects filling by both biomaterials. The tissues surround the biomaterials were characterized by the typical healing process with inflammatory reactions. The PLG-Hyal clearly accelerated resorption process and scar formation (especially in 26th week of observation).



RYS.1. Obraz histologiczny PLG (a, b) i PLG-Hyal (c) oraz tkanek otaczających w 26 tygodniu po implantacji. Barwienie H&E, powiększenie 200x (a,c), 50x (b).

FIG.1. PLG (a, b), PLG-Hyal (c) and surrounding tissues histological samples in 26th week after implantation. H&E staining. Magnification 200x (a,c), 50x (b).

ubytku chrzęstnego biomateriałem oraz powstanie rychłozrostu. Tkanki otaczające implantowane polimery charakteryzowały się typowymi sekwencjami bliznowacenia, włącznie z odczynem zapalnym, natomiast PLG-Hyal wyraźnie przyśpieszał proces resorpcji i powstawanie blizny (zwłaszcza w 26 tygodniu obserwacji). Badania własne wskazywały jednak na długotrwały proces resorpcyjny z udziałem licznych komórek wielojądrowych, w których powstawaniu brały udział komórki żerne oraz makrofagi.

Podsumowując, ocena własna obydwu materiałów polimerowych wykazała, iż w jednakowym stopniu pozwalają one na odtworzenie chrząstki. Zarówno PLG jak i PLG-Hyal stanowią dobry materiał

implantacyjny w rekonstrukcji ubytków tkanki chrzęstnej w obrębie twarzoczaszki.



In conclusion, the histological and macroanalysis examinations indicated that both biomaterials developed in this study have properties similar to cartilaginous tissue and seem to be good for her restoration. Although the quickest tissue regeneration was found after implantation of PLG-Hyal.

#### References

Piśmiennictwo

 Haisch A, Klaring S, Groger A, Gebert Ch, Sittinger M. A tissueengineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. Eur Arch Otorhinolaryngol 2002; 259: 316-321.
 Leiggener ChS, Curtis R, Muller AA, Pfluger D, Gogolewski S, Rahn BA. Influence of copolymer composition of polyactide implants on cranial bone regeneration. Biomaterials 2006; 27: 202-207.
 Ma Z, Gao Ch, Gong Y, Shen J. Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups. Biomaterials 2003;24: 3725-3730.

. . . . . . . . . . .

### WARSTWY AZOTOWANE JARZENIOWO NA STOPIE TYTANU Ti6AI4V DLA ZASTOSOWAŃ W KARDIOLOGII

T.Borowski<sup>1\*</sup>, A.Sowiński<sup>1,2</sup>, M.Ossowski<sup>1</sup>, E.Czarnowska<sup>2</sup>, T.Wierzchoń<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Materiałowej, ul. Wołoska 141, 02-507 Warszawa <sup>2</sup>Instytut "Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka", Zakład Patologii, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa \*MAILTO: tborowsk@inmat.pw.edu.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 49-51]

#### Wprowadzenie

Stopy tytanu są szeroko stosowane w przemyśle medycznym głównie na narzędzia chirurgiczne oraz na implanty, płytki i śruby do mocowania kości oraz endoprotezy stawu biodrowego lub kolanowego [1,2]. Ich zastosowanie jest często ograniczone niewystarczającą twardością i odpornością na zużycie przez tarcie [3]. Perspektywicznym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie azotowania jarzeniowego w obszarze plazmy. Proces ten umożliwia wytworzenie warstw o jednorodnej mikrostrukturze na całej [4]. Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. Biomaterials 1994; 15(10): 774-778.

[5]. Gugala Z, Gogolewski S. Differentiation, growth and activity of rat bone marrow stromal cells on resorbable poly (L/DL-lactide) membranes. Biomaterials 2004; 25: 2299-2307.

### GLOW DISCHARGE NITRIDED LAYERS ON TI6AI4V ALLOY INTENDED FOR CARDIOVASCULAR APPLICATIONS

T.Borowski<sup>1\*</sup>, A.Sowiński<sup>1,2</sup>, M.Ossowski<sup>1</sup>, E.Czarnowska<sup>2</sup>, T.Wierzchoń<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Warsaw University of Technology, Faculty of Materials Science and Engineering, 141 Woloska Str., 02-507 Warsaw, Poland <sup>2</sup>Children's Memorial Health Institute, Department of Pathology, 20 Dzieci Polskich Av, 04-730 Warsaw, Poland \*MAILTO: tborowsk@inmat.pw.edu.pl

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 49-51]

#### Introduction

Titanium alloys are widely used in medical industry chiefly for the manufacture of implants, plates, bone-fastening screws, and prostheses of the hip and knee joints and also medical instruments [1,2]. However, the insufficient hardness and poor frictional wear resistance of these alloys often restricts their application range [3]. A remedy for this drawback seems



RYS.2. Obraz histologiczny PLG (a, b) i PLG-Hyal (c) oraz tkanek otacza-

powierzchni elementów z eliminacją efektu krawędziowego. Warstwy tego typu posiadają tę samą grubość, twardość, chropowatość oraz skład chemiczny na środku i na krawędzi próbki [4]. Dobre właściwości mechaniczne oraz biologiczne warstw typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) na stopie Ti6Al4V sprawiają, że mogą być materiałem z powodzeniem stosowanym na elementy sztucznego serca. W danych literaturowych [5,6] wykazano biozgodność warstwy azotku tytanu (TiN) w kontakcie z krwią oraz zwiększoną trwałość zastawek serca wykonanych z tych materiałów. Aktualnie warstwa azotku tytanu (TiN) jest rozpatrywana pod względem zastosowania na materiał pracujący w kontakcie z krwią wykazujący dobre właściwości mechaniczne.

#### Metodyka badań

Warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) zostały wytworzone w procesie azotowania jarzeniowego w obszarze plazmy stopu tytanu Ti6Al4V. Warstwy były azotowane w temperaturze 800°C przez 4 godziny w atmosferze czystego azotu. Badany stop tytanu posiadał następujący skład chemiczny w %wag.: C<0,08%, Fe<0,25%, N<sub>2</sub><0,05%, O<sub>2</sub><0,2%, Al :5,5–6,76%, V:3,5–4,5%, Ti–reszta. Przed procesem azotowania jarzeniowego próbki poddano polerowaniu mechanicznemu z zastosowaniem zawiesiny diamentowej i koloidalnej tlenku krzemu.

Mikrostruktura warstw w przekroju poprzecznym i od powierzchni, a także ilość, morfologia oraz akumulacja płytek zaadherowanych na powierzchni badanych materiałów były analizowane przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego Hitachi S-3500N. Chropowatość powierzchni preparatów mierzono przy pomocy optycznego profilometru Wyko NT9300. Badania in vitro wykrzepiania krwi na warstwach typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) były przeprowadzone w warunkach statycznych. W tym celu przygotowano bogatopłytkowe osocze (PRP - platelets-rich plasma). Próbki ze stopu tytanu Ti6Al4V w stanie wyjściowym i z warstwą TiN z nałożonym PRP (50µl) poddano inkubacji w temperaturze 37°C przez 20min i 2godz. Następnie niezaadherowane płytki usuwano przez przepłukiwanie. Zaadherowane na powierzchni badanych materiałów płytki utrwalano metodą rutynową do badań mikroskopowo-elektronowych. Próbki napylone powłoką złota o grubości ok. 10nm oglądano i fotografowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego. Do analiz adhezji płytek zebrano po 15 obrazów z różnych miejsc z każdej próbki, a do zliczania ilości płytek wykorzystano morfometryczny program CellP firmy Olympus.

#### Wyniki badań

Warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) wytworzone w procesie azotowania jarzeniowego w obszarze plazmy posiadały grubość ok. 8µm. Strefa związków TiN+Ti<sub>2</sub>N posiadała grubość nieprzekraczającą 2µm (RYS.1A). Twardość tych warstw wahała się w granicach 1200HV0,05 i była ona o około 3 razy większa od stanu wyjściowego (415HV0,05).

Parametry sterometryczne warstw TiN wynosiły: Ra=138nm, Rq=180nm (RYS.1B), a w przypadku wypolerowanych próbek w stanie wyjściowym odpowiednio 35nm i 45nm.

Wyniki badań biologicznych wykazały mniejszą adhezję płytek krwi na warstwie TiN po 20min. inkubacji, a także po 2 godz. (RYS.2A) oraz mniejszą ilość skrzepów niż na referencyjnym stopie tytanu (RYS.2B). Płytki na powierzchni warstwy TiN były mniej rozpłaszczone (RYS.3A) niż w przypadku płytek na materiale wyjściowym (RYS.3B) i charakteryzowała je obecność cienkich pojedynczych wypustek. to be glow discharge assisted nitriding of their surface in the plasma region. This process enables producing layers with a homogeneous microstructure on the entire surface without the edge effect. The layers have the same thickness, hardness, roughness and chemical composition equally at the centre and at the edge of the samples [4]. Thanks to the good mechanical and biological properties of the TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) layers formed on the Ti6Al4V alloy, the thus treated alloy can be used successfully for the manufacture of the components of artificial hearts. The literature reports [5,6] show that the titanium nitride (TiN) layers are biocompatible with human blood and prolong the service life of the heart valves made of the titanium alloy.

#### **Examination methods**

The TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N)-type layers were produced on the Ti6Al4V titanium alloy by glow discharge assisted nitriding in the plasma region. The nitriding process was conducted at a temperature of 800°C in an atmosphere of pure nitrogen for 4 hours. The chemical composition of the titanium alloy was (in wt%): C<0.08%, Fe<0.25%, N2<0.05%, O2<0.2%, Al:5.5 to 6.76%, V:3.5 to 4.5%, Ti-balance. Prior to the glow discharge nitriding, the samples were polished mechanically using a diamond suspension and a colloidal silicon oxide suspension.

The microstructure of the nitrided layers, on both their cross-sections and surfaces, as well as the number, morphology, and accumulation of blood platelets adhered to their surface were analyzed in a Hitachi S-3500N scanning electron microscope. The roughness of the sample surface was examined with a Wyko NT9300 optical profilometer. The blood coagulation on the TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) layers was examined in vitro under static conditions using a specially prepared platelet-rich plasma (PRP). The Ti6Al4V samples in the starting state and those with the TiN layer were covered with the PRP (50µl) and then incubated at a temperature of 37°C for 20 min and 2 hours. Then the platelets not adhered to the surface were removed by rinsing. The adhered platelets were fixed by the routine method. Than the specimens were evaporated with a gold coating about 10nm thick and observed in a scanning electron microscope. The adhesion of the platelets was examined by analyzing fifteen SEM photographs taken from various places, whereas their number was calculated using the Olympus Cellp morphometric computer program.

#### Results

The layers of the TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) type produced by glow discharge assisted nitriding in the plasma region were about 8µm thick. The thickness of the TiN+Ti<sub>2</sub>N zone did not exceed 2µm



RYS.1. Struktura i morfologia warstwy TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) na stopie tytanu Ti6Al4V na przekroju poprzecznym (A) i na powierzchni (B) warstwy.

FIG.1. Structure and morphology of a TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) layer produced on the Ti6Al4V titanium alloy as observed on a cross-section (A) and surface (B) of the layer.



RYS.2. Ilość płytek (A) i skrzepów (B) na powierzchni warstwy TiN i stopu tytanu Ti6Al4V po 20min inkubacji w PRP.

FIG.2. Number of the platelets (A) and blood clots (B) present on the TiN layer surface and the Ti6Al4V titanium alloy surface after 20min of incubation in PRP.



RYS.3. Morfologia płytek i skrzepów na warstwie TiN (A) oraz na stopie Ti6Al4V (B) po dwóch godzinach inkubacji w PRP.

FIG.3. Morphology of the blood platelets and clots observed on the TiN layer (A) and the Ti6Al4V alloy (B) after 2h of incubation in PRP.

#### Podsumowanie

Warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) wytworzone w procesie azotowania jarzeniowego w obszarze plazmy charakteryzują się jednorodną strukturą na całej powierzchni elementów. Morfologia, struktura oraz chropowatość warstwy TiN mają szczególne znaczenie w aspekcie eliminacji wykrzepiania krwi. Bazując na wstępnych badaniach in vitro warstw TiN można stwierdzić, że materiał ten wykazuje dobrą hemozgodność Przeciwdziałanie wykrzepianiu krwi powierzchni warstwy TiN pozwala zakwalifikować ten materiał jako perspektywiczny w aspekcie zastosowań biomedycznych. Jednakże zagadnienie to wymaga dalszych szczegółowych badań.

#### Podziękowanie

Badania zrealizowane w ramach projektu MNiSzW nr 01/WR/PO1/001/SPB-PSS/2008.

(FIG.1A). The hardness of the layers ranged from 1200HV0.05 which was about three times as high as that of the titanium alloy in the starting state (415HV0.05).

Stereometric parameters of the TiN layers were: Ra=138nm, Rq=180nm (FIG.1B), whereas in the polished samples these parameters were 35nm and 45nm, respectively.

The biological examinations have shown that, irrespective of whether the incubation lasted for 20 min or 2h, the numbers of the blood platelets (FIG.2A) adhered to the TiN layer and of the blood clots (FIG.2B) were smaller than those observed on the surface of the reference Ti6Al4V alloy. The platelets adhered to the surface of the TiN layer were less flattened (FIG.3A) than those adhered to the starting material (FIG.3B) and were characterized by the presence of not numerous thin pseudopodium.

#### Conclusions

The TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) type layers produced on the Ti6Al4V titanium alloy by glow discharge assisted nitriding in the plasma region have a homogeneous structure on the entire surface of the alloy sample. The morphology, structure and roughness of the TiN layers are of particular significance when the blood platelets adherence is considered. Based on the preliminary in vitro examinations we can state that the TiN layers show good haemocompatibility. They also reveal antithrombogenic properties which permits us to qualify these layers as a prospective material for biomedical applications. They however require further studies.

#### Acknowledgement

The research work was supported by Ministry of Science and Higher Education No. 01/WR/PO1/001/SPB-PSS/2008.

### Piśmiennictwo

[1] Mohammadi S., Esposito M., Wictorin, L., et al.: Bone response to machined cast titanium implants. Journal of Materials Science 36 (2001) 1987–1993.

[2] Wang K.: The use of titanium for medical applications in the USA. Materials Science and Engineering A213 (1996) 134–137.

[3] Feng C., Khan, T. I.: The effect of quenching medium on the wear behaviour of a Ti6Al4V alloy. Journal of Materials Science 43 (2008) 788–792. [4] Ossowski M., Borowski T., Wierzchoń T.: Analiza struktury warstw azotowanych wytworzonych na stopie tytanu w różnych obszarach wyładowania jarzeniowego. Inżynieria Materiałowa

References

2009 – w druku
[5] Dion I, Roques X, More N et al.: Exvivo leukocyte adhesion and protein adsorption on TiN. Biomaterials 14 (1993) 712–719.
[6] Dion I, Rouais F, Trut L et al.: TiN coating: surface characterization and haemocompatibility. Biomaterials 14 (1993) 169–176.

52

### WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI TIN METODĄ LITOGRAFII NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ KOMÓREK

A.Zajączkowska<sup>1\*</sup>, M.Brudek<sup>1</sup>, J.Bierła<sup>2</sup>, T.Borowski<sup>3</sup>, R.Lappalainen<sup>4</sup>, T.Wierzchoń<sup>3\*</sup>, E.Czarnowska<sup>1</sup>

#### <sup>1</sup>ZAKŁAD PATOLOGII,

INSTYTUT "POMNIK - CENTRUM ZDROWIA DZIECKA", AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSZAWA, POLSKA <sup>2</sup>WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ, SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO, UL. NOWOURSYNOWSKA 166, 02-787 WARSZAWA, POLSKA <sup>3</sup>WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA, POLSKA <sup>4</sup>DEPARTMENT OF PHYSICS, UNIVERSITY OF KUOPIO, FINLAND \*MAILTO: CZAR@CZD.WAW.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 52-54]

#### Wstęp

Biomateriał z warstwą wytworzoną na stopie tytanu Ti6Al4V zawierającą TiN w strefie zewnętrznej charakteryzuje się dużą biozgodnością z osteoblastami [1]. Powszechnie wiadomo, że rozwinięcie powierzchni biomateriału metodą litografii zmienia aktywność biologiczną komórek [2]. Dlatego dla poprawy połączenia implantu z kością oraz biozgodności z błoną śluzową powierzchnia TiN została poddana rytowaniu. Stąd celem pracy było zbadanie bioaktywności osteoblastów i fibroblastów, komórek warunkujących prawidłową integrację wszczepu tytanowego z kością.

#### Materiały i metody

Warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) wytworzono na stopie tytanu Ti6Al4V w procesie azotowania w warunkach wyładowania jarzeniowego, a następnie były poddane rytowaniu. Próbki niemodyfikowane były materiałem referencyjnym.

Ludzka linia osteoblastyczna Saos-2 i fibroblasty pobrane z ludzkiej skóry były hodowane na badanych biomateriałach przez 24 godziny oraz 2, 6 i 12 dni. Biozgodność materiałów badano za pomocą: skaningowego mikroskopu elektronowego (analiza morfologii i rozmieszczenia komórek), mikroskopu konfokalnego (uwalnianie fibronektyny i ekspresja receptora dla fibronektyny CD 49e), technik ELISA (badanie poziomu cytokin IL-1, IL-6) oraz testu MTT (proliferacja komórek) i testu ALP (aktywność komórek). Wymieniowe techniki badawcze zostały opisane w publikacji [2].

#### Wyniki

Metodą litografii wytworzono na powierzchni warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) zagłębienia o średnicy 123µm. Badania struktury warstwy wykazały jej dyfuzyjny charakter oraz nanokrystaliczną strukturę zewnętrznej strefy TiN.

Komórki osteoblastyczne linii Saos-2 hodowane na modyfikowanej powierzchni TiN były silnie rozpłaszczone i zaokrąglone na obwodzie oraz nie tworzyły wypustek. Komórki te w pierwszej dobie inkubacji nie adherowały w wytworzonych zagłębieniach a jedynie na powierzchni warstwy pomiędzy nimi (RYS.1A). Zadherowane komórki charakteryzowała wysoka ekspresja receptorów CD49e oraz synteza fibronektyny (RYS.2A,B). Wykazywały także wyższy potencjał proliferacyjny niż komórki zadherowane

### THE EFFECTS OF TIN MODIFICATION BY LITHOGRAPHY ON CELLS BEHAVIOR

A.Zajączkowska<sup>1\*</sup>, M.Brudek<sup>1</sup>, J.Bierła<sup>2</sup>, T.Borowski<sup>3</sup>, R.Lappalainen<sup>4</sup>, T.Wierzchoń<sup>3\*</sup>, E.Czarnowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pathology Department., The Children's Memorial Health Institute, 20 Dzieci Polskich Ave., 04-730 Warsaw, Poland <sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University, 166 Nowoursynowska str., 02-787 Warsaw, Poland <sup>3</sup>Faculty of Materials Sciences and Engineering, Warsaw University of Technology, 141 Woloska str., 02-507 Warsaw, Poland <sup>4</sup>Department of Physics, University of Kuopio, Finland \*MAILTO: czar@czd.waw.pl

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 52-54]

#### Introduction

It's generally accepted that lithography modified surface influences on biological cell activity and spreading [1]. The facts of high biocompatibility of the TiN, present in the external zone of surface layer produced on Ti6Al4V alloy, with osteoblasts give input for its further modifying by lithography to promote bone- bonding behavior [2].

The aim of this study was testing significance of TiN surface modification by lithography for cell bioactivity related to osteoconductivity.

#### Materials and methods

The surface layers  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  type were produced by glow discharge nitriding process on titanium alloy Ti6Al4V and then engraved by lithography. Samples without engraving were reference material.

Human osteoblast-like cells Saos-2 line and skin fibroblasts were cultured on tested samples by 24 hours and 2,6 and 12 days. The biocompatibility of the tested materials was verified by using scanning electron microscope (analysis of cell morphology and distribution), confocal microscope (release of fibronectin and CD49e expression), ELISA technique (cytokines IL-1, IL-6), and applying MTT test (cell proliferation) and ALP test (cell activity) presented in details in previous papers [2].

#### Results

Regularly distributed hollows of diameter 123  $\mu$ m were present on TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ T(N) layers. Investigation showed diffusion character of this surface layer and nanocrystalline structure of the TiN outer zone.

Osteoblast cells Saos-2 cultured on the engraving TiN were flattened or round shape and distributed mainly between hollows (FIG.1A). They were characterized by: disperse expression of fibronectin (FIG.2A,B) and condensed CD49e receptors (not shown) and exhibited higher proliferation when compared with osteoblasts adhered to the reference material (FIG.3A).



RYS.1. Rozmieszczenie i morfologia osteoblastów linii Saos-2 (A, B) i fibroblastów (C, D) na warstwach typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) po (A, C) i przed (B, D) litografią.

FIG.1. Distribution and morphology osteoblast Saos-2 line (A, B) and fibroblasts (C, D) on the surface layers  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  type after (A, C) and before (B, D) engraved by lithography.



RYS.2. Rozmieszczenie fibronektyny produkowanej przez osteoblasty linii Saos-2 (A, B) i fibroblasty (C) na warstwie TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) po (A) i przed (B, C) litografią.

FIG.2. Distribution of fibronectin produced by osteoblast cell Saos-2 line (A, B) and fibroblasts (C) on the surface layers  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  type after (A) and before (B, C) engraved by lithography.



RYS.3. Biologiczna aktywność osteoblastów linii Saos-2 hodowanych na warstwie typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) przed i po litografii. A – proliferacja komórek, B – stężenie ALP w mediach hodowlanych. FIG.3. Biological activity of osteoblast Saos-2 line cultured on the surface layers TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) type after and before engraved by lithograpthy A – cell proliferation, B – concentration ALP in culture medium.

na materiale referencyjnym (RYS.3A).

Osteoblasty hodowane na referencyjnych próbkach były różnokształtne lub okrągłe i tworzyły bardzo cienkie wypustki (RYS.1B). Receptory dla fibronektyny (CD 49e) zlokalizowane błonie komorkowej były rozproszone. Stężenie fosfatazy zasadowej (ALP), enzymu związanego z procesami kościotworzenia, w mediach inkubacyjnych zebranych z nad hodowli prowadzonych na obydwóch materiałach były podobne (RYS.3 B) podczas gdy poziom cytokin IL-1 i IL-6 był poniżej czułości testu.

Fibroblasty hodowane na badanych biomateriałach były równomiernie rozmieszczenie na całej powierzchni zarówno próbek poddanych litografii jak i kontrolnych. Na powierzchni próbek modyfikowanych komórki adherowały również w wytworzonych zagłębieniach (RYS.1C,D).Komórki miały Osteoblasts on reference samples were polymorphic or spherical with needle-like protrusion (FIG.1B) and had dispersed adhesion receptors. The ALP concentration in media retrieved form osteoblasts cultured on both type of samples was similar (FIG.3B), while cytokines IL-1 and IL-6 were not found in any time point.

Investigations of fibroblasts showed their regular distribution without restraint to area between hollows (Fig.1C,D). Adhered cells were spindle or polymorphic shape and exhibited increased expression of CD49e receptor. They produced fibronectin biofilm forming a fibrillar network (Fig. 2C). There were no found differences in cell behavior in populations incubated on both engraved and reference material.

Conclusions. Data suggest that osteoblast adherent to

różny kształt i wykazywały silną ekspresję receptora dla fibronektyny (CD49e) oraz intensywnie syntezowały i wydzielały fibronektynę. Wydzielana fibronektyna tworzyła na powierzchni biomateriałów włókienkowy biofilm (RYS.2C). Nie obserwowano różnic w proliferacji fibroblastów inkubowanych na rytowanych i referencyjnych biomateriałach.

#### Wnioski

Badania wykazały, że rytowana powierzchna biomateriału tytanowego modyfikuje aktywność biologiczną osteoblastów ale nie fibroblastów. Wytworzone zagłębienia chociaż ograniczają dostępną dla osteoblastów powierzchnię to jednak aktywują ich proliferację. Może to być efektem przebudowy receptorów błonowych. Specyficzne zachowanie komórek na powierzchniach modyfikowanych litograficznie jest znanym faktem opisanym w literaturze [3]. Uważa się, że przyczyną jest zmieniona interakcja komórek z powierzchnią materiału. Obserwowana przez nas zmniejszone powinowactwo osteoblastów w porównaniu z fibroblastami do rytowanych powierzchni jest zgodne z danymi literaturowymi [4] i może być wykorzystane w przyszłości dla obróbki powierzchni implantów kontaktujących się z kością i błoną śluzową.

#### Podziękowania

Badania były finansowane z projektu: PB-117/ ERA/2006/02/01.

### BADANIA POWIERZCHNI PANEWKI STAWU BIODROWEGO PO DZIESIĘCIU LATACH KONTAKTU Z OGRANIZMEM

M.Cieślik<sup>1</sup>, K.Mlekodaj<sup>1</sup>, A.M.Janus<sup>2</sup>, T.Łojewski<sup>1</sup>, K.Engvall<sup>3</sup>, A.Kotarba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Ingardena 3, 30-060 Kraków, Polska, cieslik@chemia.uj.edu.pl

<sup>2</sup>Instytut Metalurgii I Inžynierii Materiałowej, PAN, W. Reymonta 25, 30-059 Kraków, Polska

<sup>3</sup>Swerea KIMAB AB. P. .O., Box 55970, Se-10216 Sztokholm, Szwecja

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 54-56

#### Wstęp

Z roku na rok wzrasta zapotrzebowanie na operacje wszczepiania implantów stawu biodrowego zarówno dla pacjentów w każdym przedziale wiekowym jak i na każdym poziomie życia. Wzrasta również zapotrzebowanie na operacje wymiany endoprotez. Przeciętna długość życia stosowanych implantów stawu biodrowego wacha się w przedziale 10–15 lat. Jednak przy obecnym wzroście poziomu życia ludzi czas ten jest za krótki, w szczególności gdy wymagana jest re-operacja, która wiąże się często z komplikacjami. Najczęstszą przyczyną wszczepienia implantu jest choroba zwyrodnieniowa. Większość engraving surface may possess altered motility compared with cell on control surface and fibroblasts. This might be results of receptor remodeling. Specific cellular behavior on lithography modified surfaces is known fact [3]. The reason are changes of initial cells interaction with surface. Our finding of diminished affinity of ostoblasts when compared to fibroblast to engraving surface is in agreement with literature data [4] and could be valuable in future engineering of implant-bone-mucosa interface.

#### Acknowledgements

This study was financed by project: PB-117/ ERA/2006/02/01.

#### Piśmiennictwo

#### References

[1]. Czarnowska E., Sowińska A., Cukrowska B., Wierzchoń T. Response of human osteoblast like cells and fibroblast to titanium alloy nitrided under glow discharge. Mat. Sci. Forum. (2005) 475-479: 2415-18

[2]. Czarnowska E., Zajączkowska A. et. al. Composite layer with Ti3P external zone produced on titanium alloy for bone applications, Adv.

Science Technol. 49 (2006) 240

. . . . . . . . . . . . . . . . .

[3]. Hart A., Gadegaard N., Wilkinson CDW., et al. Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam lithography. J mater Sci Mater Med 18 (2007)1211-18

[4]. Webster TJ., Ergun C., Doremus RH., et al. Specific proteins mediate enhanced ostoblast adhesion on nanophase ceramics. J Biomed Mater Res. 52 (2000) 475-83

### INVESTIGATIONS OF A HIP JOINT SURFACE AFTER 10 YEARS OF USE IN VIVO

M.Cieślik<sup>1</sup>, K.Mlekodaj<sup>1</sup>, A.M.Janus<sup>2</sup>, T.Łojewski<sup>1</sup>, K.Engvall<sup>3</sup>, A.Kotarba<sup>1</sup>

\* Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Ingardena 3, 30-060 Krakow, Poland, cieslik@chemia.uj.edu.pl

\*\* Institute of Metallurgy and Materials Science, PAS, W. Reymonta 25, 30-059 Krakow, Poland

\*\*\* Swerea KIMAB AB. P. .O., Box 55970, Se-10216 Stockholm, Sweden.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 54-56]

#### Introduction

Hip replacement therapy is increasingly common for patients of all ages and lifestyles, and with it the number of hip implants which must themselves be replaced due to failure. Current hip implants have lifetimes of the order of 10-15 years, but as human life (and quality of life) expectancy increases this is becoming inadequate, particularly as a second replacement operation is frequently much more difficult, and normally has a worse prognosis. The most frequent cause of surgical intervention is hip osteoarthritis [1,2]. Hip arthroplasty is an orthopedic procedure that involves the surgical excision of the head and proximal medullar obecnie przeprowadzanych zabiegów związana jest z protezoplastyką stawu biodrowego [1,2]. Protezoplastyka stawu biodrowego polega na implantacji trzpienia protezy do wnętrza kanału szpikowego kości udowej. Wcześniej odcina się szyjkę wraz z głową kości oraz usuwa zniszczoną powierzchnię stawową panewki i osadza tam panewkę polietylenową lub metalową.

Pomimo tak dużej ilości przeprowadzanych implantacji stawu biodrowego w literaturze jest niewiele doniesień poświęconych implantom usuniętym z organizmu człowieka [3,4].

Celem badań była analiza stanu chemicznego zużytej, tytanowej panewki stawu biodrowego.

#### Eksperyment

Przedmiotem badań była panewka biodrowa typu pressfit ze stopu tytanu (RYS.1.), wyposażona w gwint samotnący na obrzeżu (BIO-MET). Pozostała powierzchnia pokryta była porowatą powłoką tytanową uzyskaną poprze napylenie metodą plazmową w próżni. Na powierzchni mającej bezpośredni kontakt z kością zaobserwowano wyraźny biały nalot. Po usunięciu po dziesięciu latach z organizmu 60-cio letniej kobiety, panewkę oczyszczono

wodą i przemyto etanolem. Powodem usunięcia implantu było obluzowanie polietylenowej wkładki.

Powierzchnia implantu była analizowana skaningowym mikroskopem elektronowym (FEI E-SEM XL30), spektrometrem EDS (EDAX Genesis 4000) i spektroskopem fluorescencji rentgenowskiej (ED-XRF, model Quant'x, ARL/THERMO). Analiza składu fazowego osadu była przeprowadzona przy pomocy dyfrakcji promieni X (PW3710 Philips).

#### Wyniki i dyskusja

Analizowana panewka była charakteryzowana przy pomocy skaningowej mikroskopii elektronowej, dzięki której zaobserwowano duże zróżnicowanie powierzchni i ujawniono istotne zmiany po dziesięciu latach kontaktu z kością.

Obserwacje mikroskopowe przedstawiają małe zmiany na powierzchni w miejscach gdzie panewka nie miała dużego kontaktu z kością (RYS.2a), podczas gdy w miejscach bezpośredniego kontaktu zaobserwowano formowanie się osadu w postaci wysp (RYS.2b.). Osad ten występował w postaci krystalitów o wielkości 440-930µm.

Analiza składu zarówno samej powierzchni panewki jak i osadu na jej powierzchni była wykonana przy pomocy spektroskopii fluorescencyjnej (XRF) i lokalnie przy pomocy

metody EDXS (RYS.3.). Zarówno wyniki XRF jaki i

przeprowadzona niezależnie analiza EDXS dawały podobne rezultaty, co świadczy o homogeniczności materiału. Zgodnie z wynikami głównymi pierwiastkami występującymi na powierzchni analizowanej panewki jest tytan, wanad i glin (z dodatkiem węgla i tlenu) co odpowiada składowi pierwiastkowemu stopu tytanu. Jednakże, analiza EDXS wykonana w miejscach gdzie był osad



RYS.2. Zdjęcia SEM (20kV) różnych miejsc ( a – z osadem, b - bez białego osadu) badanej powierzchni panewki stawu biodrowego.

FIG.2. 20kV SEM images of different places (a - without and b - with the white deposit) of the investigated implant surface.

region of the femur removal of the acetabular cartilage and subchondral bone. An artificial canal is created in the proximal medullary region of the femur, and a metal femoral prosthesis, composed of a steam and head, is inserted into the femoral medullary canal. Regardless of the common applications of this kind of implants, relatively few studies on used implants are reported in the literature [3,4]. The aim of the present study was to investigate a Ti-Al-V alloy socket of a used hip joint implant to evaluate the chemical state of its surface.

#### Experimental

The investigated object is a press-fit type acetabular socket of a hip joint implant, FIG.1, made of a Ti-Al-V alloy, with a self-cutting thread and a surface covered with a

> RYS.1. Zdjęcie analizowa- rous titanium layer nej panewki stawu biodro- (BIOMET). To rewego Ti-AI-V usuniętej po tain the unchanged 10 latach z ciała. FIG.1. Photography of the implant was only investigated socket of the cleaned with water hip joint Ti-AI-V implant and rinse with etharemoved from the body nol after removal after 10 years

plasma sprayed posurface state the from the body. The reason for its removal from a 60-

years old woman was a wear-out of the polyethylene part of the acetabular socket.

The implant surface was characterized by scanning electron microscopy (FEI E-SEM XL30), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDAX Genesis 4000)) and X-ray fluorescence spectroscopy (ED-XRF, model Quant'x, ARL/THERMO). Additionally, the phase composition of the surface deposit was determined by using X-ray powder diffraction (PW3710 Philips).

#### Results and discussion

The performed surface analysis displayed large diversity in morphology in different surface areas of the implanted material and reveal substantial changes on the surface after 10 years in contact with the bone.

The SEM observations demonstrate relatively small changes of the surface in places where the socket was not in contact with the bone, Fig. 2a, whereas in places where this contact was intimate, a characteristic island-like deposit was formed, Fig2b. The deposit is a crystalline substance with a crystallite size in the range of 440-930µm.

The elemental composition of the both alloy and surface deposit was analyzed by X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) and locally by means of EDXS analysis, FIG.3.

> The main constituting elements of the socket surface were titanium, aluminum and vanadium (with traces of carbon and oxygen), corresponding to the composition of the titanium alloy. The XRF results were in-line with the independent EDXS analysis, which means that the material is chemically homogeneous.

However, the EDXS showed that in the places with the deposit, the main elements found were calcium, phosphorus and oxygen (in this case the higher concentration



56

powanie takich pierwiastków jaki: wapń, fosfor i tlen (w tym przypadku C Kα duża koncentracja węgla świadczy o pozostałościach materiałów organicznych).



Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego była wykonana w celu analizy składu fazowego osa-

białego osadu) badanej powierzchni panewki korespondująca z odpowiednimi zdjęciami SEM (RYS.2a i 2b). FIG.3. EDXS elemental analysis of different places (a - without and b - with the white deposit) of the investigated implant surface corresponding to images shown in 2a and 2b, respectively.

FIG.4.

Х ray diffraction technique was used to identify the phase

du. Osad był zeskrobany z powierzchni analizowanej panewki, mielony w moździerzu agatowym a następnie w młynku kulowym przez 20 godzin. Analiza otrzymanego proszku wykazała, że biały osad na powierzchni panewki to hydroksyapatyt o wzorze stechiometrycznym Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> (RYS.4.).

#### Wnioski

Stwierdzono, że bezpośrednia interakcja między kością a powierzchnią implantu o strukturze porowatej jest decydującym czynnikiem sprzyjającym tworzeniu się na powierzchni warstewki hydroksyapatytu. Powstała warstewka hydroksyapatytu świadczy o charakterze bioaktywnym analizowanej panewki stawu biodrowego

#### Podziękowania

Autorzy pragną podziękować panu mgr. M. Michalcowi za wykonanie pomiarów XRD.

Projekt realizowany w ramach programu Ventures Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej – Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.



RYS.4. Dyfraktogram (XRD) bada-

Fig. 4. XRD pattern of white depo-

droxyapatite confirms the bioactive nature of the investigated hip joint cup.

#### Acknowledgements

Autors would like to thank a Mr. Michalec for XRD analysis.

It can be concluded that the direct

interaction between a bone and the

Ti-Al-V implant surface finished by the

plasma spray is a crucial factor for the

precipitation of calcium phosphate. The

observed formation of a surface hy-

Project operated within the Foundation for Polish Science Ventures

References

Programme, co-financed by the EU European Regional Development Fund.

composition of the crystallite deposit. The substance was

scraped out from the socket surface and crumbled in an

agate mortar, and then milled in a ball mill for 20 hours. The

results revealed that the white deposit is a hydroxyapatite

with the stoichiometry close to that of  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ,

Conclusions

#### Piśmiennictwo

[1.] S.Rdelli, D.Uip, E.Honda, A.L.Lima: One-Stage revision of infected total hip arthroplasty with bone graft; The Jurnal of Arthroplasty No.8 Vol.23 2008;

[2]. J.S. Siopack, H.E. Jergesen: Total hip arthroplasty.West J Med 1995; 162:243-249;

[3]. E. Krasicka-Cydzik, J. Mstowski, L.F. Ciupik: Materiały implantowe: stal a stopy tytanu.

[4]. J. Łaskawiec, R. Michalik: Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach; Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002



nego osadu.

sit.

### OCENA GOJENIA UBYTKÓW KOSTNYCH ŻUCHWY KRÓLIKÓW WYPEŁNIONYCH TWORZYWEM KALCYTOWYM – BADANIA WSTĘPNE

Magdalena Cieślik<sup>1</sup>, Marek Adwent<sup>2</sup>, Daniel Sabat<sup>3</sup>, Zbigniew Jaegermann<sup>4</sup>, Paweł Tarabuła<sup>2</sup>, Rajmund Orlicki<sup>1</sup>, Tadeusz Cieślik<sup>2</sup>

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach <sup>1</sup>Katedra i Zakład Materiałoznawstwa Stomatologicznego W Bytomiu,

<sup>2</sup>katedra I Klinika Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej w Katowicach,

<sup>3</sup>KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII W ZABRZU,

<sup>42</sup>Instytut Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych w Warszawie, Zakład Bioceramiki

#### Streszczenie

W badaniach doświadczalnych wykonanych na 28 królikach użyto węglanu wapniowego w odmianie krystalograficznej aragonitu(CaCO<sub>3</sub>). Badany materiał wszczepiono w twardą tkankę zwierząt doświadczalnych. Zaplanowano wykonanie obserwacji klinicznych przebiegu gojenia ran, a po ich zabiciu badań radiologicznych, makroskopowych i histopatologicznych w 3, 7 i 14 dobie, oraz 3, 4, 6 i 12 tygodniu doświadczenia. Wstępne wyniki badań wykazały, iż badany materiał nie wywołuje zarówno miejscowych jak i ogólnoustrojowych negatywnych reakcji, a proces gojenia ran kostnych w jego obecności przebiega prawidłowo. Ponadto wraz z upływem czasu ulega stopniowemu rozkładowi, z następującą równocześnie odbudową tkanki kostnej w miejscu jego usytuowania.

Słowa kluczowe: biomateriały, ceramika, węglan wapniowy, badania in vivo na zwierzętach

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 57-61]

#### Wprowadzenie

Współczesna medycyna, a w szczególności ortopedia, chirurgia szczękowo - twarzowa, periodontologia, w coraz większym zakresie posługuje się materiałami zastępczymi pozwalającymi na uzupełnienie lub odtworzenie brakujących struktur [1]. Są to najczęściej ubytki tkanki kostnej powstałe po urazach, torbielach kostnych, nowotworach, czy też zmianach zwyrodnieniowych. O ile jest to możliwe, ubytki takie uzupełniane są chętnie i skutecznie kością własną pacjenta, lub też pobieraną z banku kostnego [2]. Nie zawsze jednak stan ogólny pacjenta pozwala na pobranie od niego samego kości, lub też jakość kości na skutek toczącej się osteoporozy jest właściwa. Wtórna kość ulega po wszczepieniu w krótkim czasie przebudowie, a nierzadko zostaje wchłonięta, co jest niekorzystnym zjawiskiem. Nie każda kość pobrana z banku tkanek jest pozbawiona najdrobniejszych łańcuchów białkowych, a to może być przyczyna przeniesienia groźnych chorób. Stosowane od lat w chirurgii rekonstrukcyjnej metale używane były i są głównie jako elementy stabilizacyjne i mają one znaczną wadę w postaci dużej podatności na korozję. Wyjątkiem jest tytan i jego stopy, które mogą być stosowane również w postaci różnorodnych kształtów, ale także w postaci sproszkowanej do uzupełnienia ubytków tkanki kostnej. Zdolność do

### THE EVALUATION OF THE HEALING PROCESS OF RABBIT MANDIBLE BONE DEFECTS FILLED WITH CALCITE MATERIAL - INTRODUCTORY EXAMINATIONS

Magdalena Cieślik<sup>1</sup>, Marek Adwent<sup>2</sup>, Daniel Sabat<sup>3</sup>, Zbigniew Jaegermann<sup>4</sup>, Paweł Tarabuła<sup>2</sup>, Rajmund Orlicki<sup>1</sup>, Tadeusz Cieślik<sup>2</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE, POLAND <sup>1</sup>CHAIR AND DEPARTMENT OF STOMATOLOGICAL MATERIAL SCIEN-CE, 17 AKADEMICKI SQ., 41- 907 BYTOM, <sup>2</sup>DDEPARTMENT AND CLINIC OF MAXILLOFACIAL SURGERY, 20/24 FRANCUSKA STR., 40 -027 KATOWICE <sup>3</sup>DDEPARTMENT AND INSTITUTE OF PATHOMORPHOLOGY, 13-15 3 MAJA STR., 41- 800 ZABRZE, <sup>4</sup>INSTITUTE OF GLASS, CERAMICS, REFRACTORY AND CONSTRU-CTION MATERIALS, DDEPARTMENT OF BIOCERAMICS, WARSAW, POLAND

#### Abstract

Calcium carbonate in its crystallographic form of aragonite (CaCO<sub>3</sub>) was used in the experiments performed on 28 rabbits. The material under evaluation was implanted in the hard tissue of the experiment animals. Plans were made to carry out clinical observations of the wound healing process, and after sacrificing the animals - to perform radiological, macroscopic and histopathological examinations on the 3rd, 7th and 14th day and in the 3rd, 4th, 6th and 12th week of the experiment. Introductory results of the examinations showed that the evaluated material does not cause any negative reactions, neither local nor systemic, and the process of osseous wounds healing in its presence proceeds in a correct way. Moreover, with the passage of time, the material undergoes decomposition and simultaneously new bone tissue is formed in the place it is located.

**Key words:** biomaterials, ceramics, calcium carbonate, in vivo examinations on animals

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 57-61]

#### Introduction

Modern medicine, particularly orthopedics, maxillofacial surgery or periodontology, increasingly rely upon substitute materials allowing for completion or restoration of the missing structures [1]. They are most frequently bone tissue defects caused by injuries, bone cysts, tumors or degeneration lesions. Whenever it is possible, such defects are successfully filled with the patient's own bone, or one acquired in bone banks [2]. However, the patient's condition not always allows for taking his/her own bone, or the quality of his/her bone is deficient because of osteoporosis. The secondary bone is reconstructed shortly after implantation; quite frequently it is absorbed, which is a disadvantageous phenomenon. Not every bone acquired from a bone bank is deprived of the most minuscule protein chains, which can transmit dangerous diseases. Metals have been used for years in reconstructive surgery mainly as stabilizing elements; however, their main flaw is being susceptible to corrosion. One exception is titanium and its alloys, which can be used in different shapes and also in the form of powder

korozji tworzyw metalicznych była przyczyną poszukiwania materiałów ceramicznych na powłoki umieszczane zawsze na powierzchniach stopów stali medycznych jak i stopów tytanowych [3].

Wobec stałego niezadowolenia z istniejących materiałów zaczęto poszukiwać nowe materiały, które mogą po wprowadzeniu do organizmów żywych być rozkładane pod wpływem płynów fizjologicznych na końcowe produkty jak węgiel, woda czy dwutlenek węgla. Zalicza się do nich materiały węglowe, polimerowe (polimer kwasu mlekowego i glikolowego) czy oparte na ich bazie kompozyty [4,5]. Zwrócono również uwagę na wiele materiałów ceramicznych takich jak m.in. hydroksyapatyt. Są to tworzywa w większości występujące w naturze i chociaż na ogół mają gorsze właściwości mechaniczne to cechuje je pełna biozgodność. Cześć z tych materiałów cechuje inertność, co oznacza, że są one całkowicie obojętne dla organizmu i wprowadzone do niego pozostaną w nim na stałe [6,7]. Inne to tzw. materiały bioaktywne, do których należą hydroksyapatyt i bioszkło, które w niewielkim stopniu ulegają degradacji, pozostając jednak w organizmie pobudzają tkankę kostną do wzrostu [8, 9]. Wydaje się, iż najlepszymi materiałami są ceramiki resorbowalne, do których należą m.in. węglany wapnia, a wśród nich bezwodna postać węglanu wapnia - kalcyt, aragonit i wateryt [10-18].

#### Materiał i metody

W pracy zastosowano węglan wapniowy w odmianie krystalograficznej aragonitu, którego metoda otrzymania została opracowana i wdrożona w Instytucie Szkła i Ceramiki w Warszawie [19].

Zgodnie z zaleceniami Komisji Bioetycznej ds. badań na zwierzętach do badań doświadczalnych użyto 28 dorosłych królików, obojga płci o wadze od 2500–3500 g.. Badania wykonano w Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w warunkach sali operacyjnej.

Zabiegom operacyjnym poddano wszystkie zwierzeta, którym przed wniesieniem na salę operacyjną podano premedykację z użyciem Xylazyny 2% (0, 2mg/kg masy ciała i.m.). Po 20 minutach wykonano znieczulenie ogólne podając w tym celu Ketaminę (20mg\kg), Thiopental (25mg\kg) i Atropinę (0,5mg\kg). Następnie wycięto sierść i wygolono skórę w okolicy podżuchwowej zwierząt i po jej dezynfekcji ostrzyknięto miejsce operowane 2% lignokainą z noradrenaliną (2cm). Wykonano nacięcie skóry w linii pośrodkowej pomiędzy dolnymi krawędziami żuchwy. Przesunięto miejsce nacięcia wraz ze skórą na dolną krawędź żuchwy, po stronie prawej nacięto okostną i odsłonięto boczną powierzchnię żuchwy. Pomiędzy korzeniami zębów siecznych i przedtrzonowych wykonano wiertłem różyczkowym, umocowanym w prostnicy wiertarki dentystycznej, ubytek kostny o średnicy 4mm i głębokości 3mm. Ubytek pozostawiono wypełniony skrzepem krwi - grupa kontrolna. W identyczny sposób postąpiono po stronie lewej wypełniając go tworzywem kalcytowym (CaCO<sub>3</sub>) – grupa badana. Ranę zaszywano warstwowo stosując do zamknięcia warstwy głębokiej nici Dexon 4.0, natomiast do zszycia skóry nici Amifil 4.0.

Zoperowane króliki poddano ocenie klinicznej, a po ich zabiciu (przy użyciu morbitalu - 200mg/kg) ocenie makroskopowej okolicznych tkanek, oraz bezpośrednio miejsc operowanych, a także badaniu radiologicznemu i histopatologicznemu w 3, 7 i 14 dobie, oraz 3, 4, 6 i 12 tygodniu doświadczenia.

Oceny radiologicznej dokonano na podstawie zdjęć rentgenowskich obejmujących trzon żuchwy, oraz ubytki kostne. Zdjęcia rentgenowskie wykonano w Pracowni Rentgenowskiej przy Poradni Przyklinicznej Kliniki Chirurgii Czaszkowoto complete bone tissue defects. Metallic materials' corrosion susceptibility was the reason why ceramic materials were sought after, so that they could be used as coating for medical steel alloys and titanium alloys [3].

Because of the constant dissatisfaction with the existing materials, there was a need for new ones, which after introducing into living organisms could be decomposed by physiologic saline into end products (carbon, water or carbon dioxide). Such materials include carbon materials, polymers (lactic acid and glycolic acid polymer) or composites based on them [4, 5]. Attention was also given to a number of ceramic materials such as hydroxyapatite. They are mostly natural materials and, although they have worse mechanical properties, they are fully biocompatible. Some of these materials are characterized by inertion, which means that they are totally neutral for the organism and once introduced into it, they will stay in it forever [6,7]. Other materials are so called bioactive materials, including hydroxyapatite and bioglass, which become only slightly decomposed, remaining in the organism and arousing bone tissue to grow [8,9]. It seems that the best material is resorbable ceramics, including calcium carbonates, and among them the anhydrous form of calcium carbonate - calcite, aragonite and vaterite [10-18].

#### Material and methods

The material used in the research was calcium carbonate in its crystallographic form of aragonite; the method of obtaining it was developed and implemented the Institute of Glass, Ceramics, Refractory and Reconstruction Materials in Warsaw [19].

According to the recommendations of the Bioethics Committee Concerning Research on Animals, 28 adult rabbits of both sexes weighing 2500-3500 grams were used for the research. The examinations were carried out in the Experimental Medicine Centre of the Medical University of Silesia in operating room conditions.

All the animals underwent operation after having been given premedication: 2% Xylazine (0.2 mg/kg of body weight i.m.). After 20 minutes general anesthesia was performed with the use of Ketamine (20 mg/kg), Thiopental (25mg/kg) and Atropine (0.05mg/kg). Next, the fur was cut and the submaxillary area skin was shaved. After disinfecting it, the operation place was injected with 2% Lignocaine with Noradrenaline (2cm). An incision was made in the skin on the median line between the lower edges of the mandible. The incision spot was shifted together with the skin on the lower edge of the mandible; on the right side, the periosteum was incised and the lateral surface of the mandible was uncovered. A rosette drilling tool fixed in the turbine of a clinical drill was used to make a bone defect of 4mm diameter and 3 mm depth between the roots of incisive and premolar teeth. The defect was left filled with blood clot - the control group. An identical method was used on the left side filling the defect with calcite material (CaCO<sub>3</sub>) – the examination group. The wound was sutured in layers; Dexon 4.0 sutures were used to close the deep layer and Amifil 4.0 sutures were used to suture the skin.

The operated rabbits underwent clinical evaluation, and after sacrificing them (with the use of morbital 200mg/kg) macroscopic assessment of the surrounding tissue as well as the operated areas was made; also radiological and histopathological examinations were performed on the 3rd, 7th and 14th day and in the 3rd, 4th, 6th and 12th week of the examination.

Radiological examination was based on X-ray pictures of the body of the mandible and the bone defects. The X-ray Szczękowo-Twarzowej w Katowicach. Badania histopatologiczne wykonano w I Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Ślaskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrzu. Ocenie poddano tkankę kostną w miejscu wykonanych ubytków, oraz w obszarze miejsc bezpośrednio przylegających do ubytku kostnego. Oceniano również tkanki bezpośrednio pokrywające ubytek kostny. Ocenie histopatologicznej poddano ponadto narządy wewnętrzne operowanych królików - wątrobe i nerki.

#### Wyniki

Obserwacje kliniczne wykazały, iż w obu grupach zwierzęta po wybudzeniu zachowywały się spokojnie. Początkowo były osłabione i przyjmowały pozycję wyczekiwania. Sprawiały wrażenie zdezorientowanych, stopniowo jednak stawały się ruchliwe i w 2-3 godziny po zabiegu rozpoczęły picie wody. Między 5 a 10 godziną rozpoczęły jedzenie karmy, dawkując sobie jej ilość. Spokojne wyczekiwanie w początkowych okresach wskazywało na brak bólu i cierpienia. Miejsca operowane były dla zwierząt trudno dostępne, nie zauważono jednak prób rozdrapywania ran. Miedzy 3 a 5 dobą po zabiegu operacyjnym ustępował obrzęk tkanek, który był widoczny w okolicy ran skórnych. W tych też okresach widoczne było zgrubienie tkanek. Nie stwierdzono objawów gromadzenia się nadmiaru wydzieliny przyrannej czy obecności krwiaka, u pojedynczych zwierząt dawało się zauważyć jednak zaczerwienienie skóry wokół szwów. Zgrubienia tkanek utrzymywały się u większości zwierząt do 21 doby, u części jednak dawało się je zauważyć i wyczuć w trakcie badania palpacyjnego jeszcze po 4 i 5 tygodniach. Przez cały okres obserwacji zwierzęta stopniowo i nieznacznie przybierały na wadze.

W trakcie badań makroskopowych stwierdzono, iż miejsce wykonanego ubytku, zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej, stopniowo wypełniało się narastającą, nową tkanką kostną. W obu grupach do 6 tygodnia obserwacji miejsce rany kostnej różniło się od otoczenia i pokryte było uginającą się pod wpływem ucisku młodą tkanką. Po tym okresie miejsce ubytku rozpoznawalne było tylko ze względu na nieznaczne różnice w zabarwieniu, oraz ze względu na obecność drobnych por (grupa kontrolna) lub drobin białawego wszczepionego materiału (grupa badana). Konsystencja tkanki była już całkowicie twarda i nie różniła się pod tym względem od otoczenia (RYS.1, RYS.2).

Badania radiologiczne po 7 dobach wykazały w obu grupach obecność, w miejscu wykonanych ubytków kostnych, kulistego przejaśnienia o regularnych brzegach. W



RYS.1. Grupa kontrolna – 12 tydzień – gojący się na bazie skrzepu kwi ubytek kostny żuchwy wypełniony nowopowstała, twarda tkanka kostna.

FIG.1. Control group – 12th week – healing mandible bone defect with blood clot, filled with newly-formed hard bone tissue.

59

Centre of the Clinic of Maxillofacial Surgery in Katowice. The histopathological examinations were made at the 1st Faculty and Institute of Patomorphology at the Medical University of Silesia in Zabrze. The bone tissue in the previously-made defects and in the areas directly adjoining the defect was assessed. Also, the tissue directly covering the defect was assessed. Internal organs of the operated rabbits - liver and kidneys underwent histopathological examination.

#### Results

Clinical observation showed that in both groups the animals behaved in a calm way after awakening. At the beginning they were weakened and adapted an awaiting position. They made an impression of being confused; however they were gradually becoming more active and 2-3 hours after the operation they accepted water. Between the 5th and the 10th hour they started to eat fodder, taking it in portions. Calm awaiting in the initial periods indicated that they did not experience pain and suffering. The operated places were hardly accessible for the animals, however, no attempts at scratching the wounds were observed. Between the 3rd and the 5th day after the operation the tissue swelling visible around the skin wounds gradually disappeared. At the same time, tissue thickening was also visible. Wound secretion did not appear in excess and no hematoma was present; however, a few animals had skin reddening around the sutures. Tissue thickening was present until the 21st day with most animals; however, with a few animals it could still be seen and felt during palpation examination still after the 4th and the 5th week. During the whole examination periods the animals were gradually putting on weight.

During macroscopic examinations it was established that the place where the defect had been made was gradually filling with growing, new bone tissue, both in the control group and the examined group. In both groups, until the 6th week, the area of the bone wound was different from the surrounding area and it was covered with new tissue which was bending under pressure. After that period the area of the defect was only recognizable because of a slight difference in color and because of the presence of tiny pores (control group) or particles of white implant material (examined group). The consistency of the tissue was already totally hard and did not differ from the surrounding area (FIGg.1, FIG.2).

Radiological examination after 7 days showed in both groups the presence of spherical translucence with regular



RYS.2. Grupa badana – 12 tydzień – gojący się w obecności kalcytu ubytek kostny żuchwy wypełniony nowopowstała, twarda tkanka kostną. FIG.2. Examination group - 12th week - healing mandible bone defect with calcite, filled with newlyformed hard bone tissue.



RYS.3. Grupa kontrolna – 12 tydzień – obraz radiologiczny ubytku kostnego w żuchwie królika. FIG.3. Control group – 12th week – radiologic picture of bone defect in rabbit mandible.

późniejszych okresach przejaśnienie stopniowo zanikało, przybierając nieregularną postać. Świadczyło to o toczącym się procesie kościotworzenia. Zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej po 12 tygodniach eksperymentu praktycznie cały ubytek pokryty był nowo powstałą tkanką kostną. Ujawniły to obrazy radiologiczne, na których trudno już było dostrzec jakiekolwiek przejaśnienie (RYS.3, RYS.4).

Przeprowadzone do 21 doby wstępne badania histopatologiczne ujawniły, iż proces regeneracji ubytków kostnych nie był jeszcze całkowicie zakończony. W obu grupach widoczne były beleczki kostne, częściowo wykazujące jeszcze cechy aktywności osteoblastycznej. W grupie badanej rozrastały się one wokół drobin wszczepu i wbudowywały go w nowo tworzoną kość. Procesowi formowania tkanki kostnej towarzyszyła ponadto obecność nie tylko osteoblastów, ale i licznych osteoklastów, szczególnie wokół wbudowanych w kość drobin wszczepu.

W badanych narządach wewnętrznych zwierząt doświadczalnych tj. nerkach i wątrobie nie stwierdzono zmian patologicznych związanych z wprowadzonymi do tkanek królików wszczepami.

#### Podsumowanie

Przeprowadzone w pracy badania in vivo wykazały, iż wprowadzony do ubytków kostnych żuchwy królików węglan wapniowy CaCO<sub>3</sub> nie wywołuje zarówno miejscowych jak i ogólnoustrojowych negatywnych reakcji. Ponadto w obecności wszczepów wykonanych z badanego materiału proces gojenia ran kostnych przebiega prawidłowo, czemu towarzyszy powstawanie właściwej tkanki kostnej. Wprowadzony do kości królików kalcyt wraz z upływem czasu ulega stopniowemu rozkładowi, z następującą równocześnie odbudową tkanki kostnej w miejscu jego usytuowania.

#### Piśmiennictwo

 Ślósarczyk A.: Biomateriały ceramiczne, w: Biomateriały, Tom VI, w: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000 pod red. M. Nałęcza, Akad. Oficyna Wyd. EXIT, Warszawa 2002.

[2] Cieślik M., Nocoń J., Rauch J., Łączka M., Rauch B., Cieślik T. Healing of guinea pigs' mandible osseous wounds filled with deproteinized human bone and its mixture with bio-glass. Pol. J. Environ. Stud. 2009, 18 (1A), 17-20.

[3] Mitri F.F., Yoshimoto M., Allegrini Junior S., Koo S., Carbonari M.J., Konig Junior B. Histological findings in titanium implants coated with calcium phosphate ceramics installed in rabbit's tibias. Annals Anat. 2005, 187(1), 93-8.



RYS.4. Grupa badana – 12 tydzień – obraz radiologiczny ubytku kostnego w żuchwie królika. FIG.4. Examined group – 12th week – radiologic picture of bone defect in rabbit mandible.

edges, which was visible in the bone defects. In further periods the translucence was gradually disappearing, taking an irregular shape. It was evidence of the bone formation process in progress. Both in the control group and in the examined group the whole defect was covered with newly formed bone tissue after 12 weeks of the experiment. It was shown by radiologic pictures, where hardly any translucence was visible (FIG.3, FIG.4).

Introductory histopathological examinations carried out until the 21st day showed that the regeneration process of bone defects was not completed. In both groups bone trabeculae were visible; they partly showed traces of osteoblastic activity. In the examination group they proliferated around particles of the implant and incorporated it in the newly-formed bone. Moreover, the process of bone tissue forming was accompanied not only by the presence of osteoblasts, but also numerous osteoclasts, particularly around implant particles incorporated into the bone.

In the examined internal organs of the experimental animals, that is kidneys and liver, no pathologic changes resulted from introducing implants in the rabbits' tissue.

#### Conclusion

In vivo examinations carried out in this research have shown that calcium carbonate CaCO<sub>3</sub> introduced into bone defects made in rabbit mandible does not induce any negative reactions, either local or systemic. Moreover, the process of osseous wounds healing in the presence of the implants made from the examined material proceeds in a correct way and proper bone tissue is formed. Calcite introduced into rabbit bone is gradually decomposed after a period of time and simultaneously bone tissue is reconstructed in the place it was located.

#### References

[4] Cieślik M., Cieślik-Bielecka A., Adwent M., Sabat D., Bajor G., Cieślik T., Wysoczańska M. Obserwacje gojenia ran kostnych żuchwy królików wypełnionych kopolimerem glikolidu z laktydem z dodatkiem hydroksyapatytu. Przegl. Med. Uniwersyt. Rzeszowskiego 2005, 2, 99-102.

[5] Price R.L., Ellison K., Haberstroh K.M. Webster T.J. Nanometr surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. J. Biomed. Mater. Res. A. 2004, 70(1), 129-138. [6] Cieślik T., Pgorzelska-Stronczak B., Szczurek Z., Koszowski R., Sabat D., Zajęcki W. Ocena gojenia ran kostnych żuchwy wypełnionych krakowską bioceramiką hydroksyapatytową (Ha-Biocer) u świnek morskich. Czas. Stomat. 1997, L, 7, 483-487.

[7] Szczyrek P. Badanie gęstości, porowatości i nasiąkliwości materiałów ceramicznych. Protet. Stomatol. 2006, LVI, 5, 390-392.

[8] Fujita Y., Yamamuro T., Nakamura T., Kitsugi T., Kotani S., Ohtsuki C., Kokubo T. Mechanism and strength of bonding between two bioactive ceramics in vivo. J. Biomed. Mater. Res. 1992, 26(10), 1311-1324.

[9] Lu H.H., Tang A., Oh S.C., Spalazzi J.P., Dionisio K. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. Biomaterials 2005, 26(32), 6323-6334.

[10] Jaegermann Z., Turżańska K., Michałowski S., Jabłoński M. Wstępne badania kalcytowej ceramiki porowatej metodą mikrotomografii komputerowej. Inż. Biomater. 2007, 65-66, 45-47.

[11] Michałowski S., Jaegermann Z., Karaś J. Wpływ składu chemicznego i parametrów spiekania na właściwości tworzyw kalcytowych. Inż. Biomater. 2005, 47-53, 28-29.

[12] Janda-Wasiluk L. Celowe replantacje zębów z zastosowaniem preparatu węglanu wapnia w postaci Biocoralu w material doświadczalnym. Stomatol. Współ. 1997, 4(3), 176-183.

[13] Janda-Wasiluk L. Kliniczne zastosowanie preparatu węglanu wapnia w postaci Biocoralu w przypadkach celowej replantacji i autotransplantacji zębów. Stomatol. Współ. 1997, 4(5), 355-362. [14] Arkuszewski P., Kozakiewicz M., Dudek D. Radiologiczna ocean zastosowania materiału Dexon Mesh w leczeniu ubytków kości na drodze sterowanej regeneracji tkanek u szczurów. Czas. Stomatol. 2006, 12, 846-858.

[15] Dominiak M., Łysiak K. Ocena skuteczności wybranej metody regeneracji kości z zastosowaniem materiału wszczepialnego w leczeniu poekstrakcyjnym ubytków kości wyrostka zębodołowego – badania wstępne. Dent. Med. Probl. 2006, 43(3), 368-378.

[16] Fujita Y., Yamamuro T., Nakamura T., Kotani S., Ohtsuki C., Kokubo T. The bonding behavior of calcite to bone. J. Biomed. Mater. Res. 1991, 25(8), 991-1003.

[17] Liu D., Tian H., Jia X., Zhang L. Effects of calcium carbonate polymorph on the structure and properties of soy protein-based nanocomposites. Macromol. Biosci. 2008, 8(5), 401-409.

[18] Constantz B.R., Barr B.M., Ison I.C., Fulmer M.T., Baker J., McKinney L., Goodman S.B., Gunasekaren S., Delaney D.C., Ross J., Poser R.D. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. J. Biomed. Mater. Res. 1998, 43(4), 451-461.

[19] Michałowski S., Jaegermann Z., Karaś J. Właściwości tworzyw kalcytowych przeznaczonych na nośniki żywych komórek. Inż. Biomater. 2004, 38-43, 94-96.

#### • • • • • • • • • • • • • • • • •

### WPŁYW TEMPERATURY WYGRZEWANIA WARSTW TIO2 OTRZYMANYCH METODĄ ZOL-ŻEL NA WŁAŚCIWOŚCI KOROZYJNE BIOMEDYCZNEGO STOPU PANACEA P558

BARBARA BURNAT\* TADEUSZ BŁASZCZYK HENRYK SCHOLL

UNIWERSYTET ŁÓDZKI, WYDZIAŁ CHEMII, KATEDRA CHEMII OGÓLNEJ I NIEORGANICZNEJ, NARUTOWICZA 68, 90-136 ŁÓDŹ, POLSKA \*MAILTO: BURNAT@OP.PL

#### Streszczenie

Zbadano wpływ temperatury wygrzewania warstw TiO<sub>2</sub> uzyskanych metodą zol-żel na właściwości korozyjne bezniklowego stopu biomedycznego Panacea P558. Próbki stopu z naniesioną warstwą TiO<sub>2</sub> jak też próbki bez tych warstw były poddane wygrzewaniu w temperaturach 450°C i 800°C. Badania korozyjne wykonano w odtlenionym roztworze Tyrode'a w temperaturze ciała ludzkiego 37°C (310 K). Stwierdzono polepszenie właściwości korozyjnych stopu przez warstwy wygrzane w temperaturze 450°C. Stwierdzono również, że wygrzanie tego stopu w temperaturze 800°C powoduje dużą niestabilność jego właściwości korozyjnych - po pewnym czasie ekspozycji w roztworze korozyjnym próbki bez warstw jak i z warstwami TiO2 skokowo zmieniają swoje właściwości i charakteryzują się gorszymi parametrami korozyjnymi niż wyjściowy stop. Przyczyną pogorszenia właściwości korozyjnych stopu Panacea P558 w temperaturze

### THE INFLUENCE OF HEATING TEMPERATURE OF TIO2 SOL-GEL LAYERS ON CORROSION PROPERTIES OF PANACEA P558 BIOMEDICAL ALLOY

BARBARA BURNAT\* TADEUSZ BŁASZCZYK HENRYK SCHOLL

UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF CHEMISTRY, DEPARTMENT OF GENERAL AND INORGANIC CHEMISTRY, 68 NARUTOWICZA STR., 90-136 LODZ, POLAND \*MAILTO: BURNAT@OP.P

#### Abstract

The influence of heating temperature of TiO<sub>2</sub> sol-gel layers on corrosion properties of nickel-free Panacea P558 biomedical alloy was investigated. The samples of alloy both with TiO<sub>2</sub> sol-gel layers and without these layers were heated at temperature of 450°C and 800°C. The investigations were carried out in deoxygenated Tyrode's solution at human body temperature of 37°C (310 K). It was found that the layers heated at 450°C improve corrosion features of this alloy. It was also stated that heat treatment of this alloy at 800°C results in high instability of its corrosion features - after some exposition time in corrosion solution samples both without and with TiO<sub>2</sub> layers rapidly change their properties and these samples have worse corrosion parameters than initial alloy (without any surface modification). The reason for these worse corrosion features of Panacea P558 alloy heated at 800°C may be: (1) changes of its microstructure (segregation of
800°C mogą być (1) zmiany w strukturze wewnętrznej tego stopu (segregacja składników stopu) jak też (2) powstające w tej temperaturze węgliki metali będą-

cych składnikami stopu.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 61-65]

#### Wprowadzenie

Biomateriały metaliczne znajdują zastosowanie jako protezy i implanty w praktycznie każdej dziedzinie medycznej. Stop Panacea P558 charakteryzuje się bardzo niską zawartością niklu i jako stop bezniklowy dedykowany jest pacjentom mającym alergię na Ni. Skład chemiczny stopu Panacea P558 przedstawiony jest w TABELI 1 [1].

Stop Panacea P558 cechuje się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, dobrą biozgodnością jak też dobrymi właściwościami korozyjnymi [2]. Bada-

nia elektrochemiczne i korozyjne tego stopu w różnych roztworach opisane zostały przez U.I. Thomanna i P.J. Uggowitzera [1], G. Rondelli'ego i wsp. [3], B. Burnat i wsp. [4].

W związku z tendencją wszystkich biomateriałów metalicznych do korodowania w środowisku fizjologicznym, konieczne jest modyfikowanie powierzchni tych materiałów w celu polepszenia ich właściwości korozyjnych i biokompatybilności.

W ostatnich latach, dużym zainteresowaniem cieszy się wytwarzanie warstw ceramicznych na biomedycznych powierzchniach metalowych. Powłoki ceramiczne uzyskiwane mogą być różnymi metodami takimi jak chemiczne osadzanie z fazy gazowej (CVD) [5], natryskiwanie cieplne [6], napylanie jonowe [7] oraz zol-żel [8,9]. Ta ostatnia metoda jest dość nową szeroko stosowaną metodą do wytwarzania ochronnych powłok tlenkowych typu TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> czy Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [10]. Powłoki tlenkowe wytwarzane metodą zol-żel charakteryzują się dobrą stabilnością chemiczną [8]. Technika zol-żel pozwala uzyskać warstwy w warunkach niskotemperaturowych z różnych prekursorów. Zaletą techniki zol-żel jest możliwość stosowania próbek o różnych kształtach oraz możliwość kontrolowania parametrów powierzchni takich jak skład, grubość i topografia [8].

Celem tej pracy jest określenie wpływu temperatury wygrzewania warstw TiO<sub>2</sub> uzyskanych metodą zol-żel na właściwości korozyjne bezniklowego stopu biomedycznego Panacea P558. Cel ten realizowano poprzez wykonanie badań korozyjnych metodami elektrochemicznymi w roztworze Tyrode'a dla próbek tego stopu z naniesioną warstwą TiO<sub>2</sub> jak też próbek bez tych warstw poddanych wygrzewaniu w temperaturach 450°C i 800°C. Efekty zmian korozyjnych określono z wykorzystaniem mikroskopii optycznej. Podobne badania były wcześniej przez nas wykonane dla stopu Rex 734 [11].

#### Materiały i metodyka badań

Próbki stopu Panacea P558 miały kształt walca o średnicy 30mm i grubości ok. 3mm. Powierzchnie próbek były szlifowane na papierze ściernym SiC, polerowane mechaniczne na zawiesinie  $Al_2O_3$  i oczyszczane w myjce ultradźwiękowej. W ostatnim etapie procedury przygotowawczej powierzchnie próbek były czyszczone chemicznie w mieszaninie 2% HF, 10% HNO<sub>3</sub> i 88% H<sub>2</sub>O [12]. Roztwór zolu sporządzony był na bazie prekursora izopropylanu tytanu (IV) Ti[OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) z katalizatorem HCI wg preparatyki podanej alloy components) and (2) alloying elements carbides formed at this temperature.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 61-65]

#### Introduction

Metallic biomaterials find an application as prostheses and implants in nearly any medical discipline. Panacea P558 is characterized by low nickel content and as nickel-free alloy it is dedicated for patients with Ni allergy. Chemical composition of Panacea P558 alloy is presented in TABLE 1 [1].

Panacea P558 alloy has very good mechanical properties, good biocompatibility and good corrosion resistance [2]. Electrochemical and corrosion investigations of this alloy in different solutions were reported by U.I. Thomann and P.J. Uggowitzer [1], G. Rondelli et al. [3] and also B. Burnat et al. [4].

Pierwiastek Element	С	Si	Mn	Р	S	Cr	Ni	Мо	Cu	Ν	Nb	Fe
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 stopu Panacea P558 (%wag.).

TABLE 1. Composition of Panacea P558 alloy (%wt.).

All metallic biomaterials have the tendency to corrode in physiological environment therefore it is necessary to modify the surfaces of these materials to improve their corrosion resistance and biocompatibility.

In recent years, synthesizing ceramic films on biomedical metal surface has been attracting considerable attention. Many methods such as chemical vapor deposition (CVD) [5], thermal spraying [6], DC sputtering [7] and sol-gel [8,9] have been used to prepare ceramic coatings. The last one is a quite new wide used method for deposition of protective oxide films such as  $TiO_2$ ,  $SiO_2$  and  $Al_2O_3$  [10]. Sol-gel oxide layers have a good chemical stability [8]. Sol-gel technology is a low temperature method of film preparing from different chemical precursors. The advantages of using a sol-gel dip-coating technique are that this technique is independent of the substrate shape, and can achieve a good control of surface properties such as composition, thickness and topography [8].

The aim of this work is determination of the influence of heating temperature of  $TiO_2$  sol-gel layers on corrosion properties of nickel-free Panacea P558 biomedical alloy. For that purpose corrosion investigations of samples with  $TiO_2$  layers and without these layers heated at temperature of 450°C and 800°C in Tyrode's physiological solution by electrochemical methods were carried out. Corrosion effects were determined using optical microscopy. Analogous investigations we have done earlier for Rex 734 alloy [11].

#### Materials and methodology

Panacea P558 alloy samples were discs with a diameter of 30 mm and ca. 3mm in height. Samples' surfaces were grinded on SiC abrasive paper, mechanically polished with  $Al_2O_3$  suspension and cleaned in ultrasonically bath. The last stage of surface preparation procedure was etching of samples' surfaces in mixture of 2% HF, 10% HNO<sub>3</sub> and 88%  $H_2O$  [12]. Titanium (IV) isopropoxide Ti[OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) was used as TiO<sub>2</sub> precursor and HCI as catalyst according to [13]. Alloy samples were covered by one layer of gel using dip-coater DCMono 75 (NIMA Technology). The immersion and withdrawal speed was 20mm/min, and time of holding the sample in sol was 30s. Coatings were dried preliminary at 100°C and then heated at 450°C or w [13]. Próbki stopu pokrywano jedną warstwą żelu metodą zanurzeniową z użyciem dip - coatera DCMono 75 (NIMA Technology). Szybkość zanurzania i wynurzania próbek wynosiła 20mm/min, a czas stabilizacji po zanurzeniu wynosił 30s. Wstępnie naniesione warstwy wygrzewano w temperaturze 100°C, a następnie przez 2 godziny w 450°C lub 800°C. W analogiczny sposób wygrzewano próbki bez warstw TiO<sub>2</sub>. Przed pomiarami elektrochemicznymi próbki przemywano alkoholem etylowym i osuszano Ar. Badania elektrochemiczne wykonywano w szklanym naczyńku elektrolitycznym, w którym próbka stanowiła elektrodę roboczą, folia Pt - elektrodę pomocniczą, a elektroda kalomelowa w nasyconym roztworze NaCI - elektrodę odniesienia. Wszystkie potencjały w tej pracy podawane są do stosowanej elektrody kalomelowej (Eº=0,236V wzgl. NEW). Powierzchnia robocza próbki wynosiła ok. 0,64cm². Pomiary wykonywano w odtlenionym roztworze Tyrode'a (0,8g NaCl, 0,02g CaCl<sub>2</sub>, 0,02g KCl, 0,1g NaHCO<sub>3</sub>, 0,1g MgCl<sub>2</sub>, 0,005g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 100cm<sup>3</sup> 3-krotnie destylowanej H<sub>2</sub>O) [14], w temperaturze 37ºC±1ºC (310K±1K). Dla każdej próbki wykonywano pomiary z użyciem potencjostatu / galwanostatu PGSTAT 30 (EcoChemie Autolab) według sekwencji: pomiar swobodnego potencjału korozyjnego E<sub>cor</sub> w otwartym obwodzie, pomiar oporu polaryzacyjnego R, metoda Stern - Geary'ego, pomiar elektrochemicznej spektroskopowej charakterystyki impedancyjnej (EIS) i pomiar charakterystyki potencjodynamicznej w zakresie polaryzacji anodowej. Przedstawiane w pracy wyniki są uśrednionymi wartościami z pomiarów 3 próbek. Powierzchnię wszystkich badanych próbek analizowano stosując metalograficzny mikroskop optyczny (PZO METAR).

#### Wyniki i podsumowanie

Pomiary swobodnego potencjału korozyjnego w otwartym obwodzie  $E_{cor}$  wykonywano dla próbek stopu Panacea P558 po typowym przygotowaniu (bez wygrzania), dla próbek poddanych obróbce cieplnej w temperaturach 450°C i 800°C oraz dla próbek z naniesionymi warstwami TiO<sub>2</sub> wygrzanymi również w temperaturach 450°C i 800°C. Uzyskane średnie wartości  $E_{cor}$  wraz z odchyleniem standardowym dla poszczególnych sposobów przygotowania powierzchni stopu przedstawione są na RYS.1.

Obróbka cieplna próbek stopu Panacea P558 powoduje istotną zmianę potencjału korozyjnego - z ujemnego ok. -0,30V dla stopu bez wygrzania na dodatni, praktycznie taki sam dla próbek wygrzanych w temperaturach 450°C i



RYS.1. Wpływ warstw TiO<sub>2</sub> i temperatury wygrzewania na potencjał  $E_{cor}$  stopu Panacea P558. FIG.1. The influence of TiO<sub>2</sub> layers and heating temperature on potential  $E_{cor}$  of Panacea P558 alloy.

800°C for 2 hours. The same heat treatment procedure was used for samples without TiO<sub>2</sub> layers. Prior electrochemical measurements all samples were rinsed with ethanol and dried with Ar. Electrochemical investigations were carried out in a glass electrolytic cell containing sample as working electrode, Pt foil as counter electrode and calomel electrode in saturated NaCl solution as reference electrode. All potentials in this paper are given versus used calomel electrode (Eº=0.236V vs. SHE). Working area of each sample was ca. 0.64cm<sup>2</sup>. The measurements were carried out in deoxygenated Tyrode's physiological solution (0.8g NaCl, 0.02g CaCl<sub>2</sub>, 0.02g KCl, 0.1g NaHCO<sub>3</sub>, 0.1g MgCl<sub>2</sub>, 0.005g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 100cm<sup>3</sup> 3-times distilled H<sub>2</sub>O) [14], at controlled temperature of 37°C±1°C (310K±1 K). Each sample was measured using potentiostat / galvanostat PGSTAT 30 (EcoChemie Autolab) in a following sequence: measurement of free corrosion potential  $\mathsf{E}_{\mathsf{cor}}$  in open circuit, polarization resistance Rp according to Stern - Geary's method, electrochemical impedance spectroscopic characteristic (EIS) and potentiodynamic characteristic in wide range of anodic polarization. In this paper averaged values obtained from measurements of 3 samples are presented. Surfaces of all investigated samples were analyzed using metallographic optical microscope (PZO METAR).

#### **Results and summary**

Corrosion potential Ecor was gathered in open circuit for Panacea P558 samples prepared typical (without heat treatment), for samples heated at 450°C and 800°C as well as for samples with TiO<sub>2</sub> layers heated at 450°C and 800°C. Averaged values of  $E_{cor}$  with standard deviation obtained for different surface preparations are presented in FIG.1.

Heat treatment of Panacea P558 samples change considerably a corrosion potential of alloy - from negative ca. -0.30V for alloy without heating to positive ca. 0.15-0.16V practically the same for samples after heating at 450°C and 800°C. Also TiO<sub>2</sub> layers deposition gives higher values of corrosion potential. The most advantageous influence on  $E_{cor}$  values is observed for samples with layers heated at 450°C. In case of samples both with TiO<sub>2</sub> layers and without these layers heated at 800°C high instability of their potential was stated - after a few seconds or tens minutes of exposition in Tyrode's solution this potential rapidly changed into negative value (FIG.2) and then after some time it reached



RYS.2. Skokowa zmiana potencjału w otwartym obwodzie dla przykładowej próbki stopu Panacea P558 z warstwą TiO<sub>2</sub> wygrzaną w temperaturze 800°C. FIG.2. Rapid change of potential in open circuit for exemplary sample of Panacea P558 alloy with TiO<sub>2</sub> layer heated at temperature of 800°C.



RYS.3. Wpływ warstw TiO<sub>2</sub> i temperatury wygrzewania na opór R<sub>p</sub> stopu Panacea P558. FIG.3. The influence of TiO<sub>2</sub> layers and heating temperature on resistance R<sub>p</sub> of Panacea P558 alloy.

800°C i równy ok. 0,15-0,16V. Także naniesienie warstw TiO<sub>2</sub> powoduje podwyższenie wartości potencjału korozyjnego, przy czym wpływ ten jest najkorzystniejszy dla warstw wygrzanych w temperaturze 4500C. W przypadku próbek stopu z warstwą TiO<sub>2</sub> jak też próbek bez tych warstw wygrzanych w temperaturze 800°C stwierdzono dużą niestabilność ich potencjału - po czasie od kilkunastu sekund do kilkudziesięciu minut kontaktowania się próbki z roztworem Tyrode'a potencjał próbek skokowo zmieniał się na ujemny (RYS.2) i po pewnym czasie osiągał stabilną wartość równą ok. -0,41V. Dlatego też na RYS.1 dla próbek stopu bez warstw i z warstwami TiO<sub>2</sub> po obróbce cieplnej w temperaturze 8000C przedstawiono wartości E<sub>cor</sub> dla obu tych stanów. Takie zachowanie się potencjału korozyjnego jednoznacznie świadczy o pogorszeniu się właściwości korozyjnych stopu Panacea P558 po obróbce cieplnej w temperaturze 800°C. Dla próbek stopu Rex 734 opisanych w [11] takich efektów nie obserwowano.

Opór polaryzacyjny R<sub>p</sub> dla poszczególnych sposobów przygotowania powierzchni pokazany jest na RYS.3. Opór R<sub>n</sub> obliczony został z charakterystyk Stern - Geary'ego wykonywanych metodą potencjodynamiczną w zakresie ±20 mV wokół ustalonego potencjału E<sub>cor</sub>. Jak widać, najwyższą wartość oporu R<sub>p</sub> przyjmują próbki stopu z warstwą TiO<sub>2</sub> wygrzaną w 450°C - mają one ok. 25 razy wyższą wartość R<sub>n</sub> w porównaniu do Rp próbek stopu przygotowanych typowo. Również pozytywny wpływ na wartość oporu R<sub>o</sub>, choć w mniejszym stopniu, wywołuje samo wygrzanie stopu w temperaturze 450°C. Ten wzrost R<sub>p</sub> może być tłumaczony grubszą warstwą tlenkową powstającą na powierzchni stopu w wyniku jego obróbki cieplnej. Wartości R<sub>o</sub>dla temperatury wygrzania 800°C wyznaczone zostały dla stanu stabilnego, tzn. dla ujemnej wartości E<sub>cor</sub>. Jak widać z uzyskanych wyników w tej temperaturze następuje znaczne pogorszenie się właściwości korozyjnych stopu - próbki bez warstw jak też z warstwami TiO<sub>2</sub> przyjmują odpowiednio ok. 2 i ok. 6 razy niższe wartości R<sub>p</sub> w porównaniu do wartości wyznaczonej dla próbek przygotowanych typowo.

Z uzyskanych charakterystyk Stern - Geary'ego wyznaczono również gęstość prądu korozyjnego icor, który odzwierciedla intensywność zachodzących procesów korozyjnych i tym samym szybkość korozji. Na RYS.4 przedstawiono wartości gęstości prądu korozyjnego stopu Panacea wyznaczone dla poszczególnych sposobów przygotowania powierzchni tego stopu. Uzyskane zależności potwierdzają wcześniej opisane wyniki pomiaru E<sub>cor</sub> i R<sub>p</sub>. Najniższą wartość i<sub>cor</sub>, a tym samym najmniejszą szybkość korozji, przyjmują próbki z warstwą TiO<sub>2</sub> uzyskaną w tempe-



RYS. 4. Wpływ warstw  $TiO_2$  i temperatury wygrzewania na gęstość prądu icor stopu Panacea P558. FIG. 4. The influence of  $TiO_2$  layers and heating temperature on current density icor of Panacea P558 alloy.

stable value ca. -0.41V. Therefore in FIG.  $E_{cor}$  values for both these states of samples heated at 800°C are presented. Such behavior of corrosion potential unequivocally testifies that corrosion features of Panacea P558 alloy after treatment at 800<u>0</u>C are deteriorated. For Rex 734 samples reported in [11] such effects have not been observed.

In FIG.3 is showed a polarization resistance R<sub>p</sub> for every samples' treatment. The polarization resistance was calculated from Stern-Geary's characteristics which were done using potentiodynamic method with polarization in the range of 20mV around Ecor. As it can be seen the highest value of Rp have samples of alloy with TiO<sub>2</sub> layer obtained at 450°C - they have ca. 25 times higher value of Rp in comparison with R<sub>o</sub> for typical prepared alloy. Similar positive influence on R<sub>p</sub> behavior, although to a lesser extent, is observed for samples only heated at 450°C. Increasing Rp values may be explained by thicker oxide layer formed on alloy surface during heat treatment. R<sub>p</sub> values of samples heated at 800°C were determined for stable state (in this case - for negative value of E<sub>cor</sub>). Obtained results show that at this temperature considerable deterioration of corrosion features of alloy is occurring - samples both without and with TiO<sub>2</sub> layers have respectively ca. 2 and ca. 6 times lower R<sub>p</sub> values as compared with  $R_{p}$  for typical prepared alloy.

From Stern - Geary's characteristics corrosion current density icor was also determined which reflect an intensity of occurring corrosion processes and corrosion rate as well. Corrosion current density icor for every sample's treatment is showed in FIG.4. Obtained dependences confirm early described results of  $E_{cor}$  and  $R_p$ . The lowest icor value and corrosion rate as well have samples with TiO<sub>2</sub> layer obtained at 450°C. On the contrary the highest icor value and corrosion rate as well have samples with TiO<sub>2</sub> layer heated at 800°C. Such values of corrosion current density testify that surfaces of both types of samples have very high electrochemical activity.

A lot of information of corrosion properties may be given from potentiodynamic characteristics in wide range of anodic polarization. On the basis of their shape, character and potential position the type of corrosion occurring on material / solution boundary phase, values of characteristic potentials may be characterized as well as verification of conclusions drawn from another electrochemical measurements may be done. Potentiodynamic characteristics in Tyrode's solution for all kinds of Panacea P558 surface preparation are presented in FIG.5. Samples without any surface modification have very wide passive potential raturze 450°C. Z kolei najwyższą wartością i<sub>cor</sub>, a tym samym największą szybkością korozji, charakteryzują się próbki z warstwą TiO<sub>2</sub> wygrzaną w temperaturze 800°C. Tak wysoka wartość icor świadczy o dużej elektrochemicznej aktywności powierzchni próbki.

Szereg informacji o właściwościach korozyjnych materiału dostarczają także charakterystyki potencjodynamiczne w szerokim zakresie polaryzacji anodowej. Na podstawie kształtu, charakteru i położenia tych charakterystyk można określić typ zachodzącej korozji w układzie materiał / roztwór korozyjny, wartości potencjałów charakteryzujących ten typ korozji, a także zweryfikować wnioski wyciągnięte na podstawie innych pomiarów elektrochemicznych. Charakterystyki potencjodynamiczne dla poszczególnych sposobów przygotowania powierzchni stopu Panacea P558 zarejestrowane w roztworze Tyrode'a przedstawione sa na RYS.5. Próbki stopu Panacea niepoddane żadnej modyfikacji powierzchni charakteryzują się szerokim obszarem pasywnym, a uszkodzenia korozyjne powstające po przekroczeniu potencjału przebicia ulegają natychmiastowemu spasywowaniu. Próbki bez warstw jak i z warstwami TiO<sub>2</sub> poddane obróbce cieplnej w temperaturze 450°C cechuje niższa gestość pradu w obszarze pasywnym, jak też wyższa wartość potencjału przebicia w porównaniu do próbek stopu przygotowanych typowo. Charakterystyki potencjodynamiczne dla próbek stopu wygrzanego w temperaturze 800°C, zarówno bez jak i z warstwami TiO<sub>2</sub>, jednoznacznie potwierdzają pogorszenie się właściwości korozyjnych tego stopu po obróbce cieplnej w tej temperaturze. Charakterystyki te pozbawione są obszaru pasywnego i wskazują na to, że gwałtowny proces korozyjny zachodzi już przy niewielkim nadpotencjale względem E<sub>cor</sub>.

Podsumowując można stwierdzić, że warstwy TiO<sub>2</sub> nanoszone metodą zol-żel i wygrzane w temperaturze 450°C istotnie polepszają właściwości korozyjne stopu Panacea P558. Wygrzanie tego stopu w temperaturze 800°C powoduje dużą niestabilność jego właściwości korozyjnych w roztworze Tyrode'a - próbki bez warstw jak i z warstwami TiO<sub>2</sub> skokowo zmieniają swoje właściwości i finalnie charakteryzują się gorszymi właściwościami korozyjnymi niż wyjściowy stop. Przyczyną pogorszenia właściwości korozyjnych stopu Panacea P558 w temperaturze 800°C mogą być zmiany w strukturze wewnętrznej tego stopu (segregacja składników stopu) jak też powstające w tej temperaturze węgliki metali będących składnikami stopu.

#### Podziękowania

Praca wykonana została w ramach grantu 506/813 Uniwersytetu Łódzkiego. Autorzy wyrażają podziękowania Prof. P. J. Uggowitzerowi i Böhler Edelstahl GmbH za stop PANACEA P558.

#### Piśmiennictwo

- [1] Thomann U. J., Uggowitzer P. J.; Wear 239 (2000) 48-58
- [2] Wohlfromm H., Uggowitzer P. J.; Metal Powder Report 53 (1998) 48-52
- [3] Rondelli G., Toricelli P., Fini M., Giardino R.; Biomaterials 26 (2005) 739-744
- [4] Burnat B., Błaszczyk T., Leniart A., Scholl H., Klimek L.; Engineering of Biomaterials 63-64 (2007) 28-31
- [5] Boyd D. A., Greengard L., Brongersma M., El-Naggar M. Y., Goodwin D. G.; Nano Letters 11 (2006) 2592-2597
- [6] Leeuwenburgh S., Wolke J., Schoonman J., Jansen J. A.; Journal of Biomedical Materials Research A 74 (2005) 275-284
- [7] Zhou W., Zhong X., Wu X., Yuan L., Shu Q., Xia Y., Ostrikov K.; Journal of Biomedical Materials Research A 81 (2007) 453-464



RYS.5. Charakterystyki potencjodynamiczne dla stopu Panacea P558 bez warstw i z warstwami  $TiO_2$ .

FIG.5. Potentiodynamic characteristics for Panacea P558 alloy without and with  $TiO_2$  layers.

range, and corrosion damages formed above breakdown potential become immediately passivated. Samples both with  $TiO_2$  layers and without these layers heated at 450°C have lower values of current density in passive region as well as higher breakdown potential values as compared with typical prepared samples. Potentiodynamic characteristics for samples both with and without  $TiO_2$  layers after heating at 800°C unequivocally confirm deterioration of corrosion features of alloy after heat treatment at this temperature. These characteristics have no passive region and their shapes indicate that at low overpotential value vs.  $E_{cor}$  rapid corrosion process is occurring.

Summarizing, it can be stated that  $TiO_2$  sol-gel layers heated at 450°C considerably improve corrosion features of Panacea P558 alloy. Heat treatment of this alloy at 800°C results in high instability of its corrosion features in Tyrode's solution - samples both without and with  $TiO_2$  layers rapidly change their properties and finally they have worse corrosion parameters than initial alloy (without any surface modification). The reason for these worse corrosion features of Panacea P558 alloy heated at 800°C may be changes of its microstructure (segregation of alloy components) as well as alloying elements carbides formed at this temperature.

#### Acknowledgement

This work was supported by grant No. 506/813 of University of Lodz. The authors wish to express their thanks to Prof. P. J. Uggowitzer and Böhler Edelstahl GmbH for PANACEA P558 alloy.

#### References

- [8] Głuszek J.; "Tlenkowe powłoki ochronne otrzymywane metodą sol-gel", Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998
- [9] Chen X., Mao S. S.; Journal of Nanoscience and Nanotechnology 4 (2006) 906-925
- [10] Miszczak S., Pietrzyk B., Gawroński Z.; Inżynieria Materiałowa 5 (2005) 682-684
- [11] Burnat B., Błaszczyk T, Scholl H., Klimek L.; Engineering of Biomaterials 77-80 (2008) 63-67
- [12] Zhao H., Humbeeck J., Sohier J., Scheerder I.; Journal of Materials Science: Materials In Medicine 13 (2002) 911-916
- [13] Piwoński I.; Thin Solid Films 515 (2007) 3499-3506
  [14] Liu J-X., Yang D-Z., Shi F., Cai Y-J.; Thin Solid Films 429 (2003) 225-230

. . . . . . . . . . . . . . . .

## NOWEHYBRYDOWEPOWŁOKI DLC-POLIMER JAKO POTENCJALNE POWŁOKI PRZECIWZUŻYCIOWE NA IMPLANTY STAWU BIODROWEGO TYPU "RESURFACING"

E.Choińska<sup>1\*</sup>, M.M.Spychalski<sup>1</sup>, Ł.Ciupiński<sup>1</sup>, W.Święszkowski<sup>1</sup>, V.-M.Tiainen<sup>2</sup>, K.J. KurzydŁowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Projektowania Materiałów, Wydziałą Inżynierii Materiałowej, Politechnika Warszawska, Wołoska 141, 02-507 Warszawa, Polska <sup>2</sup>The Invalid Foundation, ORTON Research Institute, 10 Tenholantie, 00280 Helsinki, Finland \*MAILTO: choinska.emilia@gmail.com

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 66-68]

#### Wprowadzenie

Proteza stawu biodrowego typu "resurfacing" pozwala na maksymalną ochronę zdrowej kości pacjenta, a to przyspiesza proces gojenia oraz ułatwia ewentualną późniejszą operację rewizyjną [1-3]. Niestety nadal istnieje problem metalicznych produktów zużycia, mogących prowadzić do osteolizy i aseptycznego obluzowania implantu [4-5]. Aby zapobiegać takim komplikacjom, naukowcy badają wiele materiałów, które mogłyby być użyte jako powłoki przeciwzużyciowe na implanty. Jednym z takich materiałów jest diamond-like carbon (DLC). Charakteryzuje się on świetnymi właściwościami mechanicznymi, tribologicznymi i biologicznymi. Dlatego też jest proponowany jamo materiał na powłoki na implanty przenoszące duże obciążenie, druty prowadzące (prowadniki), stenty oraz zastawki serca [6-8].

Współczynnik tarcia oraz zużycie DLC zależą od wielu parametrów, ale jednym z kluczowych jest smarowanie [9,10]. Kombinacja DLC z hydrofobowymi polimerami, takimi jak politetrafluoroetylen (PTFE) i polidimethylosiloksan (PDMS) może poprawić hybrydowe właściwości DLC [11]. Dzięki temu nowe hybrydowe powłoki DLC-polimer mogą zapewnić lepsze smarowanie, a więc również poprawę właściwości tribologicznych.

W pracy badano nowe powłoki hybrydowe DLC-polimer naniesione na podłoże ze stali AISI 316L. Badania obejmowały charakteryzację stanu i chropowatości powierzchni, analizę składu chemicznego oraz właściwości mechanicznych powłok.

#### Materiały i metody badań

Powłoki hybrydowe DLC-PDMS i DLC-PTFE (DLC-p-h) zostały naniesione na polerowane i czyszczone próbki ze stali AISI 316L przy użyciu metody Filtrowanych Impulsowych Wyładowań Aukowych (ang. Filtered Pulsed Arc Discharge FPAD, RYS.1) [11-14]. W metodzie tej plazma jest wytwarzana w próżni poprzez wyładowania pomiędzy katodą (grafitowo-polimerową) a anodą. Generowana impulsowo plazma jest odginana za pomocą zsynchronizowanego solenoidu i kierowana w stronę powierzchni próbki. Cewka odfiltrowuje większość niepożądanych cząstek pochodzących z katody.

Badano po cztery próbki powłok każdego typu. Grubość nowych powłok DLC-p-h mierzono za pomocą profilometru

## NEW DLC-POLYMER HYBRID COATINGS AS A POTENTIAL ANTI-WEAR COATINGS FOR RESURFACING HIP IMPLANTS

E.Choińska<sup>1\*</sup>, M.M.Spychalski<sup>1</sup>, Ł.Ciupiński<sup>1</sup>, W.Święszkowski<sup>1</sup>, V.-M.Tiainen<sup>2</sup>, K.J. Kurzydłowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Materials Design Division,
Faculty of Materials Science and Engineering,
Warsaw University of Technology,
141 Woloska str., 02-507 Warsaw, Poland
<sup>2</sup>The Invalid Foundation, ORTON Research Institute,
10 Tenholantie, 00280 Helsinki, Finland
\*MAILTO: Choinska.emilia@gmail.com

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 66-68]

#### Introduction

The hip resurfacing implant allows maximum preservation of the patient's own bone. It speeds up the healing process and facilitates possible revision surgery[1-3]. But there are still problems with metallic wear debris, which can lead to osteolysis and aseptic loosening of the implant[4-5]. To prevent this complication researchers study large number of materials which can be used as wear-resistant coatings on implants. One of these materials is diamond-like carbon (DLC). This material is characterized by excellent mechanical, tribological and biological properties. Therefore, it is proposed as coating on load bearing implants, coated guidewires, stents and heart valves [6-8].

Coefficients of friction and wear of the DLC depend on many parameters, but one of the crucial factors is a joint lubricant [9,10]. Combination of DLC with hydrophobic polymers, like polytetrafluoroethylene (PTFE) and polydimethysiloxane (PDMS), can improve hydrophobic properties of the DLC [11]. Therefore, the novel DLC-polymer hybrid coatings can exhibit better lubrication and thus improved tribological properties.

In the present study, the novel DLC-polymer hybrid coatings deposited on AISI316L stainless steel were studied. These coatings were investigated in terms of surface characterization, chemical composition and mechanical properties.

#### Materials and methods

The DLC-PDMS as well as DLC-PTFE hybrid coatings (DLC-p-h) were deposited on polished and cleaned samples of stainless steel AISI316L using filtered pulsed arc discharge (FPAD) method (see FIG.1) [12-14]. In FPAD plasma is produced by discharging a capacitor bank between a cathode (polymer-graphite) and an anode in vacuum. The generated plasma pulse is deflected with synchronized pulsed solenoid and steered towards the sample. The solenoid filters out most of the unwanted particles, emanating from the cathode.

Four samples of every coatings were tested. The thickness the novel DLC-polymer hybrid coatings was measured using stylus profiler (Dektak IIa). The coatings roughness was measured using optical profilometer Wyko NT9300 and contact profilometer Taylor-Hobson. The surface topography was observed at SEM Hitachi 2600-N and Hitachi TM-1000. The chemical composition of the coatings was investigated using SEM/EDS Hitachi 2600-N and ESCALAB-210 (X-Ray contaktowego oraz skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Do pomiaru chropowatości użyto optycznego profilometru Wyko NT9300 oraz profilometru kontaktowego Tylor Hobson. Obserwacje topografii powierzchni wykonano przy użyciu SEM Hitachi 2600-N i Hitachi TM-1000. Skład chemiczny badano za pomocą SEM/EDS Hitachi 2600-N i ESCALAB-210 (spektroskop fotoelektronów wybitych promieniowaniem X- XPS). Właściwości mechaniczne, takie jak nanotwardość (H) oraz zredukowany moduł sprężystości ( $E_{\tau}$ ), mierzono za pomocą nanoindentera (Hysitron) z wgłębnikiem Bercovich'a. Pomiary wykonano według dwuetapowej metody stosowanej do badań właściwości mechanicznych twardych warstw (maksymalna głębokość indentacji nie powinna przekraczać 1/5 (1/10) grubości powłoki [15-17].

#### Wyniki

Wyniki pomiaru grubości otrzymane dwiema różnymi metodami były zbliżone (TABELA 1). Zakres otrzymanych wartości wynosił 0,3-4,3µm. Wiadomo, że powłoki DLC grubsze niż 0.5µm często, na skutek dużych naprężeń wewnętrznych, maja tendencję do delaminacji. Jednak w prezentowanym przypadku ten efekt nie wystąpił. Związane jest to z właściwościami substratu oraz dodatkowo wprowadzonego polimeru. Stal 316L jest klasyfikowana jako "miękki" materiał, więc może lokalnie uginać się, a poprzez to tłumić efekt naprężeń ściskających [18]. Natomiast dodanie polimeru zmniejsza naprężenia wewnętrzne w warstwie.

Mikroskopowe badanie topografii próbek (RYS.2) ujawniło występowanie na powierzchni cząstek pochodzących z katody oraz porów. Ilość tych defektów jest wyższa dla DLC-PTFE-h. Na warstwie DLC-PDMS-h jest ich znacznie mniej. Nie zaobserwowano innych defektów. Dodatkowo, dla pomiaru chropowatości próbek DLC-PDMS-h metodą kontaktową, uzyskano niższe wartości niż dla pomiaru optycznego. Na wartości wyników uzyskanych metodą optyczną prawdopodobnie wpłynął zbyt niski współczynnik odbicia badanych powłok (TABELA 1).

Badania składu chemicznego powłok i czystych polimerów wykonano na SEM/EDS. Jednak ze względu na zbyt małą grubość otrzymano sygnał od F, Cr, Ni i Mn z substratu. Dlatego wykonano bardziej dokładną analizę HR XPS (TABELA 2). Zwykle wyniki uzyskane tą metoda pozwalają zarówno na określenie składu chemicznego, jak też na oszacowanie zawartości frakcji węgla o hybrydyzacji sp<sup>3</sup>. W tym przypadku pomiar zawartości frakcji sp<sup>3</sup>, był praktycznie niemożliwy, ponieważ różnica energii pomiędzy atomami węgla z polimeru i DLC jest bardzo mała i nie można stwierdzić, z którego materiału pochodzi sygnał.

Rodzaj	Grubo	Chropowato Roughness R <sub>a</sub> [nm]				
powłoki Type of coatings	Thickness [µm]	Metoda optyczna Optical method	Metoda kon- taktowa Contact method			
DLC- PDMS-h	2,8-3,5	26,9-39,1	14,4-16,2			
DLC- PTFE-h	0,3-3,4	29,5-37,3	16,7-25,4			

TABELA 1. Grubość powłok oraz chropowatość powierzchni powłok. TABLE 1. Thickness and roughness of the coa-

tings.



Photoelectron Spectroscope – XPS). The measurements of mechanical properties of DLC-p-h coatings, such as nanohardness (H) and reduced elastic modulus ( $E_{\rm t}$ ), were done using nanoindenter (Hysitron) with Berkovich indenter. The measurements were done according to a two-step penetration method used to investigate the mechanical properties of coatings, with assumption that maximal depth of tip penetration shouldn't exceed 1/5 (1/10) of coatings thickness[15-17].

#### Results

The results of thickness measurement are shown in TABLE 1. The range of thickness values was between 0.3 and 4.3µm. It is known that the DLC coatings thicker than 0.5µm often show a tendency to delamination, because of the high internal stress. However, in presented case this effect doesn't occur, which can be attributed to the substrate material properties and to the polymer addition. Stainless steel 316L is classified as a "soft" material, so it can yield locally below the film, and thereby absorb the compressive stresses [18]. The addition of polymer decreases the internal stresses.

The microscopic investigations of the sample topography (FIG.2) showed that some particles and pores appeared on the coatings surfaces. The number of these defects is higher for the DLC-PTFE hybrid coatings. There are markedly less of them for the DLC-PDMS-h. No other defects have been observed. The roughness measurements by contact method of DLC-PDMS-h coatings yield the lower values. The optical measurements were inconclusive; possibly the coatings are not reflective enough (TABLE 1).

The investigations of chemical composition of the coatings and pure polymers were done using SEM/EDS. Because the thicknesses of the coatings were too small, the signals of Fe, Cr, Ni and Mn from the substrate have been recorded. Therefore, more accurate HR XPS analysis was performed (TABLE 2). Usually the results of the XPS allow to define the chemical composition and also to estimate the contents of sp<sup>3</sup> carbon fraction in the DLC. In this case, the percentage of sp<sup>3</sup> fraction in the DLC-polymer hybrid coatings is practically impossible to measure, because the difference between energy of carbon atoms in polymer and in DLC are very small.

The mechanical properties were measured using nano-indentation test. The indentation load of 10mN was applied



RYS.2. Zdjęcia SEM powierzchnia powłok: a)DLC-PDMS-h, b)DLC-PTFE-h. FIG.2. SEM images of the surface of the coatings: a)DLC-PDMS-h, b)DLC-PTFE-h.

6	0
О	О
-	-

Element	C [at.%]	0 [at.%]	Si [at.%]	F [at.%]
DLC-	42,41	21,75	35,84	-
PDMS-h	± 0,57	± 0,42	± 0,57	
PDMS	37,44 ± 2,23	22,27 ± 1,37	40,29 ± 0,85	-
DLC-	67,01	0,61	0,79	31,51
PTFE-h	± 1,07	± 0,31	± 0,43	± 0,93
PTFE	59.57	0,29	0,25	39,89
	± 0,77	± 0,25	± 0,13	± 0,21

#### TABELA 2. Skład chemiczny powłok. TABLE 2. Chemical composition of the coatings.

Właściwości mechaniczne mierzono za pomocą nanoindentacji, przy zastosowaniu obciążenia równego 10mN (RYS.3). Wyniki tych pomiarów są interesujące, zwłaszcza w porównaniu z właściwościami czystych PDMS oraz PTFE, jak też często stosowanego materiału na implanty, np. UHMWPE [19-20]. Powłoki hybrydowe charakteryzują się wyższą twardością i sztywnością niż niemodyfikowane polimery oraz wspomniany wcześniej UHMWPE.

#### Wnioski

Metoda FPAD pozwala na wytwarzanie warstw hybrydowych DLC-polimer. Przedstawione badania wykazały, że analizowane powłoki charakteryzują się gładką powierzchnią. Ich skład chemiczny jest jednorodny, natomiast na powierzchni występują tylko nieliczne defekty. Ilość tych defektów/wbudowanych cząstek jest większa dla powłok DLC-PTFE-h i maleje dla powłok DLC-PDMS-h. Natomiast wartości zredukowanego modułu sprężystości oraz nanotwardości warstw hybrydowych DLC-polimer są zdecydowanie wyższe niż dla PDMS, PTFE oraz często stosowanego w implantach stawów UHMWPE.

#### Podziękowania

Praca powstała w ramach projektu RSHI-DLC nanocomp.

#### Piśmiennictwo

[1] Schmalzried TP, Why total hip resurfacing, J Arthr 2007; 22, no.7,suppl.3: 57-60

[2] Buergi ML, Walter WL, Hip resurfacing arthroplasty, the australian experience, J Arthr 2007; 22, no.7,suppl.3:61-65

[3] www.birminghamhipresurfacing.com

[4] Pritchett JW, Curved-stem hip resurfacing, minimum 20-year followup, Clin Orthop Relat Res 2008; 466:1177-1185

[5] Roberts P, Grigoris P, Bosh H, Talwaker N, Resurfacing arthroplasty of the hip, Curr Orthop 2005; 19: 263-279

[6] Roy RK, Lee KR, Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review, J Biomed Mater Res 2007; 83B: 72-84

[7] Hauert R, A review of modified DLC coatings for biological applications, Diamond Relat Mater 2003; 12: 583-589

[8] Lettington AH, Applications of diamond-like carbon thin film, Carbon 1998; 5-6: 555-560

[9] Scholes SC, Unsworth A, Goldsmith AAJ, A frictional study of total hip joint replacements, Phys Med Biol 2000; 45: 3721-3735

[10] Zhang W, Tanaka A, Tribological properties of DLC films deposited under various conditions using a plasma-enhanced CVD, Tribology Internat 2004; 37: 975-982

[11] Kiuru M, Alakoski E, Low sliding angles in hydrophobic and oleophobic coatings prepared with plasma discharge method, Mater Lett 2004; 58: 2213-2216

[12] Anttila A, Hirvonen JP, Koskinen J, US Patent 5078848, 1992



RYS.3. Właściwości mechaniczne powłok hybrydowych oraz PDMS, PTFE i UHMWPE. FIG.3. Mechanical properties of the hybrid coatings, PDMS, PTFE and UHMWPE.

(FIG.3). These hardness measurements results are interesting, especially when compared with properties of pure PDMS and PTFE as well as other often used for implants materials e.g. UHMWPE [19-20]. The hybrid coatings have higher hardness and stiffness than the untreated polymers and also than UHMWPE.

#### Conclusions

The FPAD method allows for fabrication of DLC-polymer hybrid coatings. The presented study showed that a characteristic feature of tested coatings was smooth surface. Their chemical composition is homogenous and microstructure reveals few defects. The number of these defects/embedded particles is higher for DLC-PTFE-h coatings and decreases for DLC-PDMS-h coatings. The values of reduced elastic modulus and nanohardness for DLC-polymer hybrid coatings are significantly higher than for pure PDMS, PFFE and often used in joint implants, UHMWPE.

#### Acknowledgments

This work was supported by RSHI-DLC nanocomp project.

#### References

[13] Anttila A, Tiainen VM, Kiuru M, Alakoski E, Arstila K, Preparation of diamond-like carbon polymer hybrid films using filtered pulsed arc discharge method, Surf Eng 2003; 19 no.6: 425-428

[14] Alakoski E, Kiuru M, Tiainen VM, Anttila A, Adhesion and quality test for tetrahedral amorphous carbon coating process, Diamond Relat Mater 2003; 12: 2115-2118

[15] Tian J, Han Z, Lai Q, Yu X, Li G, Gu M, Two-step penetration: a reliable method for the measurement of mechanical properties of hard coatings, Surf Coatings Tech 2004; 176: 267-271

[16] Pharr GM, Measurement of mechanical properties by ultra-low load indentation, Mater Sci Eng 1998; A253: 151-159

[17] Schen W, Sun J, Liu Z, Mao W, Nordstrom JD, Ziemer PD, Methods for studying the mechanical and tribological properties of hard and soft coatings with nano-indenter, JCT Research 2004, 1, no.2: 117-125

[18] Robertson J, Diamond-like amorphous carbon, Mater Sci Eng 2002; R37: 129-281

[19] Park K, Mishara S, Lewis G, Losby J, Fan Z, Park JB, Quasistatic and dynamic nanoindentation studies on highly crosslinked ultra-high-molecular-weight polyethylene, Biomaterials 2004; 25: 2427-2436

[20] Wang S, Ge S, The mechanical property and tribological behavior of UHMWPE: Effect of molding pressure, Wear 2007; 263: 949-956

.....

## CHARAKTERYSTYKA WŁASNOŚCI WYTRZYMAŁOŚCIO-WYCH POWŁOK HYDROKSY-APATYTOWYCH

#### AGATA DUDEK\*

Politechnika Częstochowska Dąbrowskiego 69, 42-200 Częstochowa \*MAILTO: dudek@mim.pcz.czest.pl

#### Streszczenie

Zainteresowanie biomateriałami, związane z możliwością zastosowania ich na implanty, powoduje z jednej strony nieustanny wzrost wymagań stawiany tego typu materiałom, z drugiej natomiast, poszukiwanie nowych metod i technologii poprawiających ich własności użytkowe. Najczęstsze zmiany składu chemicznego kompozytu ochronnego, tworzonego na powierzchni implantu, polegają na wprowadzeniu do ceramiki hydroksyapatytowej roztworu stałego Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> w ZrO<sub>2</sub> (YSZ). Priorytetowym celem proponowanych w ramach niniejszej pracy badań była poprawa własności wytrzymałościowych na granicy powłoka-podłoże. Własności te zostały określone przy pomocy testu, polegającego na zarysowaniu (Scratch Test) powłoki ceramicznej.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 69-71]

#### Wstęp

Na przestrzeni ostatnich lat wzrosło zainteresowanie powłokami hydroksyapatytowymi w zastosowaniach medycznych. Zakres stosowania hydroksyapatytu (HA, HAp) Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> w medycynie jest ograniczony z powodu niskich własności wytrzymałościowych, przede wszystkim niskiej odporność na kruche pękanie gotowych wyrobów. Z tego względu implanty hydroksyapatytowe są stosowane w stomatologii, chirurgii szczękowo-twarzowej, ortopedii i otolaryngologii, w postaci kształtek i granul porowatych, do uzupełniania ubytków kostnych w miejscach nie przenoszących znacznych obciążeń mechanicznych. Hydroksyapatyt ponadto stosuje się w formie powłok na innych materiałach, głównie metalach (np. pokrycia trzpieni endoprotez stawu biodrowego). Czynnikami, które warunkują i wpływają na jakość powłoki są miedzy innymi: mikrostruktura, stopień amorficzności, skład chemiczny i fazowy, siła adhezji oraz rozpuszczalność w roztworach fizjologicznych [1].

Głównym, stosowanym na skalę przemysłową sposobem nanoszenia powłok HA na powierzchnię implantów jest technika plazmowa, wykorzystywana od 1985 roku. Zastosowanie tej techniki (atrakcyjnej ze względów ekonomicznych), prowadzi do uzyskiwania warstw z hydroksyapatytu o grubości w zakresie od 40-400µm [1]. Powstałe w ten sposób powłoki tworzą trwałą więź kontaktową z tkanką biologiczną, a poprzez procesy resorpcji i wrastania, stwarzają możliwość regeneracji kości, na bazie ceramicznej matrycy. Metoda natryskiwania plazmowego umożliwia stapianie wprowadzonych do strumienia natryskowego materiałów powłokowych i nadawanie tworzącym się kroplom dużej szybkości w momencie uderzania o powierzchnię przedmiotów pokrywanych powłokami. Granule proszku ulegają powierzchniowemu stopieniu i stają się tworami dwuwarstwowymi, złożonymi z

## CHARACTERISTICS OF ADHESIVENESS IN PLASMA SPRAYED HYDROXYAPATITE COATINGS

AGATA DUDEK\*

TECHNICAL UNIVERSITY OF CZESTOCHOWA 69 DABROWSKIEGO STR., CZESTOCHOWA, POLAND \*MAILTO: DUDEK@MIM.PCZ.CZEST.PL

#### Abstract

Growing interest in biomaterials, combined with opportunities of their use for implants causes, on the one hand, incessantly growing expectations imposed on these materials. On the other hand, new methods and technologies of improvement in their functional properties are required. The most frequent changes in chemical composition of the protective composite, created on the surface of an implant include introduction of solid solution of  $Y_2O_3$  in  $ZrO_2$  (YSZ) into hydroxyapatite ceramics. A priority goal of the investigations presented within this work was to improve mechanical properties on the base material – coating interface. These properties were determined by means of scratch tests on ceramic coating.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 69-71]

#### Introduction

Last years have seen an increased interest in hydroxyapatite coatings used for medical applications. The scope of hydroxyapatite (HA, HAp)  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  application is limited by low mechanical properties, particularly low resistance to brittle fracture in finished goods. Due to this reason, hydroxyapatite implants have been widely in use in dentistry, facial surgery, orthopaedics, otolaryngology in the form of shaped pieces and porous granules for replenishment of bone defects in the locations which do not bear mechanical load. Hydroxyapatite is also used for coatings on other materials, particularly on metals (e.g. coatings in femoral bone prosthesis stems). The factors which impact on quality of the coating include microstructure, degree of amorphization, chemical and phase composition, adhesion force and solubility in physiological solutions.

Main method of manufacturing of HA coatings on industrial scale is plasma technology, used since 1985. Use of this technology (which is attractive mainly due to economic reasons) leads to obtaining hydroxyapatite layers with thickness within the range of 40-400µm [1]. The obtained coatings create fixed bonds with biological tissue and, through the processes of resorption and osseointegration, they create opportunities of bone regeneration, based on ceramic matrix. The method of plasma spraying enables melting of coating components introduced into the spray stream and generating high speeds of the drops at the point of their hitting against the surface of the items covered with the coatings. Powder granules are melted on the surface and they become two-layer structures, made of amorphous surface layer and a crystalline, not melted core. The coatings obtained like this show higher adhesion to titanium base and are more coherent internally.

A key component in the plasma spraying device is arc plasmatron (FIG.1).

ш 🇰

niowej warstwy amorficznej oraz krystalicznego, niestopionego wnętrza. Powłoki tak otrzymane wykazują większą

ność do

tytanowego podłoża, są bardziej spójne wewnętrznie [2-3].

Podstawowym elementem urządzenia do natryskiwania powłok jest plazmotron łukowy (RYS.1).

Dużą zaletą metody natryskiwania jest możliwość regulowania w dość szerokim zakresie porowatości powłok za pomocą parametrów natryskiwania.

#### Badania własne

Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka mechanicznych właściwości na granicy powłoka-implant. Charakterystykę tę wykonano poprzez analizę siły adhezji powłoki do podłoża, analizę występujących pęknięć i odkształceń oraz obliczenie takich parametrów jak: siła i współczynnik tarcia, siła krytyczna.

W ramach badań wykonano metodą natryskiwania

RYS.1. Palnik plazmowy prądu stałego [3]: 1-popychacz, 2-korpus katody, 3-tuleja, 4-korpus anody, 5-obsada katody, 6-podkładka, 7-katoda, 8-nakładka, 9-anoda.

FIG.1. Direct current plasma torch [3], 1-pusher, 2-cathode body, 3bushing, 4-anode body, 5-cathode sleeve, 6-washer, 7-cathode, 8-housing, 9-anode.

A big advantage of spraying is its possibility to control, within a wide range, porosity of the coatings by means of change in spraying parameters.

The Investigations

The purpose of the investigations was to obtain a characteristics of mechanical properties on the coating - implant interface. This characteristics was obtained through analysis of the force of adhesion to the base materials and analysis of cracking

and deformations as well as calculations of such parameters as: force, friction coefficient and critical force.

The investigations encompassed hydroxyapatite layers with thickness of ca. 200µm (FIG.2) obtained by means of plasma spraying. In order to investigate the impact of addition of ZrO<sub>2</sub> zirconia phase modified with 8%wt.Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on mechanical properties of the coating, the coatings were prepared



RYS.3. Wykresy powstałe w wyniku zarysowania powłok, a) 100%HA, b) 80%HA, c) 60%HA, d) 50%HA. FIG.3. Charts obtained as a result of scratching, a) 100%HA, b) 80%HA, c )60%HA, d) 50%HA.



powierzch-

przyczep-



#### RYS.4. Geometria powstałej linii zarysowania. FIG.4. Scratch line geometry.

plazmowego hydroksyapatytowe powłoki o grubości około 200µm (RYS.2). W celu zbadania wpływu dodatku fazy cyrkonowej ZrO<sub>2</sub> modyfikowanej 8% wt.Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na własności wytrzymałościowe otrzymywanej powłoki, wykonano powłoki ze zmienną zawartością tlenku cyrkonu: 80%HAp+20%YSZ, 60%HAp+40%YSZ oraz 50%HAp+50%YSZ, (YSZ-tlenek cyrkonu stabilizowany dodatkiem Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Badania przyczepności wykonanych powłok przeprowadzono na urządzeniu Revetest XPress Plus przy użyciu penetratora Rockwella. Test wykonano stosując następujące parametry: zadane obciążenie: 1 – 160N, długość rysy: 10mm, prędkość zarysowania: 1,89 mm/min. Uzyskane wykresy przedstawiają RYS.3 a-d.

Głębokość "zarysowanego" obszaru (jego wymiary liniowe) były ściśle uzależnione od zadanych parametrów testu. Wraz ze wzrostem zadanej siły, następowała zmiana profilu linii zarysowania. Stykające się powierzchnie (penetrator-powłoka) znajdując się w złożonym stanie naprężeń

Przeprowadzone badania przyczepności powłok bioce-

ramicznych, pozwoliły na charakterystykę układu powłoka/

podłoże [HA(+ZrO<sub>2</sub>)/Ti-6AI-4V] poprzez wartości takich pa-

rametrów jak: współczynnik tarcia, siła tarcia, krytyczna siła

obciążenia powłok przy której ulegały one rozwarstwieniu.

przy której powłoka ulegała odwarstwieniu od podłoża. W

przypadku 50% dodatku ZrO<sub>2</sub> w porównaniu z powłokami

Praca zrealizowana w ramach projektu nr 507463733

100%HA, wartość omawianej siły wzrosła około 13%.

Dodatek tlenku cyrkonu wpływał na wzrost siły krytycznej

i odkształceń, prowadząc do osiągnięcia wartości krytycznych dla poszczególnych badanych powłok.

Zautomatyzowane obserwacje mikroskopowe pozwoliły na analizę linii zarysowania na całej zadanej długości. Przykładowy wykres geometrii zarysowania przedstawiono na RYS.4-6.

Podsumowanie



RYS.6. Linia zarysowania powłoki diamentowym wgłębnikiem.

FIG.6. Scratch line obtained by means of diamond indenter .



RYS.5. Geometria powstałej linii zarysowania, 3D. FIG.5. Scratch line geometry, 3D.

with different content of zirconia phase: 80%HAp+20%YSZ, 60%HAp+40%YSZ and 50%HAp+50%YSZ, (YSZ-zirconium oxide stabilized with addition of  $Y_2O_3$ ).

Adhesion tests for the coatings were carried out by means of Revetest XPress Plus device with Rockwell indenter. The tests were carried out using the following parameters: load of 1 - 160N, scratch length: 10 mm, scratch rate: 1,89 mm/min. The obtained charts are presented in FIG. 3 a-d.

The depth of the scratched area (its linear dimensions) were closely dependent on the adopted test parameters. Rise in the used force caused change in scratch line profile.

The adjacent surfaces (i.e. indenter – coating) were in a complex state of stresses and deformations, leading to reaching critical values for each of the investigated coatings

Automated microscope observations enabled analysis of the scratch line throughout the whole length. An example of scratch geometry chart is presented in FIG.4.

#### Conclusions

The investigations of adhesion force in bioceramic coatings allowed for characteristics of coating/base material system [HA(+ZrO<sub>2</sub>)/Ti-6AI-4V] through analysis of the values such as: friction coefficient, friction force, critical load force for the coatings at which they were

separated. Addition of zirconium oxide impacted on rise in critical force at which the coating separated from the base material. In the case of 50% addition of  $ZrO_2$ , as compared to 100%HA coating, the value of the force accounted for ca. 13% as compared to 100%HA coating.

#### Acknowledgements

Scientific work funded by the Ministry of Education and Science in the years 2007-2010 as a research project No. 507463733

#### Piśmiennictwo

Podziękowania

[1] Marciniak, Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2002

[2] Dudek A., Przerada I., Bałaga Z., Morel S. Krystalizacja natryskiwanej plazmowo powłoki hydroksyapatytowej, Inżynieria Materiałowa, Nr 6, 2008

#### References

[3] Morel S., Powłoki natryskiwane cieplnie, Politechnika Częstochowska, Monografie 48, Częstochowa, 1997

• • • • • • • • • • • • • • • • • • •

## STABILNOŚĆ WARSTWY PLATYNOWEJ OSADZONEJ NA STOPIE NITICO WYKAZUJĄCYM EFEKT PAMIĘCI KSZTAŁTU

T.GORYCZKA\*, J.LELĄTKO, E.RÓWIŃSKI

UNIWERSYTET ŚLĄSKI, INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLSKA \*MAILTO: TOMASZ.GORYCZKA@US.EDU.PL

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 72-74]

#### Wstęp

Stopy Ni-Ti-Co wykazujące efekt pamięci kształtu z zawartością Co nie większą niż 3%at są z powodzeniem stosowane w medycynie na krótko-terminowe implanty. Liczne przykłady opisane w literaturze wskazują, że stopy te często są używane na druty ortodontyczne oraz klamry do spajania złamań kostnych [1,2]. W porównaniu do tradycyjnych dwuskładnikowych stopów NiTi, wprowadzenie kilku procent kobaltu w miejsce niklu poszerza temperaturową pętlę histerezy odwracalnej przemiany martenzytycznej. Powoduje to opóźnienie zainicjowania efektu pamięci kształtu, co w konsekwencji poprawia komfort prowadzenia operacji wydłużając czas potrzebny na przygotowanie odpowiedniego kształtu klamry czy też drutu. Zarówno stopy NiTi jak i zmodyfikowane stopy NiTiCo charakteryzują się dobrą biozgodnością oraz odpornością korozyjną. Jednakże istnieje obawa uwalniania atomów niklu i kobaltu, w postaci jonów, z implantów wykonanych z tych stopów do organizmu ludzkiego stwarzając rakotwórcze zagrożenie. Dlatego, w implantach długoterminowych, powierzchnię stopów wykazujących efekt pamięci kształtu pokrywa się warstwami ochronnymi. Znane są z danych literaturowych pokrycia stopów NiTi azotkiem tytanu, tlenkami lub węglem, co tworzy barierę zapobiegającą dyfuzji niklu i skutecznie ogranicza korozję [3]. Dla stopów Ni-Ti-Co korzystnym rozwiązaniem jest również pokrycie powierzchni stopu cienką, ochronną warstwa platyny [4].

Powszechnie znanym jest fakt, że organizm ludzki traktuje implant, jako intruza powodującego lokalne podwyższenie temperatury. Było to powodem podjęcia badań nad stabilnością warstwy platyny w podwyższonych temperaturach.

#### Część eksperymentalna

Cienka warstwa platyny została napylona przy użyciu napylarki magnetronowej na obie wytrawione powierzchnie stopu o składzie chemicznym: Ti-47%at. Ni-3%at. Co. Taśmę odlano stosując technikę szybkiego schładzania z fazy ciekłej w układzie podwójnego bębna chłodzącego. Grubość otrzymanej warstwy wyniosła 1.45µm. Nanoszenie warstwy odbyło się przy zastosowaniu stałej mocy 100W z szybkością nanoszenia 0.5nm/s. Struktura warstwy platynowej oraz jej skład chemiczny był badany stosując elektronowy mikroskopy skaningowy (JSM-6480) oraz transmisyjny mikroskopy elektronowy (JEM 3010).

Stabilność warstwy była określona poprzez pomiar składu chemicznego stosując spektrometr elektronów Augera (SEA 02). Próbka była wygrzewana wewnątrz spektrometru w temperaturze 42°C w czasie 6 tygodni. Analiza składu chemicznego była prowadzona na podstawie zróżniczkowanych widm Augera. Widma Augera mierzono używając pierwotnej wiązki elektronów o energii 3keV i prądzie 1.4nA.

## STABILITY OF PLATINUM LAYER DEPOSITED ON NITICO SHAPE MEMORY ALLOY

T.GORYCZKA\*, J.LELĄTKO, E.RÓWIŃSKI

UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, 12 BANKOWA STR., 40-007 KATOWICE, POLAND \*MAILTO: TOMASZ.GORYCZKA@US.EDU.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 72-74]

#### Introduction

The Ni-Ti-Co shape memory alloys, with Co content lower than 3at.%, have been successfully applied in medicine as short term implants. Literature data revealed that they can be use for an orthodontic wire or a clamp for fracture joining [1,2]. In comparison to traditional binary NiTi alloy, addition of cobalt instead of nickel increases thermal hysteresis of the reversible martnesitic transformation. It causes increase of time for triggering of the shape memory effect. In consequence, a surgeon has enough time for preparing appropriate shape of clamps or wire. Both elements: nickel and cobalt are known from their carcinogenesis when appears in the free state. In the NiTi-based alloy they show good biocompatibility and corrosion resistance. However, for fear of their diffusion to a human body, in long term implants, surface of the shape memory alloys is covered by protective layer. It was reported that, for NiTi alloys, coating with titanium nitrides, oxides or carbides seems to be an attractive way to create a barrier against ion of nickel and sufficiently reduces corrosion [3]. For the Ni-Ti-Co alloy platinum appeared to be a good candidate for layer deposition on the surface [4].

It has been known that human body treats implant as an "intruder" causing local increase of temperature. Thus the aim of presented results was to study stability of platinum layer in elevated temperature.

## Experimental

Thin platinum layer was deposited, using magnetron sputtering technique, on both etched surfaces of a twin roll cast strip with nominal chemical composition Ti-47at% Ni-3at.% Co. The thickness of the layer was 1.45µm. Deposition was carried out at a constant power of 100W with the rate of 0.5 nm/s. Structure and chemical analysis of the platinum layer was studied using a scanning (JSM-6480) and transmission (JEM 3010) electron microscopes.

Stability of the platinum layer was studied by means of chemical analysis using Auger electron spectrometer (SEA 02). The sample was annealed inside of the spectrometer at temperature of 42°C for 6 weeks. Qualitative chemical analysis was carried out on the base of derivative Auger's spectra obtained from measurements using energy of the primary electron beam of 3keV and current of 1.4nA.

#### **Results and discussion**

The Ni-Ti-Co strip was produced using twin roll casting technique. During casting solidification occurred from both rotating wheels causing formation of specific morphology of the surface. Grains are formed in columnar shape in bands parallel to edges of the strip. Due to relatively low thickness of the strip (282µm) platinum was sputtered on previously



RYSUNEK 1. Obraz mikroskopowy SEM (a) i widmo EDS (b) powierzchni taśmy ze stopu NiTiCo z naniesioną warstwą platyny.

FIGURE 1. SEM image (a) and EDS spectrum (b) of surface of NiTiCo ribbons after platinum deposition.

#### Wyniki badań i ich dyskusja

Taśma stopu Ni-Ti-Co wyprodukowana została stosując technikę odlewania ciągłego polegającą na szybkim schładzaniu z fazy ciekłej w układzie podwójnego bebna chłodzacego. Podczas odlewania krzepnięcie taśmy zachodzi jednocześnie od powierzchni obu obracających się bębnów formując specyficzną morfologie powierzchni. Ziarna rosną w kształcie kolumn w pasmach równoległych do boków taśmy. Z powodu relatywnie niewielkiej grubości taśmy (282µm) platyna była napylana na pierwotnie wytrawioną powierzchnie bez jakiegokolwiek jej szlifowania czy polerowania. Grubość warstwy platyny (1.45µm) była wystarczająca do ścisłego pokrycia nierównej powierzchni taśmy. RYSUNEK 1a przedstawia morfologię powierzchni taśmy po napyleniu warstwy platyny. Zmierzone widma EDS potwierdzają obecność platvny na powierzchni taśmy (RYS.1b).

Obserwacje przeprowadzone przy użyciu elektronowego mikroskopu transmisyjnego ujawniły, że warstwa platyny w stanie wyjściowy charakteryzuje się nanokrystaliczną strukturą o wielkości ziaren rządu 41nm (RYS. 2a). Obraz dyfrakcyjny otrzymany z tego obszaru posiada charakter elektronogramu polikrystalicznego (RYS.2b), którego refleksy formują okręgi o promieniach odpowiadających odległością międzypłaszczyznowym charakterystycznym dla platyny.

Szczegółową analizę składu a) chemicznego powierzchni warstwy platyny przeprowadzono przy użyciu spektroskopu elektronów Augera. RYSUNEK 3a przedstawia zmierzone widmo elektronów Augera dla warstwy platyny w stanie wyjściowym. W oparciu o wartości energetycznych położeń pików zidentyfikowano następujące pierwiastki: platyna, tytan, tlen oraz węgiel. Nie stwierdzono obecności niklu oraz kobaltu. W celu zbadania wpływu wygrzewania na migrację niklu i kobaltu poprzez warstwę platyny, próbkę podgrzano do temperatury 42°C i wytrzymano w tej temperaturze przez okres 6 tygodni – jest to w przybliżeniu czas potrzebny na zrośnięcie się odłamów kostnych.



RYSUNEK 2. Obraz mikroskopowy TEM nanokrystalicznej warstwy platyny w stanie wyjściowym (a) oraz zarejestrowany dla niej elektronogram (b).

FIGURE 2. TEM image of as-received nanocrystalline platinum layer (a) and selected area diffraction pattern (b).

etched surface without its grinding either polishing. Thickness of the platinum layer  $-1.45 \,\mu$ m was sufficient for tight covering of the rough strip surface. Figure 1a shows morphology of the surface after platinum deposition. Measured EDS spectrum proved presence of platinum in the surface (FIG.1b).

Observation carried out using transmission electron microscopy revealed that the as-received platinum layer consists of nanocrystalline structure with average diameter

of grains 41nm (FIG.2a). Selected area diffraction pattern (FIG.2b) shows diffraction spots, which create rings with interplanar distance characteristic for the platinum. In aim to prove phase identification calculated rings are compared with measured spots.

Detailed analysis of chemical composition of the top of the platinum layer was carried out using Auger electron spectrometer. FIGURE 3a shows measured Auger spectrum for as-received platinum layer. From determined energy only platinum, titanium, oxygen and carbon were identified. No peak originated in presence of nickel and cobalt was stated. In order to study the influence of annealing on nickel and cobalt migration through platinum layer

2500 Pt peak measured using high sensitivity parameter 2000 1500 1000 dN(E)/dE 500 0 -500 Pt Ti SE -1000 С 0 -1500 50 ò 200 600 100 300 òo 2500 2000 1500 1000 dN(E)/dE 500 0 -500 Pt 1000 0 Тi -1500 C SE ò 100 200 300 400 500 600 Electron Energy [ eV ]

RYSUNEK 3. Zmierzone widma Augera dla warstwy platyny w stanie wyjściowym (a) oraz po wygrzaniu w 42°C w czasie 6 tygodni (b).

FIGURE 3. The experimental Auger spectra obtained for the as-received platinum layer (a) and after annealing at 42°C for 6 weeks (b). BI MATERING OF

Zmierzone widmo elektronów Augera dla próbki wygrzanej przedstawiało podobny przebieg do widma otrzymanego dla powierzchni warstwy platyny w stanie wyjściowym. Temperatura 42°C i wydłużony czas wygrzewania nie spowodowało migracji niklu i kobaltu poprzez warstwę platyny. Ponadto pik pochodzący od elektronów wtórnych (oznaczony jako SE) zmierzony dla warstwy przed i po wygrzaniu nie zmienia swojego położenia ani kształtu. Z tego wynika że wygrzewanie nie zmienia struktury elektronowej warstwy.

#### Wnioski

· Naniesiona magnetronowo warstwa platyny o grubości 1.45µm może ochronić ludzki organizm przed dyfuzją niklu i kobaltu z implantów wykonanych ze stopu typu Ni-Ti-Co.

· Ochronne właściwości otrzymanej warstwy platyny są stabilne nawet wówczas, gdy temperatura ludzkiego ciała osiągnie 42°C i pozostanie na tym poziomie przez okres 6 tygodni.

the sample was heated up to 42°C and left for 6 weeks - approximate time for fractured bone healing. Measured Auger spectrum for annealed sample reveals similar shape to that obtained for the as-received surface. Temperature of 42°C and elongated time of annealing do not cause nickel either cobalt diffusion to top of the platinum layer. Moreover, the peak of secondary electrons (marked as SE) measured for the layer before and after annealing does not change its position and shape. It means that annealing did not change electron structure of the layer.

#### Conclusions

 Magnetron sputtered platinum layer with its thickness of 1.45µm can protect human body against nickel and cobalt migration from the Ni-Ti-Co alloy matrix.

· Protective properties of obtained platinum layer are stable even temperature of human body rises up to 42°C and will keep its level for 6 weeks.

#### Piśmiennictwo

[1]. Duerig T., Pelton A., Stöckel D., Mat. Sci. Eng. A273-275 (1999) 149–160.

[2]. Schiff N., Grosgogeat B., Lissac M., Dalard F., Biomat. 25 (2004) 4535-4542.

[3]. Starosvetsky D., Gotman I., Biomaterials 22 (2001) 1853-

References

[4]. Goryczka T., Lelatko J., Vokoun D., Ochin P., Eng. Biomat., 77-80 (2008) 67-69.

. . . . . . . . . . . . . . . . .

1859.

## **OCENA STANU POWIERZCHNI** STALI STOSOWANEJ NA NARZĘDZIA CHIRURGICZNE ZA POMOCĄ MIKROSKOPU SIŁ **ATOMOWYCH (AFM)**

#### Monika Gwoździk

INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ, MATERIAŁOWEJ I FIZYKI STOSO-WANE.I. POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA AL. ARMII KRAJOWEJ 19, 42-200 CZĘSTOCHOWA MAILTO: GWOZDZIK@WIP.PCZ.PL

#### Streszczenie

Prezentowana praca przedstawia wyniki badań stanu powierzchni stali X39Cr13 z gatunku stali stopowych odpornych na korozję stosowanych na narzędzia chirurgiczne. Badaną stal poddano obróbce cieplnej (hartowanie + odpuszczanie) oraz powierzchniowej (azotowanie jarzeniowe). Po zastosowanych obróbkach powierzchnię próbek analizowano za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM).

Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę wpływu różnych wariantów obróbek na stan powierzchni poprzez parametr chropowatości.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 74-76]

## **EVALUATION OF THE SURFACE** CONDITION OF STEEL USED FOR SURGICAL INSTRUMENTS BY MEANS OF ATOMIC FORCES **MICROSCOPE (AFM)**

#### Monika Gwoździk

INSTYTUTE OF MATERIALS ENGINEERING, FACULTY OF PROCESSES AND MATERIALS ENGINEERING AND APPLIED PHYSICS, CZESTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY 19 ARMII KRAJOWEJ AVE., 42-200 CZĘSTOCHOWA MAILTO: GWOZDZIK@WIP.PCZ.PL

#### Abstract

The paper presents results of surface condition examinations of X39Cr13 steel from the group of corrosion-resisting alloy steels used for surgical instruments. The tested steel was subject to heat (quenching + tempering) and surface (plasma nitriding) treatment. After the treatments applied the specimens surface was analysed by means of atomic forces microscope (AFM).

The examinations carried out allowed evaluating the effect of various treatments' variants on the surface condition through the roughness.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 74-76]

#### Wstęp

W ostatnich latach nastąpił znaczny rozwój inżynierii powierzchni. Coraz to nowe metody modyfikacji warstwy wierzchniej są stosowane na różnego typu materiały metaliczne, a w szczególności na materiały w aspekcie zastosowań w medycynie [1,2]. Powszechnie stosowanymi materiałami na instrumentarium medyczne są trzy grupy stali stopowych odpornych na korozję: martenzytyczne, austenityczne, ferrytyczne [3]. Modyfikacja warstwy wierzchniej tych stali a w szczególności stali martenzytycznych poprzez azotowanie może zwiększyć trwałość eksploatacyjną wytwarzanych narzędzi, które nie będą wymagały ostrzenia, szlifowania [4,5].

Celem pracy było porównanie parametru chropowatości R<sub>a</sub> (średnie arytmetyczne odchylenie profilu) próbek obrobionych cieplnie oraz powierzchniowo przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM).

#### Materiał i metodyka badań

Do badań wytypowano stal martenzytyczną należącą do grupy stali nierdzewnych z gatunku X39Cr13 wg normy

#### Introduction

The surface engineering has substantially developed in recent years. Newer and newer methods of top layer modi

fication are used for various types of metallic materials, in particular for materials to be used in medicine [1,2]. Three groups of corrosion-resisting alloy steels are materials commonly used for medical instruments: martensitic, austenitic, and ferritic [3]. The modification via nitriding of the top layer of such steels, especially martensitic steels, may increase the service life of instruments produced, which will not require sharpening and grinding [4,5].

The study aimed at comparison of roughness  $R_a$  (average arithmetical roughness) of heat and surface treated specimens using an atomic forces microscope (AFM).

#### Material and methodology of tests

Martensitic steel, classified as stainless steel, grade X39Cr13 acc. to standard PN-EN 10088-1:1998 [6], was selected for tests. The analysis of steel chemical composition was carried out using spark emission spectroscopy on a Spectro Spark Emission Spectrometer (TABLE 1).

wg		Skład chemiczny, % masowe / Chemical composition, wt. %									
acc. to	С	Si	Mn	Р	S	Cr					
analizy / analysis	0,42	0,39	0,55	0,020	0,004	13,73					
normy / standard	0,36÷0,42	max. 1,00	max. 1,00	max. 0,040	max. 0,015	12,5÷14,5					

TABELA 1 Skład chemiczny stali X39Cr13, % masowe TABLE 1. Chemical composition of X39Cr13 steel, wt.%

PN-EN 10088-1:1998 [6]. Analizę składu chemicznego stali wykonano metodą emisyjnej spektroskopii iskrowej na Emisyjnym Spektrometrze Iskrowym firmy Spectro (TABELA 1).

Materiał do badań dostarczono w postaci blachy o grubości 1mm po wyżarzaniu zmiękczającym. Obróbka cieplna została przeprowadzona w piecu próżniowym i polegała na hartowaniu z temperatury 1050°C sprężonym azotem. Czas austenityzacji wynosił 20 minut. Następnie część próbek odpuszczano przez dwie godziny w temperaturze 300°C, drugą w temperaturze 620°C. Próbki, które były odpuszczane w temperaturze 620°C poddano zabiegowi azotowania jarzeniowego. Proces azotowania przeprowadzono w urządzeniu do obróbek jarzeniowych z chłodzoną anodą typu JON-600. Próbki umieszczono na katodzie, gdzie ich powierzchnia była bombardowana jonami o energiach wynikających z wartości spadku katodowego. Azotowanie przeprowadzono w temperaturze 460°C przy ciśnieniu 150Pa i czasie 20 godzin. Próbki przed procesem azotowania były szlifowane



RYS.1. Obraz 2D (AFM) powierzchni stali X39Cr13: (a) po obróbce cieplnej, (b) po obróbce powierzchniowej.

FIG.1. 2D image (AFM) of X39Cr13 steel surface: (a) heat treatment, (b) surface treatment.

The material for tests was delivered in the form of soft annealed 1 mm thick sheet. The heat treatment was performed in a vacuum furnace and consisted of quenching from 1050°C by means of compressed nitrogen. The austenitising time was equal to 20 minutes. Then one part of specimens was tempered for two hours at 300°C and the other part at 620°C. Specimens tempered at 620°C were subject to plasma nitriding. The nitriding was carried out in JON-600 type installation for ion treatment with a cooled anode. Specimens were placed on the cathode, where their surface was bombarded with ions of energies resulting from the cathode drop value. The nitriding was carried out at 460°C at the pressure of 150Pa, during 20 hours. Before nitriding the specimens were grinded and polished.

Examinations of surface topography were performed on a MULTIMODE VEECO atomic forces microscope (AFM) with NANOSCOPE controller, using the Tapping Mode. The area of  $10\mu m \times 10\mu m$  was the scanned surface.



RYS.2. Obraz 3D (AFM) powierzchni stali X39Cr13: (lewy) po obróbce cieplnej, (prawy) po obróbce powierzchniowej. FIG.2. 3D image (AFM) of X39Cr13 steel surface:

(left) heat treatment, (right) surface treatment.

i polerowane.

76

Badania topografii powierzchni wykonano na mikroskopie sił atomowych (AFM) firmy VEECO model MULTIMODE z kontrolerem NANOSCOPE za pomocą metody Tapping Mode. Obszarem skanowanym była powierzchnia 10µm x 10µm.

#### Wyniki badań

Na RYS.1 przedstawiono obrazy 2D, natomiast na RYS.2 obrazy 3D badanych powierzchni przy pomocy AFM.

Badania topografii powierzchni wykazują, że dla azotowania jarzeniowego można zaobserwować charakterystyczną trójwymiarową strukturę wysepkową. W przypadku materiału obrabianego cieplnie nie zaobserwowano struktur wysepkowych. Uzyskane parametry chropowatości wykazują (RYS.3) wyższe wartości R<sub>a</sub> dla próbek obrobionych cieplnie

w porównaniu z próbkami po obróbce powierzchniowej. Uzyskane wyniki przeprowadzone na mikroskopie

sił atomowych potwierdziły wcześniejsze badania przeprowadzone na profilografometrze [7], w wyniku których zaobserwowano także strukturę wysepkową dla materiału azotowanego.

#### Podsumowanie

Przedstawione badania topografii powierzchni stali martenzytycznej poddanej różnym wariantom obróbki wskazują, że powierzchnia próbek po obróbce cieplnej jest bardziej rozwinięta w porównaniu z próbkami azotowanymi, o czym świadczy parametr  $R_a$ . Dla próbek obrobionych cieplnie Ra wynosiło ~96nm, natomiast dla obrobionych powierzchniowo  $R_a$ ~35nm.

#### Piśmiennictwo

[1]. Gierzyńska-Dolna M., Marciniak J., Adamus J., Lacki P.: A role of surface treatment in modification of the useable properties of the medical tools. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering. Volume 25, 2007, pp. 69-72.

[2]. Gwoździk M., Nitkiewicz Z.: Wear resistance of steel designed for surgical instruments after heat and surface treatments. Archives of Metallurgy and Materials. Volume 54, Issue 1, 2009, pp. 241-246.

[3]. Paszenda Z., Tyrlik-Held J.: Instrumentarium Chirurgiczne. Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2003, s. 9, 13-21, 23-31, 33,

69-199.



RYS.3. Średnie arytmetyczne odchylenie profilu dla poszczególnych obróbek. FIG.3. Average arithmetical roughness for individual treatments.

## Results of examinations

FIG.1 presents 2D images, while FIG.2 3D images of surfaces examined by means of AFM.

The surface topography examinations show that a characteristic threedimensional island structure may be observed for the plasma nitriding. No island structures were observed for heat-treatment material. The obtained

roughness results show (FIG.3) higher R<sub>a</sub> values for heattreatment specimens as compared with surface-treatment specimens.

The results obtained on the atomic forces microscope have confirmed previous studies carried out with the use of a profilographometer [7], which also resulted in the observation of island structure for the nitrided material.

#### Summary

....

....

The presented examinations of surface topography of martensitic steel subject to various treatments show that specimens' surface after heat treatment is more developed as compared with nitrided specimens, what is proved by parameter  $R_a$ . For heat treatment specimens  $R_a$  was ~96 nm, while for surface treatment specimens  $R_a$  ~35 nm.

#### References

[4]. Gwoździk M., Nitkiewicz Z.: Zużywanie się ostrzy wierteł chirurgicznych przeznaczonych dla chirurgii tkanki kostnej. Inżynieria Stomatologiczna - Biomateriały (w druku).

[5]. Gwoździk M.: Optimization of heat and surface treatment of X39Cr13 steel designated for surgical instruments. Monografie nr 2. Wydawnictwo Wydziału Inżynierii Procesowej, Materiałowej i Fizyki Stosowanej Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2009, pp. 73-93.

[6]. PN-EN 10088-1:1998: Stale odporne na korozję. Gatunki.

[7]. Gwoździk M., Nitkiewicz Zygmunt: Topography of X39Cr13 steel surface after heat and surface treatment. Optica Applicata (w druku).

). opografij powierzc

## OPTYMALIZACJA GEOMETRII NANORUREK TiO<sub>2</sub> PRZY UŻYCIU ROZMYTEGO SYSTEMU WNIOSKOWANIA

#### SYLWIA SOBIESZCZYK

Politechnika Gdańska, Wydział Mechaniczny, Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, Polska MAILTO: ssobiesz@pg.gda.pl

#### Streszczenie

Opracowano metodę wnioskowania rozmytego do określenia geometrii warstwy nanorurek TiO<sub>2</sub> na podłożu tytanowym, wytworzonej metodą elektrochemiczną. Zaproponowana metoda umożliwia optymalizację warstwy tlenkowej poprzez dobór odpowiednich parametrów procesu anodyzowania. Zaprojektowano i przeprowadzono symulację działania sterownika rozmytego (FLC) za pomocą oprogramowania Matlaba. [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 77-78]

#### Wprowadzenie

Tytan oraz stopy tytanu pokryte naorurkową warstwą tlenkową są bardzo interesującym materiałem do zastosowań biomedycznych, ze względu na doskonałe własności fizyczne i chemiczne, jak i biozgodność [1-3]. Ponadto, warstwy TiO<sub>2</sub> na powierzchni Ti posiadają również szereg funkcjonalnych własności dla zastosowań fotoelektronicznych, fotokatalitycznych i jako czujniki gazowe. Skuteczność nanowarstwy TiO<sub>2</sub> zależy od geometrii oraz obszaru powierzchni nanorurek. Nanorurkowa warstwa tlenku może być bezpośrednio wytworzona na powierzchni tytanu za pomocą metod takich, jak anodowe utlenianie w roztworach fluorków [4]. Do formowania nanorurkowej warstwy TiO<sub>2</sub> używa się głównie elektrolitów: roztwory HF/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, roztwory kwasu chromowego i HF, roztwory NH<sub>4</sub>F/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oraz roztwory H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HF [1,2,4]. Struktura nanorurkowej warstwy tlenku na powierzchni tytanu zależy od warunków wytwarzania, takich jak zastosowane napięcie, pH elektrolitu oraz czas anodowego utleniania. Geometria warstwy nanorurek TiO<sub>2</sub> może być sterowana za pomocą doboru optymalnych parametrów procesu anodowego utleniania tytanu.

#### Metodyka badań

Rozmyty system wnioskowania jest skuteczną metodą służącą do ustalenia związków pomiędzy wielkościami wejściowymi i wyjściowymi bez użycia modeli matematycznych [5]. Przestrzeń zbiorów wejściowych została ustalona na podstawie danych z literatury [3,4]. Jako zmienne wejściowe przyjęto napięcie prądu anodowego utleniania (0V÷25V) oraz czas anodowania (0÷12h). Rozmyte zbiory wyjściowe to: średnica nanorurki (0÷120nm) oraz długość nanorurki (0÷1200nm), otrzymane na podstawie badań eksperymentalnych przeprowadzonych przez Bauer'a et al. [3]. Przestrzeń wejściowa i wyjściowa zostały podzielone na zbiory rozmyte, którym nadano nazwy lingwistyczne: "bardzo mały (VS), mały (S), średni (M), duży (L), bardzo duży (VL)". Rozmyta baza reguł odpowiada podziałowi przestrzeni wejściowej oraz wyjściowej i składa się z 15 reguł rozmytych łączących odpowiednie parametry wejściowe oraz wyjściowe, wprowadzane następnie do środowiska oprogramowania Matlab, Fuzzy Toolbox [5]. Reguły w postaci zdań warun-

## OPTIMALIZATION OF TiO<sub>2</sub> NANOTUBE GEOMETRY USING FUZZY REASONING APPROACH

#### SYLWIA SOBIESZCZYK

GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, 11/12 NARUTOWICZA STR., 80-952 GDANSK, POLAND MAILTO: SSOBIESZ@PG.GDA.PL

#### Abstract

The geometry of TiO<sub>2</sub> nanotube layer on titanium, obtained by electrochemical anodization, has been determined by using fuzzy reasoning approach. A proposed method showed the possibility of nanotube array architecture optimization by choosing an appropriate anodization conditions. A fuzzy logic controller (FLC) was utilized using Matlab Software. [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009),77-78]

#### Introduction

Titanium and titanium alloys covered with nanotubular oxide layers are very interesting materials for high performance implants, because they have excellent physical and chemical properties as well as biocompatibility [1-3]. Furthermore, TiO<sub>2</sub> layers possesses a variety of functional properties for gas sensing, photoelectronics, and photocatalysis applications. The efficiency of TiO<sub>2</sub> nanotubular layer depends on the geometry and surface area of nanotubes. The nanotubular oxide layer can be grown directly by costeffective method such as electrochemical anodization of titanium in fluoride electrolytes [4]. Various electrolytes have been used to form TiO<sub>2</sub> nanotube arrays, such as HF/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, chromic acid/HF,  $NH_4F/(NH_4)_2SO_4$  and  $H_3PO_4/HF$  mixtures [1,2,4]. The structure of nanotubular oxide layer on titanium substrate depends on fabrication conditions, like applied potential, pH value of electrolyte, and anodization time. The geometry of TiO<sub>2</sub> nanotube layer can be controlled by choosing optimal parameters of anodization process.

#### Material and methods

. . . . . . . . . . . . .

Fuzzy reasoning approach is an efficient method to establish the relationships between an input and an output without the need of complex mathematical models [5]. Domains of input sets have been drawn from previous work [3,4]. As input variables the applied potential (0V÷25V) and anodization time (0 ÷ 12 h) have been chosen. Fuzzy output sets are: the nanotube diameter (0÷120nm), and tube length (0÷1200 nm), based on experimental results presented by Bauer et al.[3]. Input and output space have been divided into fuzzy triangular and trapezoidal sets, with linguistic names given: "very small (VS), small (S), medium (M), large (L), very large (VL)". The rule base corresponds to division of input and output space. It consists of 15 rules linking input values with output for certain parameters, which were introduced into Matlab environment, Fuzzy Toolbox [5]. Rules in the form "if - then" can be presented as decision table (TAB.1). For resultant output values of tube diameter and tube length, the center of gravity defuzzyfication method was used [5].

kowych "if-then" zostały przedstawione jako tabela decyzyjna (TAB.1). W celu określenia wynikowych wartości system rozmytego wykorzystano metodę wyostrzania środka ciężkości [5].

### Wyniki badań i dyskusja

Na RYS.1 pokazano wyniki wnioskowania rozmytego dla wybranych wartości wielkości wejściowych. Po przeprowadzeniu procesu wyostrzania wybrano jedną wartość, która odpowiada wartościom wielkości wejściowych. Jako przykład, dla wybranych wartości zmiennych wejściowych zastosowanego napięcia 10V oraz czasu anodowania 2h, otrzymano w wyniku przeprowadzonych symulacji wartości zmiennych wyjściowych średnicę nanorurki TiO<sub>2</sub> 53,5nm oraz długość nanorurki 600nm. Zwiększenie napięcia prądu anodowania do 20V umożliwiło uzyskanie nanorurki o średnicy 93nm oraz długości 970nm. Wyniki przeprowadzonych symulacji są zgodne z wynikami otrzymanymi za pomocą badań eksperymentalnych przez Bauera i in. [3].

	Wejście Fuzz	rozmy y input	te		Wyjście rozmyte Fuzzy output		
	VisVS		t is S		¢is∀S		th is VS
	V is VS		tisM		¢is∀S		th is VS
	VisVS		tisL	1	¢isS		th is S
	V is S	t is S		¢isS		th is VS	
	VisS		tisM		¢isS		th is S
	VisS		tisL		¢isS		th is S
	V is M		t is S		øis M		th is M
	V is M		tisM		øis M		th is M
	V is M		tisL	<b>t</b> he <b>n n</b>	øis M		thisL
It	VisL	and	t is S	then	øis M	and	thisL
	VisL		tisM		¢is L		thisL
	VisL		tisL		¢is L		thisL
	V is VL		t is S		øis M		thisL
	V is VL		tisM		¢is L		thisL
	V is VL		tisL		¢is L		thisL

TABELA 1. Tabela decyzyjna bazy reguł dla elektrochemicznego anodowania w roztworze 1M  $H_3PO_4$  z 0,3%mas. HF [3], gdzie: V–zastosowany potencjał, t–czas anodowania,  $\phi$ -średnica nanorurki, oraz thdługość nanorurki.

TABLE 1. Decision table of fuzzy rule base for electrochemical anodization in 1M  $H_3PO_4$  with 0,3wt.% HF electrolyte [3], where: V-applied potential, t-anodization time,  $\varphi$ -tube diameter, and th-tube length.

# Results and discussion

As a result of approximate reasoning for chosen input variables values, the resultant output sets have been received (FIG.1). After defuzzyfication process, only one value was chosen, in response to given input values. As an example, for the chosen input variables: applied voltage of 10V and the anodization time 2h, the diameter of TiO<sub>2</sub> nanotube of 53.5nm and length of 600nm was determined. The potential increasing to 20V results then in change of nanotube diameter to 93nm and length to 970nm. The simulation results are in line with the experimental data achieved by Bauer et al. [3].



RYS.1. Wyniki obliczeń metodą wnioskowania przybliżonego dla procesu tworzenia warstwy  $TiO_2$ : a) wielkości wejściowe - przykładany potencjał 10V i czas anodowania 2godz., wielkości wyjściowe - średnica nanorurki 53,3nm i długość nanorurki 600nm; b) wielkości wejściowe przykładany potencjał 20V i czas anodowania 2 godz., wielkości wyjściowe – średnica nanorurki 95 nm i długość nanorurki 970nm.

FIG.1. Results of fuzzy reasoning system for  $TiO_2$  layer formation: a) the inputs - applied potential 10V and anodization time 2h, the outputs - diameter 53.3 nm and tube length 600 nm, b) the inputs - applied potential 20V and anodization time 2h, the outputs - tube diameter 95 nm and the t length 970nm.

#### Wnioski

Metoda wnioskowania rozmytego umożliwia oszacowanie geometrii nanorurkowej warstwy tlenkowej na powierzchni tytanowej oraz jej optymalizację poprzez regulację warunków anodowania, takich jak zastosowane napięcie i czas anodowania podczas procesu anodowego utleniania tytanu.

## Piśmiennictwo

[1] Ghicov A., Tsuchiya H., Macak J.M., Schmuki P.: Titanium oxide nanotubes prepared in phosphate electrolytes. Electrochemistry Comm. 7 (2005) 505-509.

[2] Raja K.S., Misra M., Paramguru K.: Deposition of calcium phosphate coating on nanotubular anodized titanium. Materials Letters 59 (2005) 2137-2141.

[3] Bauer S., Kleber S., Schmuki P.: TiO2 nanotubes: Tailoring the geometry in H3PO4/HF electrolytes. Electrochemistry Communications 8 (2006) 1321-1325

#### Conclusions

Using fuzzy reasoning approach, the geometry of  $TiO_2$  nanotube layer on titanium surface can be predicted and optimized by regulation of fabrication conditions, like applied voltage or anodization time during electrochemical anodization process. Proposed method provides a good predictor within the range of area responses established, based on selective and limited representative experimental data.

#### References

[4] Kaneco S., Chen Y., Westerhoff P., Crittenden J.C.: Fabrication of uniform size titanium oxide nanotubes: Impact of current density and solution conditions. Scr. Mat. 56 (2007) 373-376.

[5] Łachwa A.: Rozmyty świat zbiorów, liczb, faktów, reguł i decyzji. Problemy współczesnej nauki, teoria i zastosowania. Akad. Oficyna Wyd. EXIT, W-wa 2001.

## NOWA METODA STABILIZACJI ZŁAMAŃ ŚRODKOWEGO PIĘTRA TWARZY PRZY UŻYCIU KLAMER ZE STOPÓW NITI O WŁAŚCIWOŚCIACH SUPERSPRĘŻYSTYCH – BADANIA WSTĘPNE

M.Jędrusik-Pawłowska<sup>1°</sup>, Z.Lekston<sup>2</sup>, J.Drugacz<sup>1</sup>, M.Kromka-Szydek<sup>3</sup>, T.Cieślik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach , ul. Francuska 20/24, 40-027 Katowice, Polska <sup>2</sup>Instytut Nauki o Materiałach Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

<sup>3</sup>Katedra Mechaniki Doświadczalnej i Biomechaniki Politechniki Krakowskiej

\*MAILTO: CHIRMAG@WP.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 79-82]

#### Wstęp

Dane epidemiologiczne z różnych ośrodków zajmujących się leczeniem urazów w obrębie głowy i części twarzowej czaszki z ostatnich lat wskazują na wzrost liczby urazów dotyczących środkowego piętra twarzy [1,2,3,4,6,10,13]. Dane literaturowe podkreślają znamienny wzrost liczby złamań jarzmowo-szczękowo-oczodołowych, które w niektórych ośrodkach stanowią wyższy odsetek w porównaniu do liczby złamań żuchwy [ 5,7,12,16].

Urazy szkieletu czaszkowo-twarzowego pociągają za sobą ciężkie i różnorodne powikłania morfologiczno-czynnościowe oraz estetyczne, zaburzające lub uszkadzające



RYS.1. Radiologiczny obraz złamania jarzmowooczodołowego po stronie lewej po operacyjnej repozycji odłamów i zespoleniu minipłytkami tytanowymi w standardowym położeniu odtwarzającym anatomiczny kształt okolicy jarzmowej.

FIG.1. Radiological image of the left zygomaticorbital fracture after an operative repositioning of a fracture and fixation with titanium miniplates in a standard positioning reconstructing anatomical shape of the zygomatic region.

## NEW METHOD OF STABILISATION OF THE MID-FACE REGION FRACTURES USING NITI STAPLES WITH SUPERELASTIC PROPERTIES – PRELIMINARY RESULTS

M.Jędrusik-Pawłowska<sup>1\*</sup>, Z.Lekston<sup>2</sup>, J.Drugacz<sup>1</sup>, M.Kromka-Szydek<sup>3</sup>, T.Cieślik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT AND CLINIC OF CRANIOMAXILLOFACIAL SURGERY OF THE SILESIAN MEDICAL ACADEMY IN KATOWICE, 20/24 FRANCUSKA STR. 40-027 KATOWICE, POLAND <sup>2</sup>INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCES OF THE SILESIAN UNIVERSITY IN KATOWICE <sup>3</sup>DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL MECHANICS AND BIOMECHANICS OF THE CRACOW TECHNICAL UNIVERSITY \*MAILTO: CHIRMAG@WP.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 79-82]

#### Introduction

The epidemiological data collected from different centres engaged in the treatment of craniomaxillofacial injuries show an increase in the numbers of cases involving mid-face region fractures, which have been reported during past several years [1,2,3,4,6,10,13]. Literature data indicate a significant increase in the numbers of zygomatic-maxillaryorbital fractures, which in some centres consist a higher percentage of cases in comparison to the numbers of maxillary fractures [5,7,12,16].

Cranio-facial injuries lead to serious and different



RYS.2. Radiologiczny obraz złamania szczęki typu Le Fort II po operacyjnej repozycji odłamów i zespoleniu ich minipłytkami tytanowymi w okolicy grzebieni jarzmowo-zębodołowych obustronnie oraz słupa kłowego po stronie prawej.

FIG.2. Radiological image of the Le Fort II maxillary fracture after an operative repositioning of the fracture and bilateral fixation with titanium miniplates in the region of zygomatic-alveolar crest and in the region of the right canine column.

fizjologiczną czynność układu nerwowego, wzrokowego, oddechowego, pokarmowego i stomatognatycznego [2]. Nieleczone lub niewłaściwie leczone złamania szkieletu czaszkowo-twarzowego mogą prowadzić do trwałego kalectwa, mogącego wyłączyć chorego z czynnego życia zawodowego i społecznego.

W leczeniu złamań kostnego szkieletu środkowego piętra twarzy obecnie obowiązuje zasada stabilnej osteosyntezy na drodze chirurgicznego nastawienia odłamów i ich zespolenia. Wybór sposobu postępowania chirurgicznego zależy od typu anatomopatologicznego złamań i towarzyszących im powikłań. Zgodnie z regułą 4W należy leczyć wcześnie, wszystko, w całości i w tym samym czasie. Takie postępowanie znacznie skraca czas i pozwala uniknąć uciążliwości leczenia ortopedycznego [1,2,3]. Do stabilnej osteosyntezy używa się obecnie mini- bądź mikropłytek tytanowych mocowanych do kości za pomocą śrub wykonanych z tego samego materiału i oferowanych przez wiele firm produkujących materiały i narzędzia dla potrzeb chirurgii czaszkowo-szczękowo-twarzowej (RYS.1,2). Komercjalizacja opieki zdrowotnej oraz wzrost liczby skomplikowanych urazów czaszkowo-twarzowych sprawiają, że rosną również koszty leczenia tych chorych. Uzasadnione jest, wiec poszukiwanie prostszej i tańszej metody pozwalającej na zespolenie odłamów złamań szkieletu środkowego piętra twarzy.

Stopy tytanowo-niklowe (NiTi) wykazujące pamięć kształtu i supersprężystość jako nowoczesny, biokompatybilny materiał metaliczny są wykorzystywane w produkcji wyrobów medycznych na świecie od ponad 20 lat. Efekty pamięci kształtu w tych stopach występują wskutek zmian struktury podczas odwracalnej, termosprężystej przemiany martenzytycznej, która może być aktywowana termicznie lub naprężeniowo. Ich potwierdzone w literaturze dobre własności mechaniczne, wysoka odporność korozyjna i tolerancja biologiczna sprawiają, że odpowiednio zaprojektowane, zminiaturyzowane klamry wykonane z tego stopu mogą stać się alternatywnym do płytek tytanowych, prostym systemem do stabilnej osteosyntezy w chirurgii czaszkowoszczękowo-twarzowej [8,9,11,14,15].

#### Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie wstępnych badań laboratoryjnych służących opracowaniu techniki zespalania i unieruchamiania złamań jarzmowo-szczękowo-oczodołowych oraz złamań szczęki z zastosowaniem klamer supersprężystych ze stopu NiTi.

#### Materiał i metody

Do badań użyto prototypów klamer z drutu NiTi o średnicach 1,1mm, 1,2mm i 1,3mm wykazujących właściwości supersprężyste wykonanych we współpracy z Instytutem Nauki o Materiałach Uniwersytetu Śląskiego. Długość poziomego ramienia klamer wynosiła 7-12mm, długość pionowych nóżek: 4-6mm, a zaprogramowany kąt podgięcia nóżek wahał się między 45-60° (RYS.3).

Sprężyste odkształcenie podczas indukowania martenzytu zewnętrznym naprężeniem uzyskano poprzez odgięcie pionowych nóżek klamry przy użyciu specjalnie do tego celu zaprojektowanych kleszczy. Po zwiększeniu kąta podgięcia krótszych ramion klamry NiTi wprowadza się ją do nawierconych w obu odłamach otworów tak, aby pionowe nóżki zagłębiły się w kości.

Badania doświadczalne przeprowadzono na fabrycznym modelu czaszki ludzkiej w skali 1:1 z tworzywa sztucznego oraz na odlanych z żywicy epoksydowej modelach o zbliżonym do kości ludzkiej module sprężystości. Złamanie morphological, functional and aesthetic complications, disturbing or impairing physiological activity of the nervous, visual, digestive and stomatognathic system [2]. Untreated or improperly treated cranio-facial injuries may lead to a permanent disability, excluding a patient from one's active vocational and social life.

The rule of the stable osteosynthesis by surgical reduction and fixation of a fracture is presently effective in the treatment of mid-face region injuries. The choice of a surgical treatment depends on the anatomopathological type of the fracture and concomitant complications. According to the 4E rule the treatment should be carried out early, entirely and it should involve everything and at the same time. Such treatment allows to shorten time and avoid of all difficulties related to orthopaedic treatment [1, 2, 3]. The titanium mini- or microplates are presently used for stable osteosynthesis, which are being fixed to the bones with the use of pins made from the same material and offered by many companies producing materials and tools for craniomaxillofacial surgery (FIGs.1,2). Commercialization of medical care and an increase in the numbers of complex craniomaxillofacial injuries cause higher costs of treatment in these patients. Therefore, it is necessary to find a simpler and cheaper method for surgical fixation of mid-face region fractures.

Titanium-nickel alloys (TiNi) characterized with the shape memory and superelasticity have been used world-wide as a modern, biocompatibile metallic material for production of medical devices for more than 20 years. The effects of the shape memory in these alloys result from structural changes during the reversible, thermo-elastic martensitic mechanism of deformation, which can be activated thermically or by a stress. Well-documented good mechanical properties, high resistance to corrosion and biological tolerance cause that properly designed, miniaturised staples produced from this alloy can become an alternative to titanium plates, simple system for the stable osteosynthesis in craniomaxillofacial surgery [8,9,11,14,15].

#### Aim of work

The aim of this work was to present the preliminary results of laboratory research upon a fixation and stabilisation technique for zygomatic-maxillary-orbital fractures and maxillary fractures using superelastic staples from NiTi alloy.

#### Material and methods

In this study, the proto-type staples from NiTi wire of 1,1mm, 1,2mm and 1,3mm in diameter, showing superelastic properties were prepared in cooperation with the Institute of Material Sciences of the Silesian University. The length of a horizontal arm of staples was 7-12mm, the length of the vertical arms was 4-6mm, and the programmed angle of arms' bending was between 45-60° (FIG.3).

Elastic shaping during martensitic deformation was obtained by bending of vertical arms of a staple using specially designed pliers. After having increased an angle of bending of its shorter arms, a NiTi staple is introduced into the holes drilled in both bone parts so that the vertical arms are placed in the bone.

The study was performed on a fabric model of a human skull in a 1:1 scale prepared from plastic material and from epoxid resin of a elasticity module comparable to human bones. A zygomatic-orbital fracture and a maxillary fracture were performed by an appropriate cut in a model in several variants allowing for a possible course in a particular type of fracture.



RYS.3. Klamra NiTi o właściwościach supersprężystych wraz z szablonem jej kształtu po odgięciu krótszych ramion do kąta 90° (poniżej): średnica drutu: 1,2mm, długość poziomego ramienia: 12,0 mm, długość nóżek: 6,0mm. Po stronie lewej gotowe klamry w zestawach z szablonami.

FIG.3. NiTi staple with superelastic properties together with its shape template after its shorter arms were shaped at 90s angle (below): wire diameter: 1.2 mm, length of a horizontal arm: 12.0mm, length of vertical arms: 6.0mm.

Left: ready-to-use staples in sets together with templates.



RYS.4. Klamra NiTi o właściwościach supersprężystych w trakcie zakładania na model złamania w okolicy szwu jarzmowo-czołowego. FIG.4. NiTi staple with superelastic properties during fixation on a model fracture in the region of zygomatic-orbital suture.

The received mechanical properties of a superelastic NiTi staple allowed introducing it, after reshaping, into a model fracture (FIG.4). When a reshaping force stops to work, a NiTi staple regains its previously programmed shape, a repositioned bone parts come into contact and become a stable, compressive fixation of a fracture (FIG.5a and 5b).

jarzmowo-oczodołowe oraz złamanie szczęki zamodelowano poprzez odpowiednie przecięcie modelu twarzoczaszki w kilku różnych wariantach uwzględniających możliwy przebieg szczeliny w tym typie złamania.

Uzyskane właściwości mechaniczne supersprężystej klamry NiTi pozwoliły wprowadzić ją po odkształceniu na model złamania (RYS.4). Kiedy siła odkształcająca przestaje działać klamra NiTi odzyskuje wcześniej zaprogramowany kształt, zreponowane odłamy zbliżają się do siebie i uzyskuje się stabilne, kompresyjne zespolenie złamania (RYS. 5a i 5b).



RYS.5. Zespolenie modelowego złamania szkieletu środkowego piętra twarzy klamrami NiTi o właściwościach supersprężystych: a).złamanie jarzmowo-oczodołowego po stronie lewej; b). złamanie szczęki typu Le Fort I.

FIG.5. Fixation of a model mid-face region fracture using NiTi staples with superelastic properties: a). left zygomatic-orbital fracture; b). maxillary fracture of the Le Fort I type.

#### Wyniki

Uzyskano bardzo dobrą stabilizację odłamów modelowego złamania, odtworzenie anatomicznego kształtu kości oraz prawidłowej wysokości środkowego piętra twarzoczaszki.

Odpowiednie właściwości fizyczne, odporność chemiczna i sprawdzona biokompatybilność stopów NiTi w ludzkim organizmie sprawiają, że skonstruowane z tego materiału prototypy spinek do zespolenia odłamów złamań środkowego piętra twarzy powinny dobrze spełniać to zadanie in vivo.

#### Results

A very good stabilisation of a model fracture, reconstruction of a bone anatomical shape and a correct height of the mid-face region of the facial skeleton was obtained.

Proper physical properties, chemical resistance and confirmed biocompatibility of NiTi alloys in a human body cause that proto-types of staples for fixation of mid-face region fractures, produced from this material should perform its function well in vivo.

Ponad połowa chorych hospitalizowanych w ciągu roku w Klinice Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej ŚUM to pacjenci z urazami szkieletu czaszkowo-twarzowego wymagający leczenia operacyjnego i stabilnej osteosyntezy złamań.

Stworzenie nowej, alternatywnej metody zespolenia i stabilizacji złamań szkieletu środkowego piętra twarzy z użyciem supersprężystych klamer NiTi może zredukować koszty leczenia operacyjnego, skrócić całkowity czas leczenia chorych i jednocześnie przyczynić się do oszczędności z tytułu możliwości wczesnej rehabilitacji i powrotu poszkodowanego do pracy w swoim zawodzie.

Dalsze badania kliniczne w tym kierunku będą kontynuowane.

#### Piśmiennictwo

[1]. Al-Khateeb T., Abdullah F.M.: Craniomaxillofacial injuries in the United Arab Emirates: a retrospective study. J. Oral Maxillofac. Surg. 2007, 65(6), 1094-1101.

[2]. Alvi A., Doherty T., Lewen G.: Facial fractures and concomitant injuries in trauma patients. Laryngoscope. 2003, 113(1), 102-106.
[3]. Antoun J.S., Lee K.H.: Sports-related maxillofacial fractures over an 11-year period. J. Oral Maxillofac. Surg. 2008, 66(3), 504-508.
[4]. Bakardjiev A., Pechalova P.: Maxillofacial fractures in Southern Bulgaria - a retrospective study of 1706 cases. J Craniomaxillofac. Surg. 2007, 35(3), 147-150.

[5]. Cavalcanti A.L., Melo T.R.: Facial and oral injuries in Brazilian children aged 5-17 years: 5-year review. Eur. Arch. Paediatr. Dent. 2008, 9(2), 102-104.

[6]. Ceallaigh P.O., Ekanaykaee K., Beirne C.J., Patton D.W.: Diagnosis and management of common maxillofacial injuries in the emergency department. Part 1: Advanced trauma life support. Emerg. Med. J. 2006, 23(10),796-797.

[7]. Cerulli G., Carboni A., Mercurio A., Perugini M., Becelli R.: Soccer-related craniomaxillofacial injuries. J Craniofac. Surg. 2002, 13(5), 627-630.

[8]. Duerig T.W., Pelton A.R., Stockel D.: Superelastic nitinol for medical devices. Medical Plastics Biomaterials Magazine 1997,

4, 30-43.

#### Summary

More then a half of the patients hospitalized in the Clinic of Craniomaxillofacial Surgery of the Silesian Medical Academy are those with craniomaxillofacial injuries requiring surgery and stable ostheosynthesis of fractures.

Development of a new, alternative method for fixation and stabilization of fractures of the mid-face region with the use of the superelastic NiTi staples may lead to reduction of operative treatment, shorten the total patient treatment time and help to save costs due to the possibility of early rehabilitation and return to the patient's work.

Further clinical research in this direction will be continued.

#### References

[9]. Lekston Z., Drugacz J., Morawiec H.: Application of superelastic NiTi wires for mandibular distraction. Materials Science and Engineering 2004, A 378, 537-541.

[10]. Manowska B., Arkuszewski P., Tyndorf M.: Analiza obrażeń pourazowych pacjentów zaopatrywanych w ramach ostrego dyżuru ambulatoryjnie. Czas. Stomatol. 2009, 62, 134-140.

[11]. Pelton A. R., Stockel D., Duerig T. W.: Medical uses of Nitinol. Materials Science Forum 2000, 327-328, 63-70

[12]. Saif F., Zapała J., Zwoliński J., Szuta M.: Obrażenia twarzy w sportach zimowych w materiale Kliniki Chirurgii Szczękowo-Twarzowej CM UJ w Krakowie. Chirurgia Czaszkowo-Szczekowo-Twarzowa i Ortopedia Szczekowa 2007, 3-4, 108-111.

[13]. Salonen E.M., Koivikko M.P., Koskinen S.K.: Acute facial trauma in falling accidents: MDCT analysis of 500 patients. Emerg. Radiol. 2008, 15(4), 241-247.

[14]. Shabalovskaya S.A.: On the nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. Bio-Medical Materials and Engineering 1996, 6, 267-289 [15]. Shabalovskaya S.A.: Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material. Bio-Medical Materials and Engineering 2002, 12, 69-109

[16]. Subhashraj K., Nandakumar N., Ravindran C.: Review of maxillofacial injuries in Chennai, India: a study of 2748 cases. Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 2007, 45(8), 637-639.

•••••

## NOWE SEMIKRYSTALICZNE BIORESORBOWALNE MATERIAŁY Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU

Anna Smola\*, Piotr Dobrzyński, Małgorzata Pastusiak, Michał Sobota, Janusz Kasperczyk

Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN ul. M.Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze, Polska \*MAILTO: annasmola@op.pl

#### Streszczenie

W procesie terpolimeryzacji cyklicznych monomerów glikolidu, L-laktydu i trimetylenowęglanu (TMC), w obecności niskotoksycznego acetylacetonianu cyrkonu (IV) lub Zn(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) jako inicjatora, otrzymano z dobrą wydajnością bioresorbowalne trójpolimery wykazujące własność pamięci kształtu. W zależności od zastosowanej metody syntezy (jednostopniowa terpolimeryzacja w stopie, dwustopniowa terpolimeryzacja w stopie, terpolimeryzacja glikolidu,

## NEW SEMI-CRYSTALLINE BIORESORBABLE MATERIALS WITH SHAPE-MEMORY PROPERTIES

Anna Smola\*, Piotr Dobrzyński, Małgorzata Pastusiak, Michał Sobota, Janusz Kasperczyk

CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS PAS 34 M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND \*MAILTO: ANNASMOLA@OP.PL

#### Abstract

On the course of the therpolymerization process of glycolide, L-lactide and trimethylene carbonate (TMC) cyclic monomers, using low-toxic zirconium (IV) acetylacetonate or  $Zn(C_2H_5)(OC_2H_5)$  as initiator, bioresorbable terpolymers characterized with shape memory properties were efficiently obtained. Depending on the preferred method of synthesis (single-stage terpolymerization in bulk, two-stage terpolymerization laktydu i wcześniej syntezowanego oligomeru TMC) czy w zależności od rodzaju zastosowanego inicjatora uzyskano terpolimery o zbliżonym składzie lecz o różnorodnej budowie łańcucha polimerowego, a co jest z tym związane o rożnej morfologii - od materiałów całkowicie amorficznych po materiały o dużym stopniu krystaliczności. Przedstawiono podstawowe własności otrzymanych polimerów, w tym zachowanie pamięci kształtu.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 82-87]

#### Wstęp

Zjawisko pamięci kształtu polega, w dużym uproszczeniu, na możliwości powrotu materiału z kształtu przejściowego (tymczasowego) uzyskanego w wyniku mechanicznej deformacji, do wcześniejszego zaprogramowanego pierwotnego kształtu, za pomocą różnych bodźców fizycznych. Najczęściej stosowanym bodźcem jest podniesienie temperatury materiału powyżej pewnej temperatury granicznej zwanej temperaturą przejścia. Typowymi materiałami polimerowymi znajdującym zastosowanie biomedyczne z pamięcią kształtu (SMPs) są segmentowe poliuretany. Są to bardzo często materiały o dostatecznej biokompatybilności lecz z reguły nie ulegające procesowi bioresorbcji lub degradujące w ten sposób bardzo wolno. Wśród materiałów z pamięcią kształtu, szczególnie cenne do zastosowań biomedycznych wydają się jednak termoplastyczne polimery bioresorbowalne. Stosując takie materiały, formując z nich na drodze przeróbki termoplastycznej bioresorbowalne implanty - narzędzia chirurgiczne (samorozprężające stenty, samozaciskowe zaciski, klamry i pętelki) będzie można wprowadzić czy usprawnić wiele technik chirurgicznych w tym szczególnie technik chirurgii małoinwazyjnej.

Do grupy polimerów biodegradowalnych należą powszechnie uważane za biokompatybilne i coraz częściej stosowane w medycynie alifatyczne poliestry, otrzymywane na drodze polimeryzacji z otwarciem pierścienia laktydów, laktonów oraz cyklicznych węglanów. Z materiałów tych obecnie produkowane są w coraz większej skali; nici chirurgiczne, tymczasowe resorbowalne implanty chirurgiczne oraz systemy nośników leków implantowane bezpośrednio do ciała pacjenta. Poprzez odpowiedni dobór składu i mikrostruktury tego typu kopolimerów, którą otrzymuje się w wyniku odpowiedniego prowadzenia syntezy, wiele z tego typu materiałów polimerowych wykazuje własność pamięci kształtu [1-4]. Wcześniej nasz zespół opracował metodę otrzymywania bioresorbowalnego terpolimeru glikolidu/Llaktydu/TMC, który wykazywał bardzo dobre własności zapamiętywania kształtu [4,5]. Szczególnie cenne z punktu aplikacji biomedycznej tego materiału było to, iż przejście z kształtu tymczasowego do zaprogramowanego kształtu permanentnego zachodziło w wyniku podniesienia temperatury do 37-40°C, a więc wartości zbliżonej do temperatury ciała ludzkiego. Otrzymany terpolimer był całkowicie amorficzny, co w wielu zastosowaniach (uwalnianie leków, inżynieria tkankowa) jest cechą bardzo korzystną. Niestety implanty formowane z tego terpolimeru i pracujace pod stałym obciażeniem w temperaturze ciała ludzkiego w wielu wypadkach po pewnym czasie ulegać mogą samoistnej deformacji, w wyniku występującego zjawiska płynięcia tworzywa. Aby wyeliminować lub ograniczyć wspomniane zjawisko, podjeliśmy próby otrzymania terpolimeru, o zbliżonym do wcześniej zoptymalizowanego składzje lecz zawierającego faze krystaliczna, o relatywnie wysokiej temperaturze topnienia. Metody jakie zastosowaliśmy, aby osiągnąć ten cel jak i krótka charakterystyka otrzymanych terpolimerów jest treścią prezentowanego komunikatu.

in bulk, terpolymerization of glycolide, lactide and previously synthesized TMC oligomer) or the type of the used initiator, we achieved to obtain terpolymers with similar composition but with varied polymer chain microstructure and consequently different morphology – from wholly amorphous to characterized with high degree of crystallinity. Elementary properties of the obtained polymers, including the shape-memory ability, are described herewith.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009),82-87]

#### Introduction

The phenomenon of shape memory essentially consists of the possibility to recall the material's predefined shape from temporary intermediate stage after mechanical deformation, by means of numerous physical stimuli. The most frequently applied stimulus is increasing the material's borderline temperature, called transition temperature. Typical shape-memory polymer materials (SMPs) found useful in biomedical applications are segmented polyuretanes. The materials are usually sufficiently biocompatible but in most cases not bioresrobable or degrading at a very slow rate. Among the shape-memory materials, bioresorbable thermoplastic polymers are seemingly the most valuable for application in biomedicine. Using these materials for forming bioresorbable implants by means of thermoplastic processing - surgical tools (self-expanding stents, self-clenching clamps, loops and clasps) it will be possible to introduce or upgrade numerous surgical techniques, with emphasis on low-invasive surgery.

Aliphatic polyesters are a subgroup of biodegradable polymers which are widely considered biocompatible and recently often applied in medicine. They are obtained by means of polymerization with ring-opening of lactides, lactones and cyclic carbonates. They are currently a common base material for surgical threads, temporary resorbable surgical implants and systems of drug carriers implanted directly into the patient's body. Through appropriate choice of composition and microstructure of this type of copolymers, obtained with properly conducted synthesis, a number of these polymer materials might be characterized with shape-memory properties [1-4]. Earlier our research team had invented a method of obtaining bioresorbable glycolide/L-lactide/TMC terpolymers, demonstrating very good shape-memory properties [4,5]. What was particularly significant for potential biomedical application of the material was that the transition from the temporary stage to the pre-programmed shape occurred as a result of increasing temperature up to 37-40°C, which are typical values of normal human body temperature. The obtained terpolymer was wholly amorphous which is an advantage in numerous applications (drug releasing, tissue engineering). Unfortunately, the implants formed out of this terpolymer and constantly working with load at human body temperature often might often be subjected to spontaneous deformation due to material flow. In order to eliminate or reduce the effects of the aforementioned phenomenon, we attempted to obtain terpolymers with composition similar to the previously optimized selection, but containing crystalline phase with relatively high melting temperature. The methods we have used to achieve this, along with a short characteristics of the obtained terpolymers is the subject of the present article.

#### Materiały i metody syntezy

Monomery użyte w terpolimeryzacji glikolid, L-laktyd (Purac Biomaterials) oraz węglan trimetylenowy TCM (Boehringer Ingelheim) były wstępnie oczyszczane poprzez rekrystalizację z roztworu octanu etylu, a następnie suszone w próżni w temperaturze pokojowej. Inicjatory; acetylacetonian cyrkonu (IV) - Zr(Acac)<sub>4</sub> (Aldrich Corp.) i etyleno etoksy cynk (II) - Zn(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), syntezowany w naszym laboratorium, zastosowano bez dodatkowych metod oczyszczania.

Terpolimeryzację prowadzono na drodze polimeryzacji poprzez otwarcie pierścienia glikolidu, L-laktydu i TMC, w stopie w temp. 115-120°C, stosując jako inicjator polimeryzacji Zr(Acac)<sub>4</sub> lub Zn(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) przy zachowaniu stosunku molowego inicjator/monomery (I/M), jak 1:1200. Próbkę nr 1 i 3 otrzymywano metodą jednostopniową poprzez jednoczesne stopienie pod poduszką argonu wszystkich monomerów, dodanie inicjatora i mieszanie zawartości reaktora do przereagowania całej mieszaniny reakcyjnej. Próbkę nr 2 otrzymano metodą dwustopniową. Początkowo w reaktorku, w temp. 120°C, pod poduszka argonu stopiono L-laktyd, dodano inicjator - Zr(Acac)<sub>4</sub> (stosunek I/M jak 1:1200). Reakcje polimeryzacji laktydu prowadzono do przereagowania 60% monomeru, po czym dodano do mieszaniny reakcyjnej pozostałe monomery i w tych warunkach prowadzono dalej reakcję do całkowitego przereagowania wszystkich monomerów. Reakcje syntezy próbki 4 prowadzono jednostopniowo, analogicznie jak próbek 1 i 3. Jedynie w reakcji tej zastosowano oprócz L-laktydu i glikolidu w zastępstwie cyklicznego TMC jego oligomer, syntezowany wcześniej w naszym laboratorium (średnia liczbowo masa cząsteczkowa ok. 2000 Da, o łańcuchu zakończonym grupami hydroksylowymi).

Wszystkie otrzymane terpolimery były oczyszczane poprzez rozpuszczanie w chloroformie i wytrącanie w metanolu. Po wytrąceniu, terpolimery były suszone w 600C pod zmniejszonym ciśnieniem. Kształtki do badań pamięci kształtu otrzymano poprzez wytłaczanie w temp. 150°C, na prasie laboratoryjnej, przy ciśnieniu docisku powyżej 0,5MPa.

#### Metoda badań

Średnią liczbową masę cząsteczkową (Mn) i rozrzut mas cząsteczkowych (PDI) oznaczano z pomocą chromatografii żelowej GPC (aparat Viscotek Rimax, chloroform, temperatura 35°C, przepływ 1mL/min, zastosowano 2 kolumny Viscotek 3580, detektor refrakcyjny, kalibracja z wykorzystaniem standardów polistyrenowych). Skład i budowę łańcucha terpolimerów oznaczano na podstawie widm <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR otrzymanych w spektrometrze Bruker Avans (600 MHz) w roztworze deuterowanego chloroformu, w obecności TMS jako wewnętrznego standardu. Własności cieplne (temperatura zeszklenia - T<sub>g</sub>, topnienia fazy krystalicznej - T<sub>m</sub>, ciepło topnienia fazy krystalicznej - dH) oznaczono z wykorzystaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC (aparat DSC Du Pont1090B, kalibracja galem i indem, szybkość grzania 20°C/min.).

Efekt pamięci kształtu badany był poprzez obserwacje zmian kształtu płytki (50mm x 10mm x 0,4 mm) otrzymanej z badanego materiału w wyniku prasowania. W temperaturze powyżej temperatury zeszklenia T<sub>g</sub> próbek, poprzez rozciąganie kształtki na jej długości o dodatkowe 50% uzyskiwano kształt przejściowy, utrwalany poprzez ochłodzenie w temperaturze pokojowej. Po ponownym umieszczeniu kształtki w łaźni wodnej, w temperaturze 48°C obserwowano przebieg procesu powrotu do pierwotnego kształtu. W

#### Materials and synthesis methods

The monomers used during the terpolymerization – glycolide, L-lactide (Purac Biomaterials) and trimethylene carbonate TCM (Boehringer Ingelheim) were subjected to preliminary purification through recrystallization from ethyl acetate solution, followed with drying in vacuum at room temperature. The initiators: zirconium (IV) acetylacetonate -Zr(Acac)<sub>4</sub> (Aldrich Corp.) and ethyleno-etoxy-zinc (II) - Zn(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), synthesized in our laboratory, were applied without additional purification methods.

Terpolymerization was carried out through ring-opening polymerization of glycolide, L-lactide and TMC in bulk at 115-120°C, using  $Zr(Acac)_4$  or  $Zn(C_2H_5)(OC_2H_5)$  keeping the molar ratio of initiator to monomers (I/M) at 1:1200. Samples no. 1 and 3 were obtained with single-stage method through simultaneous melting all monomers, adding initiating compound and mixing the reactor contents until total conversion of the reaction mixture was reached. Sample no. 2 was obtained with two-stage method. Initially the process was carried out in a reactor at 120°C; the L-lactide was melted in argon atmosphere, the initiating compound - Zr(Acac)<sub>4</sub> (I/M ratio of 1:1200) was then added to the mixture. The reaction of lactide polymerization was conducted until the monomer conversion degree reached 60%, when the remaining monomers were added to the reaction mixture and the reaction was resumed in these conditions, until total conversion of all monomers was achieved. The synthesis reaction of sample no. 4 was carried out at a single stage. The process was analogous to the case of samples 1 and 3. The only difference was the usage of TMC's oligomer along with glycolide and L-lactide. The TMC oligomer had been previously synthesized in our laboratory (average molar mass of ca. 2000 Da, chain terminated with hydroxyl groups).

All of the obtained terpolymers were purified through dissolution in chloroform and precipitating in methanol. After precipitation, the terpolymers were dried at 600C under reduced pressure. Molders for studies on shape memory were obtained with extrusion at 150°C, on laboratory press, under clamp pressure over 0,5MPa.

#### **Research method**

Average number molar mass ( $M_n$ ) and mass distribution (PDI) was determined with gel chromatography GPC (Viscotek Rimax apparatus, chloroform, temperature of 35°C, flow of 1mL/min, 2 Viscotek 3580 columns, refraction detector, calibration with the use of polystyrene standards). The composition and structure of the terpolymer chain was determined on the basis of <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spectra obtained with Bruker Avans spectrometer (600MHz) in deutered chloroform solution, in the presence of TMS as internal standard. Thermal properties (glass temperature - T<sub>g</sub>, crystalline phase melting temperature - T<sub>m</sub>, heat of crystalline phase fusion - dH) were determined with the use of differential scanning calorimetry DSC (Du Pont1090B DSC instrument, calibration using gallium and indium, heating rate 20°C/min.).

The shape memory effect was investigated through observation of changes in the shape of a plate (50mm x 10mm x 0,4 mm) obtained out of the measured material with moulding. At temperature exceeding the samples' glass temperature ( $T_g$ ), through stretching the mould up to 150% of the original length, intermediate shape was achieved. It was preserved with cooling down at room temperature. The mould was then again placed in water bath at 48°C, after which the process of regaining the previous shape took place. To characterize the basic properties of the shape

Lp.	Czas reakcji [h]	Temperatura reakcji [°C]	Inicjator	Skład trójpolimeru [%]	M <sub>n</sub> [kDa]	PDI	T <sub>g</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	dH [J/g]	t <sub>p</sub> [s]	k [%]
1	48	115	Zr(acac)₄	GL 13 : LA 75 : TMC 12	64	1,9	41,4			7	97,7
2	48	120	Zr(acac) <sub>4</sub>	GL 14 : LA 78 : TMC 8	56	1,9	56,8	121	5,9	8	98.1
3	72	120	ZnEtOEt	GL 15 : LA 77 : TMC 8	67	2	33,3	144	10,5	8	98,5
4	96	120	$Zr(acac)_4$	GL 9 : LA 69 : o-TMC 22	39	1,8	42,7	141	13,1	8	95,2

TABELA 1. Charakterystyka otrzymanych trójpolimerów.TABLE 1. Characteristic of obtained terpolymers.

celu podstawowego scharakteryzowania własności pamięci kształtu otrzymanych materiałów mierzono czas powrotu do kształtu pierwotnego (t<sub>p</sub>) i jego stopień (k%) (stosunek zmierzonej długości płytki po powrocie do długości płytki mierzonej przed deformacją).

#### Wyniki i dyskusja

Prowadząc terpolimeryzację mieszaniny cyklicznych monomerów glikolidu, L-laktydu i trimetylenowęglanu (TMC) inicjowaną niskotoksycznym acetylacetonianem cyrkonu (IV) lub  $Zn(C_2H_5)(OC_2H_5)$  uzyskano z dobrą wydajnością wysokocząsteczkowe bioresorbowalne terpolimery. Terpolimer 1, otrzymano na drodze terpolimeryzacji jednostopniowej. Pomimo dużej zawartości laktydylu, długości utworzonych mikrobloków laktydylowych były niewystarczające aby mogły ulec uporządkowaniu i utworzyć fazę krystaliczną. Przyczyną tego zjawiska były silne procesy transestryfikacji, zachodzące równolegle do głównej reakcji wzrostu łańcucha. Ich efektem obok skrócenia długości mikrobloków laktydylowych było powstawanie dużej ilości krótkich wymieszanych sekwencji laktydylu, glikolidylu i jednostek węglanowych (RYS.1, sygnały 5,6,12,19). Aby otrzymać terpolimer o własnościach semikrystalicznych szereg następnych terpolimeryzacji prowadzono w ten sposób aby zwiększyć średnią długość tworzących się mikrobloków laktydylowych. Efekt ten uzyskano poprzez reakcję dwuetapową (TAB.1. rząd 2). Początkowo prowadzono homopolimeryzację laktydu, otrzymując w ten sposób aktywne homopolimery laktydu. W drugim etapie dodając do mieszaniny reakcyjnej pozostałe komonomery uzyskiwano terpolimer, który pomimo intensywnie zachodzących procesów transestryfikacji, zachowywał w strukturze łańcucha długie bloki laktydylowe zdolne do tworzenia fazy krystalicznej (TAB.2, rząd 2, RYS.1. sygnał 4). Jednocześnie w łańcuchu tym zanotowano duży spadek ilości krótkich wymieszanych sekwencji powstałych w wyniku procesów transestryfikacji miedzyczasteczkowej. Okazało się również że zastąpienie inicjatora cyrkonowego cynkowym powoduje występowanie podobnego zjawiska (TAB.2, rząd 3). Efekt ten związany był w tym przypadku z wyraźnym obniżeniem stopnia transestryfikacji międzycząsteczkowej. Na widmie NMR wyraźnie można zaobserwować znaczny spadek ilości sekwencji powstajacych w wyniku tego procesu (RYS.1. sygnał 6,12,17,19) Pomimo że reakcja była prowadzona na drodze jednostopniowej, otrzymany terpolimer 3 wykazywał wyższy stopień krystaliczności w porównaniu z terpolimerem 2.

Terpolimery o najwyższym stopniu uporządkowania mikrobloków laktydylowych uzyskano w reakcji terpolimeryzacji glikolidu, L-laktydu i uprzednio otrzymanego oligomeru TMC. Oligomer ten otrzymano na drodze oligomeryzacji ROP cyklicznego TMC, inicjowanej butyndiolem.

Terpolimer 4 (TAB.1, rząd 4) charakteryzował się, obec-

memory of the obtained materials the duration of returning to the original shape  $(t_p)$  and the degree (k%) (the ratio of the measured length of the plate after restoring to the length measured before the deformation) were determined.

#### **Results and discussion**

Conducting the terpolymerization of the mixture of cyclic monomers of glycolide, L-lactide and trimethylene carbonate (TMC) initiated with low-toxic zirconium (IV) acetylacetonate or  $Zn(C_2H_5)(OC_2H_5)$  high-molecular bioresorbable terpolymers were obtained with high efficiency. Terpolymer 1 was obtained by means of single-stage terpolymerization process. Despite high content of lactydyl, the length of created lactydyl microblocks were not sufficient to be re-organized and form crystalline phases. The cause of this phenomenon were strong transesterification processes, occurring simultaneously with the main reaction of chain propagation. That effected in shortening of lactydyl microblocks and arising of a number of short, mixed sequences of lactydyl, glycolidyl and carbonate units (FIG.1, signals 5,6,12,19). To obtain a terpolymer with semi-crystalline properties, a series of further terpolymerization reactions were carried with emphasis on increasing of average length of arising lactydyl microblocks. This effect was obtained with two-stage reaction (TAB.1. row 2). Initially, lactide homopolymerization was conducted, which resulted in obtaining active lactide homopolymers. At the second stage of the reaction, by adding the remaining comonomers to the reaction mixture, a terpolymer was obtained. In this case, even though simultaneous transesterification processes were still apparent, the terpolymer preserved long lactydyl units in the chain structure, which were able to create crystalline phases (TAB.2, row 2, FIG.1. sig. 4). At the same time, a significant decrease in the number of short mixed sequences created as a result of a number of intermolecular transesterification processes was observed. Also replacing the zirconium initiator with zinc compound brought similar results (TAB.2, row 3). In this case, the effect was connected with considerable decrease of intermolecular transesterification degree. In the NMR spectrum, a significant loss in the number of sequences arising as a result of this process is clearly visible (FIG.1. sig. 6,12,17,19) Although the reaction was conducted as single-stage, the obtained terpolymer 3 was characterized with higher degree of crystallinity comparing to terpolymer no.2.

Terpolymers with the highest degree of order of lactydyl microblocks were obtained in terpolymerization reaction of glycolide, L-lactide and TMC oligomer, previously obtained on the way ROP oligomerization of cyclic TMC initiated with butindiol.

Terpolymer 4 (TAB.1, row 4) was characterized with the presence of a large number of long carbonate microblocks originating from the TMC oligomer, still unable to form or-

86

resonance		Т
lines	Jequences	
	Lootido cogueroso	
	Lactine sequences	
	(mechine carbon region)	
1	T <u>L</u> T + T <u>LL</u> T + T <u>L</u> L <u>L</u> T + TL <u>L</u> G	
2	<u>GL</u> LT + <u>GL</u> LLT	
3	T <u>L</u> LLL + LLLLT	
4	L <u>LL</u> L	
5	L <u>L</u> GG	
	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	T <u>G</u> GGT + T <u>G</u> GGL	
12	T <u>G</u> T + T <u>G</u> GT + T <u>G</u> GL	
13	GGG <u>G</u> T + TGG <u>G</u> T + LGG <u>G</u> T	
18	TG <u>G</u> T, T <u>G</u> GGG,	i
19	LL <u>G</u> G	
20	G <u>GG</u> G	
	$T' = -OCH_2CH_2CH_2-OCO-$	ĺ
	$T'' = - OCH_2CH_2CH_2-OCO-$	
	$G = -OCH_2CO-$	
	L = -OCH(CH₃)CO-	
		1
TABELA	2.	



TABLE 2.

nością dużej ilości długich mikrobloków węglanowych, pochodzących od oligomeru TMC, niezdolnych jednak do utworzenia fazy uporządkowanej (FIG.1, sygnał 9).

Co ważne, w reakcji otrzymywania terpolimeru 4 nie występował proces transestryfikacji międzycząsteczkowej, wywoływany przez aktywne węglanowe końce łańcucha (ze względu na brak rosnących jednostek węglanowych). We wszystkich pozostałych

jednostek węgranowych). We wszystkich pozostałych badanych reakcjach wzrostu łańcucha terpolimeru, proces ten jest zasadniczo odpowiedzialny za skracanie długości mikrobloków laktydylowych. Z tego powodu łańcuch terpolimeru 4 zawiera oprócz mikrobloków węglanowych również długie mikrobloki laktydylowe, tworzące wyraźną fazę krystaliczną (FIG.1, sygnał 4). Łańcuch zawierał jeszcze tylko zasadniczo sekwencję złożone z jednostek glikolidylowych i laktydylowych (FIG.1, sygnał 19).

Wszystkie otrzymane terpolimery wykazywały pamięć kształtu. Szybkość powrotu z kształtu tymczasowego do permanentnego (tp), wywoływana podgrzaniem do temperatury zbliżonej do temperatury zeszklenia materiału ( $T_g$ ), dla wszystkich otrzymanych terpolimerów była duża i wahała się w okolicach 8 sekund. Dla wszystkich tych terpolimerów stopień powrotu do kształtu permanentnego (k%), po rozciągnięciu kształtki o 50% i zamrożeniu tego tymczasowego kształtu wynosił ponad 95%.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, jest możliwe sterowanie mikrostrukturą łańcucha syntezowanych na drodze polimeryzacji ROP terpolimerów L-laktydu/glikolidu/TMC pomimo zachodzących w czasie tej reakcji silnych procesów transestryfikacyjnych, które powodują randomizację rozkładu sekwencji komonomerów w łańcuchu. Tę regulację

RYSUNEK 1. Widma <sup>13</sup>C NMR otrzymanych terpolimerów, przyporządkowanie sygnałów do sekwencji łańcucha. FIGURE 1. <sup>13</sup>C NMR spectra of the terpolymers and assignation signals to the chain sequences.

dered phase (FIG.1, sygnał 9).

It is important to point out that in the reaction of obtaining terpolymer 4, the intermolecular transesterification processes caused with active carbonate ends of the chain did not take place, due to a lack of propagating carbonate units. In all other investigated reactions of terpolymer chain propagation, the process is the primary cause for shortening of lactydyl microblocks. For this reason, the chain of terpolymer 4 contains long lactydyl microblocks beside carbonate microblocks and thus a visible crystalline appears (FIG.1, sig. 4). Basically, the chain exclusively contained sequences of glycolidyl and lactydyl unics (FIG.1, sig. 19).

All of the obtained terpolymers demonstrated shape-memory properties. The time of restoring the permanent shape from the temporary stage  $(t_p)$  evoked with heating up to the temperature close to glass transition temperature  $(T_g)$ , was a high value for all terpolymers and oscillated around 8 seconds. The restoring degree (k%) after stretching the sample to 150% of the original length and freezing the temporary shape valued over 95% for all terpolymers.

The conducted research proves it possible to control the chain microstructure of the chain of L-lactide/glycolide/TMC terpolymers synthesized by means of ROP, despite simultaneous strong transesterification processes, which are a cause to randomized distribution of comonomer sequences in the chain microstructure. There are numerous methods of

mikrostruktury łańcucha uzyskać można na wiele sposobów; poprzez wielostopniowe prowadzenie reakcji, odpowiedni dobór inicjatora, czy też poprzez zastąpienie jednego z komonomerów (TMC) odpowiednio dobranym oligomerem, aktywnym w prowadzonej reakcji terpolimeryzacji. Przy odpowiednim dobraniu powyższych czynników możemy wpływać w pewnym, dość dużym zakresie na stopień krystaliczności otrzymywanych terpolimerów, z zachowaniem ich własności zapamiętywania kształtu.

#### Podziękowanie

Pracę wykonano w ramach projektu rozwojowego "Polimerowe Chirurgiczne Systemy Resorbowalne z Pamięcią Kształtu" POIG UDA 01-03-01-123/08-00 współfinansowanego przez Unię Europejską, Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego.

#### Piśmiennictwo

[1]. X.L Lu, Z.J. Sun, W.Cai, Z.Y.Gao, J Mater Sci: Mater Med (2008) 19,395–399.

[2]. M. Nagata, Y. Sato, J. Polym. Sci.: Part A: Polymer Chemistry, (2005) 43, 2426–2439.

[3]. A.Lendlein, S.Kelch, Angew. Chem. Int. Ed. (2002), 41, 2034 – 2057.

## WPŁYW PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA SEGMENTOWE POLIURETANY DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

M.WALO\*, G.PRZYBYTNIAK

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Dorodna 16, 03-195 Warszawa, Polska \*MAILTO: m.walo@ichtj.waw.pl

#### Streszczenie

Celem prezentowanej pracy było badanie wpływu promieniowania jonizującego na wybrane fizykochemiczne właściwości segmentowego poliuretanu (PU). Poliuretan scharakteryzowano przy użyciu elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), pomiaru kąta zwilżania i badania właściwości termicznych i mechanicznych. Wyniki otrzymane przy zastosowaniu powyższych metod wskazują na niewielki wpływ procesów radiacyjnych na strukturę i właściwości badanego polimeru do dawki 112kGy. Zatem również ekspozycja poliuretanu na dawkę sterylizacyjną 25kGy nie zmienia właściwości chemicznych i mechanicznych.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 87-90]

#### Wstęp

Materiały polimerowe używane w medycynie, jako biomateriały do wytwarzania wyrobów medycznych i nośników komórek w inżynierii tkankowej muszą spełniać wiele wymagań [1]. Po pierwsze, powinny posiadać dobre właściwości mechaniczne i fizyczne, być powtarzalne i nie controlling the chain microstructure: through multiple stages of conducting the reaction, appropriate selection of initiator, or replacing one of the comonomers (TMC) with properly prepared oligomer, active in the conducted terpolymerization method. Appropriate combination of the aforementioned factors enables the user to influence the degree of crystallinity of the obtained terpolymers to a fairly large extent, still preserving the shape memory properties.

#### Acknowledgements

The work was carried out in the frames of the "Bioresorbable polymer surgical systems with shape memory properties" project (POIG UDA 01-03-01-123/08-00) supported by the European Union - European Regional Development Fund.

#### References

[4]. E.Zini, M.Scandolla, P.Dobrzynski, J.Kasperczyk, M.Bero Biomacromolecules, (2007), 8, 3661-3667.
[5]. P.Dobrzynski, J.Kasperczyk, M.Bero, M.Scandola, E.Zini, Eng. Biomat. (2007), 63-64, 45-47.

## RADIATION-INDUCED EFFECTS IN SEGMENTED POLYURETHANE FOR BIOMEDICAL PURPOSES

#### M.WALO\*, G.PRZYBYTNIAK

INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, 16 DORODNA STR., 03-195 WARSZAWA, POLAND \*MAILTO: M.WALO@ICHTJ.WAW.PL

#### Abstract

The purpose of the presented study was to investigate the effect of ionizing radiation on selected physicochemical properties of segmented polyurethane (PU). Polyurethane was characterized by electron paramagnetic resonance (EPR), measurement of dynamic contact angle and investigation of thermal and mechanical properties. The results obtained by these techniques revealed insignificant influence of radiation on structure and features of investigated polymer up to 112kGy. Thus it was confirmed that upon exposition to a sterilization dose of about 25kGy polyurethane does not change chemical and mechanical properties. [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 87-90]

#### Introduction

Polymeric materials used in medicine as biomaterials for the fabrication of medical devices and tissue engineering scaffolds have to fulfill many requirements [1]. Firstly, they ought to possess good mechanical and physical properties, be reproducible and should not change properties upon processing and sterilization. Secondly, they should not powinny zmieniać swoich właściwości podczas przetwarzania i sterylizacji. Po drugie, nie powinny wywoływać stanów zapalnych, wykazywać toksyczności i kancerogenności. Wymaga to odpowiedniej kontroli właściwości implantów (takich jak szybkość degradacji i wytrzymałość mechaniczna) i zapewnienia optymalnych warunków dla żywotności komórek, ich namnażania, a następnie odtwarzania tkanki. Ze znanych metod sterylizacji polimerów szczególnie polecane są dwie: sterylizacja radiacyjna i metoda chemiczna wykorzystująca tlenek etylenu, jako czynnik sterylizujący. Z drugiej strony, biomateriały polimerowe mogą być także poddawane działaniu promieniowania jonizującego w celu poprawy ich właściwości.

Poliuretany do celów biomedycznych są wykorzystywane w wielu zastosowaniach. Dzięki doskonałym właściwościom mechanicznym i biokompatybilności, są często używane, jako materiały kontaktujące się z krwia, takie jak sztuczne serce, cewniki i implanty piersi [2].

#### Materiały i metody

Segmentowy poliuretan (SCHEMAT 1) na bazie poli(adipinianu 1,4-butylenu) zakończonego grupami -OH (PBA) o ciężarze cząsteczkowym MW=1000, diizocyjanianiu izoforenu (IPDI) i 1,4-butanodiolu (BDO) otrzymano metodą prepolimeryzacji w masie. Stosunek wagowy między segmentem sztywnym a giętkim wynosił 30:70. Proces dwustopniowej polikondensacji prowadzono bez użycia katalizatora.

Próbki PU przeznaczone do pomiarów napromieniowano w powietrzu wiazka elektronów do dawki absorpcyjnej 112kGy w akceleratorze Elektronika 10/10.

Polimer badany metodą EPR poddano ekspozycji na działanie promieniowania gamma w źródle 60Co o mocy dawki 1.036kGy/h w temp 77K. Widma EPR mierzono z

wykorzystaniem spektromeprostokatna TE 102.

Kąt zwilżania oznaczono za pomocą tensometru K100C (Krüss) przy użyciu metody Wilhelmiego.

Właściwości mechaniczne, naprężenie przy zerwaniu i wydłużenie przy zerwaniu, badano stosując maszynę wytrzymałościowa Instron 3366 zgodnie z normą PN-EN ISO 527-1:1998.

#### Wyniki i dyskusja

Badania EPR były przeprowadzone w warunkach kriogenicznych, gdyż rodniki w temperaturze otoczenia okazały się nietrwałe i szybko zanikały tworząc produkty diamagnetyczne. W widmach PU (RYS.1) zarejestrowanych po napromieniowaniu dawką 6kGy dominującym składnikiem jest tryplet o rozszczepieniu nadsubtelnym około 1.3mT (hfs). Charakter tego sygnału wskazuje na oddziaływanie między niesparowanym elektronem i atomami wodoru. Wydaje się, że centrum rodnikowe jest zlokalizowane obok grupy CO- (SCHEMAT 2), gdyż podwójne wiązanie umożliwia stabilizację rezonansową spinu.

Podczas termicznego ogrzewania widmo poliuretanu przekształca się w sygnał podobny do zarejestrowanego dla oligomeru (PBA). Zatem to domeny giętkie determinują makroskopowe efekty napromieniowania, natomiast wpływ induce adverse inflammatory reaction, be toxic and carcinogenic. This require adequate control of implant properties (such as degradation rate and mechanical strength) and creating optimal conditions for cell survival, proliferation, and subsequent tissue formation. Among known methods of sterilization, two of them are recommended for polymer biomaterials: radiation sterilization and chemical treatment with using ethylene oxide as a sterilization agent. On the other hand the polymers might be also exposed to ionizing radiation to improve their properties.

Biomedical polyurethanes are used in a broad range of applications. Because of their excellent mechanical properties and biocompability, they have been frequently used in the medical devices as blood contacting materials, such as artificial heart, catheters and mammary implants [2].

#### Experimental

Segmented polyurethane (PU) based on poly(1,4butylene adipate)diol end-capped by -OH group (PBA) of molecular weight MW=1000, isophorone diisocyanate (IPDI) and 1,4-butanediol (BDO) were synthesized in bulk by a two-step reaction. The weight ratio between hard and soft segment was 30:70. A polycondensation process was carried out without catalyst.

PU samples were irradiated at ambient temperature with a high energy electron beam generated in a linear electron accelerator Elektronika 10/10 to a dose of 112 kGy.

The polymer studied by EPR method was irradiated by gamma rays in 60Co source Issledovatel (dose rate 1.036 kGy/h) at 77K. EPR spectra were recorded using a Bruker ESP 300 spectrometer with rectangular cavity TE 102.

The contact angle was measured with a tensiometer K100C (Krüss) by using Wilhelmy method.

The mechanical properties: tensile stress and elongation at break were measured using Instron

3366 machine according to PN-EN ISO 527-1:1998 technical standard.

#### Results and discussion

The EPR studies were carried out under cryogenic conditions since the radicals generated at ambient temperature were unstable and decay fast to diamagnetic species. The spectra of PU (FIG.1) detected after irradiation with a dose of 6kGy show predominantly triplet of hyperfine

splitting about 1.3mT (hfs). Character of the signal suggests interaction between unpaired electron and hydrogen atoms. It seems that the radical centre is situated in a position towards CO- groups (SCHEME 2) as such a type of intermediate is stabilized by neighboring double bond by resonance.

Upon thermal annealing the polyurethane spectrum is converted to the signal similar to that detected for diol oligomers (PBA). The influence of hard segments on radiation induced processes is less significant thus the soft domains determine the microscopic effects of irradiation.

It was found that ionizing radiation increases the value of dynamic contact angle measured in water (FIG.2). It was expected that the contact angle ought to decrease after irradiation since ionizing radiation induces formation of polar

SCHEMAT 2. Najbardziej prawdopodob-ĊH2 ny rodnik. SCHEME 2. The most probable radical. О



nu.



SCHEMAT.1. Struktura segmentowego poliureta-

SCHEME 1. Structure of segmented polyurethane.

segmentów sztywnych na procesy rodnikowe indukowane promieniowaniem jonizującym jest znacznie mniejszy.

Promieniowanie jonizujące spowodowało wzrost wartości kąta zwilżania (RYS.2). Oczekiwano, że kąt zwilżania zmniejszy się po napromieniowaniu, ponieważ promieniowanie jonizujące inicjuje tworzenie grup polarnych takich jak grupy hydroksylowe, karbonylowe i karboksylowe. Jednakże wzrost kąta zwilżania wskazuje, że napromieniowany PU jest nieco bardziej hydrofobowy niż nienapromieniowany. Efekt może być spowodowany reorganizacją domen w wyniku migracji hydrofobowych segmentów giętkich ku powierzchni. Zjawisko to było wcześniej obserwowane przez Górną i Gogolewskiego [3].



RYS.2. Dynamiczny kąt zwilżania względem wody. FIG.2. Dynamic contact angle versus water.

Badano również termiczne właściwości segmentowego poliuretanu po ekspozycji na promieniowanie jonizujące przy użyciu różnicowej kalorymetrii skaningowej i analizy termograwimetrycznej (RYS.3).

Temperatury przejścia szklistego przypisane segmentowi giętkiemu zaobserwowano metodą DSC przy -31.3°C i -32.4°C, odpowiednio dla nienapromienionego i napromienionego poliuretanu. Natomiast endotermiczne piki odpowiadające topnieniu domen segmentu sztywnego występują w 100.1°C dla nienapromienionego PU i w 111.0°C dla PU napromienionego dawką 112kGy. Znaczny wzrost temperatury topnienia może być związany z reakcją sieciowania PU inicjowaną promieniowaniem jonizującym.

Analiza termograwimetryczna wskazuje, że polimer jest nieznacznie bardziej stabilny przed niż po napromieniowaniu dawką 112kGy. Otrzymany poliuretan pozostaje trwały ter-



RYS.1.Widma EPR PBA (A) i PU (B) po napromieniowaniu dawką 6.0kGy w warunkach kriogenicznych oraz po ogrzaniu do wskazanych temperatur. FIG.1. EPR spectra of PBA (A) and PU (B) upon irradiation with a dose of 6.0kGy under cryogenic conditions and gradual annealing to indicated temperatures.

groups, e.g. hydroxyls, carbonyls and carboxyls. However, it was found that irradiated PU is slightly more hydrophobic than non irradiated one. It seems that hydrophobic soft segment domains migrate towards surface. This phenomenon was earlier observed by Górna and Gogolewski [3].

Thermal properties of segmented polyurethane were investigated upon exposure to ionising radiation by differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis (FIG.3).

The DSC studies showed that glass transition of the soft segment chains were observed at -31.3°C and -32.4°C for neat and irradiated polyurethane, respectively. The endothermic peaks that correspond to the melting transition of the hard segment were observed at 100.1°C and 111.0°C, respectively for non irradiated and irradiated PU. The significant enhancement of temperature results from crosslinking of polyurethane initiated by ionising radiation.

The thermogravimetric analysis revealed that polymer is slightly more stable before than after irradiation with a dose of 112kGy. Polyurethane remains thermally resistant up to 270°C and above this temperature the first stage of decomposition is observed. Character of thermograms points out



RYS.3. Termogramy DTG (A) i DSC (B) PU przed i po napromieniowaniu dawką 112kGy. FIG.3. DTG (A) and DSC (B) thermograms of PU before and after irradiation with a dose of 112kGy.

MGINEERING OF MATERIALS

ПĒ.



RYS.4. Naprężenie przy zerwaniu i wydłużenie przy zerwaniu poliuretanu przed i po napromieniowaniu. FIG.4. Tensile stress (A) and elongation at break (B) of polyurethane before and after irradiation.

micznie do temperatury 270°C, i dopiero po jej przekroczeniu zachodzi pierwszy etap rozkładu. Charakter termogramów świadczy o wielostopniowym mechanizmie rozkładu.

Na podstawie pomiarów mechanicznych stwierdzono, że ekspozycja na promieniowanie jonizujące dla dawki dwukrotnie większej niż dawka sterylizacyjna nie ma znacznego wpływu na właściwości badanego poliuretanu. Po napromieniowaniu obserwuje się niewielki spadek naprężenia przy zerwaniu i praktycznie taką samą wartość wydłużenia przy zerwaniu w porównaniu z próbką odniesienia (RYS.4).

#### Podsumowanie

Polimery do zastosowań biomedycznych poddaje się działaniu promieniowania jonizującego, aby przeprowadzić proces sterylizacji i/lub poprawić ich właściwości. Napromieniowanie wpływa na fizykochemiczne i mechaniczne właściwości powodując zwykle sieciowanie i/lub degradację polimeru. Poliuretany są odporne radiacyjnie, co najmniej do dawki 112kGy. Zatem kilkukrotnie mniejsza dawka sterylizacyjna ma niewielki wpływ na zmianę właściwości badanego poliuretanu for a multi-stage mechanism of the decomposition.

On a basis of the mechanical measurements it was found that the irradiation with a dose twice higher than sterilization dose has not significant influence on mechanical properties of the investigated polyurethane. After irradiation small reduction of tensile stress was revealed and practically the same value of elongation at break as for the neat sample (FIG.4).

#### Summary

Polymers for biomedical applications might be exposed to ionizing radiation to carry out sterilization and/or to improve their properties. Irradiation affects physicochemical and mechanical properties of polymers leading usually to crosslinking and/or degradation. Segmented polyurethane is radiation stable at least up to 112kGy as such a dose has small impact on changes in properties of investigated polyurethane.

#### Piśmiennictwo

K.Chen, J.Kuo, C.Chen, Biomaterials, 21 (2000) 161-171].
 D.Shi, Introduction to biomaterials, Tsinghua University Press

[3] K.Gorna, S.Gogolewski, Polym.Degrad.Stab., 79 (2003) 465-474

References

. . . . . . . . . . . . . . .

## **BADANIA IN VITRO** CYTOTOKSYCZNOŚCI BIOSZKIEŁ ZAWIERAJĄCYCH SREBRO

LIDIA CIOŁEK<sup>1\*</sup>, JOANNA KARAŚ<sup>1</sup>, ANDRZEJ OLSZYNA<sup>2</sup>, Ewa Zaczyńska<sup>3</sup>, Anna Czarny<sup>3</sup>, Bogusława Żywicka<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INSTYTUT SZKŁA, CERAMIKI, MATERIAŁÓW OGNIOTRWAŁYCH I BUDOWLANYCH, UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA <sup>2</sup>POLITECHNIKA WARSZAWSKA WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA <sup>3</sup>INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ PAN, UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCŁAW <sup>4</sup>AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU, UL. PASTEURA 1, 50-361 WROCŁAW \*MAILTO: BIOCERAMIKA@ISIC.WAW.PL

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 91-93]

#### Wprowadzenie

Celem przeprowadzonych badań było określenie w warunkach in vitro cytotoksyczności bioszkieł w postaci proszków zawierających w składzie chemicznym srebro. Bioszkła uwalniające jony Ag+ o właściwościach opisanych w [1,2] obejmujących morfologię ziaren, półilościową mikroanalizę powierzchni i oznaczenie składu pierwiastkowego, zostały wytworzone z myślą o zastosowaniu w stomatologii gdzie problemem są choroby przyzębia prowadzące w okresie późniejszym do tworzenia kieszonek, recesji dziąsła i utraty kości. Badania in vitro cytotoksyczności tych bioszkieł przeprowadzone zostały we współpracy z IITD PAN oraz AM we Wrocławiu.

## IN VITRO STUDIES **OF CYTOTOXICITY OF BIOGLASS** CONTAINING SILVER

LIDIA CIOŁEK<sup>1\*</sup>, JOANNA KARAŚ<sup>1</sup>, ANDRZEJ OLSZYNA<sup>2</sup>, EWA ZACZYŃSKA<sup>3</sup>, ANNA CZARNY<sup>3</sup>, BOGUSŁAWA ŻYWICKA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>THE INSTITUTE OF GLASS, CERAMICS, REFRACTORY AND CON-STRUCTION MATERIALS, 9 Postępu Street, 02-676 Warszawa <sup>2</sup>WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING. 141 WOŁOSKA STREET, 02-507 WARSZAWA <sup>3</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, 12 RUDOLFA WEIGLA STREET, 53-114 WROCLAW <sup>4</sup>Medical University, 1 Pasteura Street, 50-361 Wroclaw \*MAILTO: BIOCERAMIKA@ISIC.WAW.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 91-93]

#### Introduction

The objective of the research was to determine under in vitro conditions the cytotoxicity of bioglasses in the form of silver-containing powders. The bioglasses releasing Aq+ ions with properties described in [1,2], including grain morphology, semi-quantitative surface micro-analysis and determination of elemental composition, were prepared to be used in the treatment of the most advanced parodontium illnesses with surgical methods. The in vitro cytotoxicity studies were performed in collaboration with IIiTD PAN and AM in Wrocław.

#### **Materials**

Four aluminosilicate glasses and one calciumsilicate

composition various concentrations of silver introducing substrate. Their chemical compositions are presented in TABLE 1 where component content is specified in the reacting mixture, recalculated into oxides. The synthesis of these bioglasses by zol-gel method was carried on with tetraethyl orthosilicate (TEOS) as a precursor of silica as well as aluminium isopropyl, calcium nitrate tetrahydrate, triethyl phosphate and silver nitrate.

Materiały

glinokrzemianowe zawierające w składzie chemicznym różne udziały substratu wprowadzającego srebro oraz jedno wapniowokrzemianowe. Ich składy chemiczne przedstawiono w TABELI 1 gdzie podano zawartości składników w mieszaninie reakcyjnej przeliczone na tlenki. Do syntezy bioszkieł metoda zol-żel stosowano ortokrzemian tetraetvlu (TEOS) jako prekursor krzemionki oraz izopropylan glinu, azotan wapnia czterowodny,

Wytworzono cztery bioszkła

fosforan trietylu oraz azotan srebra.

#### Metody badań

Oddziaływanie wytworzonych nanoproszków wykonane zostało metodą bezpośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowla komórek linii L929 (linia komórek fibroblastopodobnych otrzymanych z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy C<sub>3</sub>H) w warunkach in vitro. Badania prowadzono przy stężeniu proszków 2,5mg/ml, 1,2mg/ml, 0,5mg/ml i 0,25mg/ml po 24h, 48h i 72h inkubacji.

#### **Test methods**

The impact of prepared nanopowders was performed by direct contact with one-layer cell culture L929 (line of fibroblast-like cells obtained from the subcutaneous fat tissue of mice C<sub>3</sub>H) under in vitro conditions. The studies were performed in culture media at powder concentrations of 2.5mg/ml, 1.2mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml after 24h, 48h and 72h of incubation time.

		_			1	glass, containing in its chemical	
	Zaw	arto	tlenk		nas.]	Powierzchnia	composition various concentra-
Bioszkło		Cont	ent [\	vt.%]		wła ciwa,	tions of silver introducing sub-
Bioglass	0.0					Specific	strate. Their chemical composi-
	SIO <sub>2</sub>	$AI_2O_3$	CaO	$P_2O_5$	Ag <sub>2</sub> O	surface [m²/g]	tions are presented in TABLE 1
Z-01	99,2	0,8	-	-	-	12,31	where component content is
Z-2	98,2	0,8	-	-	1,0	4,76	specified in the reacting mixture,
Z-5	95,7	0,8	-	-	3,5	6,36	recalculated into oxides. The
Z-8	89,0	7,5	-	-	3,5	64,90	by zol-gel method was carried
Bioszkło I	60	-	37	2	1	7,83	on with tetraethyl orthosilicate

TABELA 1: Składy tlenkowe bioszkieł. TABLE 1. Chemical compositions of bioglasses.

92

			2,5 mg/ml			1,2 mg/ml
	Martwe Dead [%]	ywe Alive [%]	Ogółem Total	Martwe Dead [%]	ywe Alive [%]	Ogółem Total
Z-01	-	-	Brak komórek- odklejone No cells - unstuck	-	-	Brak komórek- odklejone No cells - unstuck
Z-2	-	-	Brak komórek- odklejone No cells - unstuck	-	-	Brak komórek- odklejone No cells - unstuck
Z-5	-	-	Brak komórek- odklejone No cells - unstuck	-	-	Brak komórek- odklejone No cells - unstuck
Z-8	58	42	5,0 x10 <sup>4</sup>	52	48	4,4 x10 <sup>4</sup>
Bioszkło I Bioglass I	45	55	3,5 x10 <sup>4</sup>	65	35	5,5 x10 <sup>4</sup>
Hodowla kontrolna L929 Control culture L929	2	98	1,2 x10 <sup>6</sup>	2	98	1,2 x10 <sup>6</sup>

TABELA 2. Wpływ proszków w stężeniu 2,5mg/ml i 1,2mg/ml na komórki L929 po 72 godz. TABLE 2. The impact of powders in concentration of 2,5 mg/ml and 1,2 mg/ml on cells line L929 vitality after 72 hours.

#### Wyniki badań

Wyniki badań in vitro cytotoksyczności po 72h dla wszystkich badanych stężeń zamieszczono w TABELI 2 i 3. Natomiast RYSUNEK 1 przedstawia wpływ bioszkieł w stężeniu 0,5mg/ml na komórki linii L929 po 72h inkubacji.

			0,5 mg.	/ml	0	0,25 mg/ml			
,		Martwe Dead [%]	ywe Alive [%]	Ogółem Total	Martwe Dead [%]	ywe Alive [%]	Ogółem Total		
ו ו	Z-01	20	80	3,9 x10⁵	2	98	4,5 x10⁵		
/	Z-2	20	80	1,5 x10⁵	3	97	7,8 x10⁵		
t	Z-5	4	96	3,6 x10⁵	1	99	5,0 x10⁵		
1	Z-8	6	94	1,2x10 <sup>6</sup>	2	98	1,4 x10 <sup>6</sup>		
i	Bioszkło I Bioglass I	7	93	1,2 x10 <sup>6</sup>	3	97	1,4 x10 <sup>6</sup>		
	Hodowlă kontrolna L929 Control culture L929	1	99	1,7 x10 <sup>6</sup>	1	99	1,7 x10 <sup>6</sup>		
,	1	a) br	ak efekt	u toksyczne	ego				

## Results

Results of in vitro studies of cytotoxicity after 72h for all studied concentrations are presented in TABLES 2 and 3. FIG-URE 1 presents images of cell morphology after 72h of incubation time at powder concentration of 0,5mg/ml.

## Conclusions

On the basis of results of the cytotoxic effect study of preparations after 72 h the following was

## Wnioski

Na podstawie wyników badania efektu cytotoksycznego preparatów po 72h stwierdza się, że: 1. Wszystkie badane

## TABELA 3. Wpływ proszków w stężeniu 0,5mg/ml i 0,25mg/ml na komórki L929 po 72 godz.

TABLE 3. The impact of powders in concentration of 0,5mg/ml and 0,25mg/ml on cells line L929 vitality after 72 hours.



RYS.1. Wpływ bioszkieł w koncentracji proszku 0,5mg/ml na komórki linii L929 po 72h inkubacji, a) brak efektu toksycznego (A-Z8, B-bioszkło I, C-Z5), b) działanie toksyczne badanych proszków (D-Z01, E-Z2), c) kontrola (F).

FIG.1. The impact of bioglasses on cell morphology after 72h of incubation time at powder concentration of 0,5mg/ ml: a) lack of toxic effect (A-Z8, B-bioglass I, C-Z5) b) toxic impact of the preparations (D-Z01, E-Z2), c) control.

bioszkła w stężeniach 2,5mg/ml oraz 1,2mg/ml działają toksycznie na komórki L929

2. Bioszkła o symbolach Z-5, Z-8 oraz Bioszkło I w stężeniu 0,25mg/ml oraz 0,5 mg/ml nie wykazują działania toksycznego na komórki linii L929, natomiast proszki Z-01 oraz Z-2 w tym stężeniu wykazują efekt toksyczny dla tych komórek.

3. Różnice w oddziaływaniu bioszkieł na komórki zależą od wielu czynników, m.in. od składu chemicznego i morfologii nanoproszków.

#### Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako projekt badawczy rozwojowy Nr R08 010 02.

#### Piśmiennictwo

[1]. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Traczyk S. – "Nowe bioszkła zawierające srebro", Inżynieria Biomateriałów, 2008, 77-80, 25-27

#### found:

1. All bioglasses tested are toxic for cells L929 at powder concentration of 2.5mg/ml and at powder concentration of 1.2mg/ml

2. Bioglasses marked Z-5, Z-8 and Bioglass I don't show toxic effect for cells L929 at powder concentration of 0,5mg/ml and 0,25 mg/ml, but preparations Z-01 and Z-2 show toxic effect for this cell line

3. The differences in bioglass powders influence on cells depend on many factors, among others: chemical composition and morphology of powders.

#### Acknowledgements

Scientific study financed from the science funds as a research and development project no. R08 010 02 by Polish Ministry of Science and Higher Education.

#### References

[2]. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., - "Badania właściwości fizykochemicznych bioszkieł domieszkowanych srebrem wytworzonych metodą zol-żel", Prace Instytutu Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych 2009, Nr 3, 15-25

#### . . . . . . . . . . . . . . . . .

## ANALIZA WYTRZYMAŁOŚCIOWA WIERTEŁ CHIRURGICZNYCH Z WYKORZYSTANIEM METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH

M.BASIAGA\*, Z.PASZENDA

INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLSKA \*MAILTO: MARCIN.BASIAGA@POLSL.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 93-97]

#### Wprowadzenie

Wiertła stosowane w chirurgii kostnej są grupą narzędzi chirurgicznych, których zastosowanie zostało wymuszone przez rozwój technik osteosyntezy. Różnorodność stosowanych technik operacyjnych oraz tendencje do uproszczenia samego zabiegu, zaowocowały pojawieniem się wielu odmian wierteł (np. z ostrzem wprowadzającym, kaniulowane). W odróżnieniu od stosowanych w obróbce skrawaniem wiertła chirurgiczne posiadają inną geometrię ostrza. Wynika to z odmiennych własności mechanicznych materiału poddawanego obróbce (tkanka kostna) [1,2].

## STRENGTH ANALYSIS OF SURGICAL DRILLS BY MEANS OF FINITE ELEMENT METHOD

#### M.BASIAGA\*, Z.PASZENDA

INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 18 KONARSKIEGO STREET, 44-100 GLIWICE, POLAND \*MAILTO: MARCIN.BASIAGA@POLSL.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 93-97]

#### Introduction

Application of drills in bone surgery was forced by development of osteosynthesis methods. Diversity of operation procedures, need of custom design tools and tendencies to simplify operations, bore fruit in variety of drills. Besides standard surgical drills there are also available special design drills (for example drills with guide end and cannulated). As opposed to drills applied in machining, surgical drills have different geometry. This results from different mechanical properties of treated material (bone tissue) [1,2].

Immense demand on surgical instrumentarium causes efforts in development of its working life. Biomechanical



RYS.1. Model geometryczny: a) wiertła chirurgicznego, b) kości udowej. FIG.1. Geometrical model: a) surgical drill, b) femur.

Duże zapotrzebowanie na chirurgiczne instrumentarium zabiegowe sprawia, że podejmowane są próby poprawy jego trwałości. W literaturze niewiele miejsca poświęca się tym zagadnieniom. Dotyczy to również zagadnień biomechaniki tej grupy narzędzi związanej z analizą stanu odkształceń i naprężeń z uwzględnieniem ich funkcjonalnego przeznaczenia. Tego rodzaju analiza stanowi podstawę do optymalizacji cech geometrycznych oraz doboru własności mechanicznych materiału metalowego. W większości prac prezentowane są głównie zagadnienia dotyczące rozkładu temperatury w warunkach symulujących proces wiercenia [3–5]. Z tego względu w niniejszej pracy przeprowadzono analizę wytrzymałościową z wykorzystaniem metody elementów skończonych wytypowanej postaci wiertła chirurgicznego.

#### Metodyka badań

W pracy analizie poddano wiertło proste z chwytem walcowym o zróżnicowanej geometrii. Zmienną wielkością geometryczną była średnica wiertła (d<sub>1</sub>=1,0mm, d<sub>2</sub>=4.5mm d<sub>3</sub>=9,0mm) oraz jego kąt wierzchołkowy ( $2\kappa_1$ =90° i  $2\kappa_2$ =120°). Długość całkowita i robocza wiertła była stała i wynosiła odpowiednio L=150mm i I=60mm. Dodatkowo w pracy opracowano model geometryczny kości udowej, w którym zasymulowano otwór odpowiadający średnicy wiertła i odzwierciedlający geometrię jego ostrza – RYS.1.

W dalszej kolejności opracowano model geometryczny układu wiertło chirurgiczne - kość udowa uwzględniający dwa warianty procesu wiercenia. Pierwszy wariant odzwierciedlał proces wiercenia w obrębie pojedynczej warstwy tkanki korowej kości udowej. Z kolei II wariant symulował kolejny etap procesu wiercenia w przeciwległym obszarze warstwy tkanki korowej. W tym przypadku wiertło wprowadzono przez uprzednio wykonany otwór – RYS.2.

Dla tak opracowanych modeli geometrycznych wygenerowano siatkę do obliczeń metodą elementów skończonych. Do dyskretyzacji elementów analizowanego układu wykorzystano oprogramowanie ANSYS Workbench v11. Dodatkowo w obszarach modeli, w których przewidywano występowanie maksymalnych wartości odkształceń i naprężeń zagęszczono siatkę elementów skończonych. Dla przeprowadzenia obliczeń niezbędne było określenie i nadanie warunków początkowych oraz brzegowych, które z odpowiednią dokładnością odwzorowywały zjawiska zachodzące w układzie rzeczywistym. Przyjęto następujące założenia [6]:

 wiertło obciążono siłą osiową z zakresu F=20÷100N i zadano prędkość obrotową n=2000obr/min,

• umiejscowienie podpory uniemożliwiało ruch kości w kierunku osi X, Y i Z,

• zasymulowano kontakt wiertła z kością wzdłuż krawędzi skrawających i ścinu oraz na łysinkach w obrębie otworu



RYS.2. Model geometryczny układu wiertło chirurgiczne - kość udowa: a) wariant I, b) wariant II. FIG.2. Geometrical model of surgical drill - femur system: a) variant I, b) variant II.

issues of surgical drills are very limited in the literature. This concerns stress and strain analyses mostly. Those analyses are a basis for geometry optimization as well as for selection of mechanical properties of metallic material. Most of the papers focuses on temperature distribution during bone drilling [3 –5]. For that reason in the present work, an analysis of surgical drill with the use of finite element method was carried out.

#### Material and methods

Drill with a cylindrical shank and of different geometry was analyzed in the work. The variable value geometry was the diameter of drill ( $d_1$ =1,0mm,  $d_2$ =4.5mm,  $d_3$ =9,0mm) and the point angle ( $2\kappa_1$ =90° and  $2\kappa_2$ =120°). The total and working length of drill was state and was equal L=150mm and I= 60mm respectively. Additionally the hole corresponding with diameter of the drill and representing its edge geometry was simulated in the worked out geometrical model of femur – FIG.1.

Furthermore the geometrical model of surgical drill – femur system for two variants of drilling was worked out. The first variant related to the drilling in the single cortical bone of femur. The second variant was simulated the next stage of the process of drilling in the opposite area in the cortical bone. In this case the drill was introduced by the hole made previously – FIG.2.

On the basis of the geometrical models, finite element meshes were generated. Numerical model was prepared in ANSYS Workbench v11. Additionally in zones for which maximum strains and stresses were predicted a concentration of mesh was applied. In order to carry out calculations it was necessary to evaluate and establish initial and boundary conditions which imitate phenomena in real system with appropriate accuracy. The following assumptions were established [6]:

• drill was loaded with forces in the range F=100÷200N and rotational speed n=2000rpm,

• directional (X, Y and Z) immobilization of the bone,

• contact drill with bone was simulated along to the cutting edge and chisel edge and on the drill margin in place of hole made of in cortical bone (variant II).

The scope of the analysis included determination of strains and stresses in working part of surgical drill depending of the applied variants of the drilling. The material properties were as follows:

 $\bullet$  surgical drill (martensitic steel X39Cr13) – E=221 000 MPa, u=0,35,

• femur - E=18600MPa, u=0,33.

#### Results

Results of analysis of strain and stress determination - variant I

Results of strength analysis for three values of drill

wykonanego w warstwie tkanki korowej (wariant II).

Zakres przeprowadzonej analizy obejmował wyznaczenie stanu odkształceń i naprężeń w poszczególnych obszarach wiertła chirurgicznego w zależności od zastosowanego wariantu procesu wiercenia. Dla potrzeb analizy przyjęto następujące dane materiałowe:

- wiertła chirurgicznego (stal martenzytyczna X39Cr13)
   E=221 000MPa, υ=0,35,
- tkanka korowa kości udowej E=18600MPa, u=0,33.

#### Wyniki badań

#### Wyniki analizy stanu odkształceń i naprężeń zredukowanych - wariant l

Wyniki analizy wytrzymałościowej dla trzech analizowanych wartości średnic wiertła o zróżnicowanej geometrii ostrza ( $2\kappa_1$ =90° i  $2\kappa_2$ =120°) dla wytypowanych wartości obciążeń F zestawiono w TABELI 1. Analiza uzyskanych wyników wskazuje na zróżnicowany rozkład wartości odkształceń i naprężeń zredukowanych w części roboczej narzędzia. Stwierdzono, że niezależnie od wartości średnicy d analizowanego wiertła i wartości obciążenia F maksymalne wartości odkształceń i naprężeń występują w narzędziach o kącie wierzchołkowym  $2\kappa_2$ =120°. Spośród wszystkich analizowanych wariantów obliczeń największe wartości odkształceń i naprężeń zredukowanych występowały w przypadku wiertła diameter and different geometry of the edge  $(2\kappa_1=90^\circ$  and  $2\kappa_2=120^\circ)$  as well as load values F are presented in TABLE 1. Results of the analysis indicate diverse values of strains and stresses in the working part of the tool. Independently of the drill diameter d and load values F the maximum values of strains and stresses were observed in tools for

		Odk	ształc	enia	Napr	enia z	redu-	
		zreo	lukow	ane	kowane			
ła dril	Ś		Strain			Stress		
ert 1e (	je je	, in the second s	<sub>nax</sub> , [%	5]	m	<sub>ax</sub> , [MF	Pa]	
wi of	sho anç [º]	Siła	a / Fo	rce	Si	a / For	се	
er ca In	erzo nt 2k,		F, [N]		F, [N]			
redni Diamete d	K t wie Poii	20	60	100	20	60	100	
1.0	90	0,29	0,88	1,46	459	1375	2281	
1,0	120	0,29	0,89	1,49	650	1952	3253	
4.5	90	0,03	0,11	0,19	86	256	427	
4,5	120	0,06	0,22	0,39	132	396	482	
90	90	0,01	0,10	0,17	49	146	244	
3,0	120	0,04	0,15	0,25	85	258	431	

TABELA 1. Wyniki analizy numerycznej - wariant I. TABLE 1. Results of numerical analysis - variant I.



RYS.3. Wyniki analizy stanu naprężeń zredukowanych w wiertle o kącie wierzchołkowym  $2\kappa_2=120^\circ$  przy obciążeniu F=100N dla: a) d<sub>1</sub>=1,0mm, b) d<sub>2</sub>=4.5mm, c) d<sub>3</sub>=9,0mm.

FIG.3. Results of analysis determination of stress in drill for point angle  $2\kappa_2=120^\circ$  loaded with the force F=100N for: a) d<sub>1</sub>=1,0mm, b) d<sub>2</sub>=4.5mm, c) d<sub>3</sub>=9,0mm



RYS.4. Wyniki analizy stanu naprężeń zredukowanych w wiertle o kącie wierzchołkowym  $2\kappa_2=120^\circ$  przy obciążeniu F=100N dla: a) d<sub>1</sub>=1,0mm, b) d<sub>2</sub>=4.5mm, c) d<sub>3</sub>=9,0mm FIG.4. Results of analysis determination of stress in drill for point angle  $2\kappa_2=120^\circ$  loaded with the force F=100N for: a) d<sub>1</sub>=1,0mm, b) d<sub>2</sub>=4.5mm, c) d<sub>3</sub>=9,0mm.

o średnicy d<sub>1</sub>=1,0mm i kącie  $2\kappa_2$ =120° na krawędziach tnących w obszarze ścinu przy maksymalnym obciążeniu siłą F=100N. Wartości te wynosiły odpowiednio  $\epsilon_{max}$ =1,49% i  $\sigma_{max}$ =3253MPa – TABELA 1, RYS. 3.

#### Wyniki analizy stanu odkształceń i naprężeń zredukowanych - wariant II

Wyniki analizy wytrzymałościowej dla trzech wartości średnic wiertła o zróżnicowanej geometrii ostrza  $(2\kappa_1=90^\circ)$ i  $2\kappa_2=120^\circ)$  i wytypowanych wartości obciążeń F zestawiono w TABELI 2. W tej części pracy skoncentrowano się głównie na analizie wytrzymałościowej części wiertła w obszarze kontaktu łysinki w zamodelowanym otworze w tkance korowej – RYS 2b. Wyniki przeprowadzonych obliczeń wskazują na zróżnicowany rozkład wartości odkształceń i naprężeń w tej części wiertła. Spośród wszystkich analizowanych wariantów obliczeń naj-

większe wartości odkształceń i naprężeń zredukowanych występowały w wiertle o średnicy d<sub>1</sub>=1,0mm i kącie  $2\kappa_2$ =120° przy obciążeniu siłą F=100N w części narzędzia kontaktującego się z uprzednio zamodelowanym otworem w kości udowej. Wartości te wynosiły odpowiednio  $\epsilon_{max}$ =1,27% i  $\sigma_{max}$ =795MPa – TABELA 2, RYS.4.

#### Podsumowanie

W pracy przeprowadzono analizę wytrzymałościową wiertła chirurgicznego w warunkach symulujących proces wiercenia w kości. Analizę przeprowadzono dla dwóch wariantów procesu wiercenia. Wariant I przeprowadzonej analizy, obejmujący proces wiercenia w obrębie pojedynczej warstwy tkanki korowej kości udowej, miał na celu określenie prawidłowej wartości kąta wierzchołkowego 2κ. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że niezależnie od analizowanej średnicy wiertła d i wartości obciążenia F największe wartości odkształceń i naprężeń zredukowanych występują dla kąta wierzchołkowego 2k2=120° - TABELA 1, RYS.3. Zatem korzystniejszym rozwiązaniem jest stosowanie wierteł o kącie wierzchołkowym 2k1=90°. Mniejsze wartości odkształceń i naprężeń występujące w tym przypadku mogą decydować o poprawie trwałości użytkowej wierteł chirurgicznych. Ponadto stwierdzono, że maksymalne wartości naprężeń zredukowanych w wiertle o średnicy d<sub>1</sub>=1,0mm dla obydwu wartości kąta 2κ przy obciążeniu siłą F>20N przekraczają wartość granicy plastyczności materiału metalowego stosowanego do wytwarzania tej postaci narzędzi (R<sub>n0.2</sub>=650MPa). Zatem konsekwencją stosowania większych obciążeń w procesie wiercenia z wykorzystaniem tej postaci wiertła może być jego zniszczenie.

Kolejny etap pracy (wariant II), z uwagi na występujące przypadki łamania się wierteł w obszarze pierwszej warstwy tkanki korowej kości, miał na celu wyznaczenie rozkładu odkształceń i naprężeń w części narzędzia kontaktującej się z uprzednio zamodelowanym otworem w kości – RYS.2b. Spośród wszystkich analizowanych wariantów obliczeń największe wartości odkształceń i naprężeń zredukowanych dla obydwu wartości kąta 2k występowały w przypadku wiertła o średnicy d<sub>1</sub>=1,0mm przy obciążeniu siłą F=100N w obszarze znajdującym się powyżej warstwy korowej kości udowej – TABELA 2, RYS.4. Dla wyznaczonego w wariancie I dopuszczalnego obciążenia F=20N wierteł o średnicy d<sub>1</sub>=1,0mm maksymalne wartości naprężeń



TABELA 2. Wyniki analizy numerycznej-wariant II. TABLE 2. Results of numerical analysis-variant II. point angle  $2\kappa_2=120^\circ$ . The maximum values of strains and stresses were observed in drill for diameter d<sub>1</sub>=1,0mm and point angle  $2\kappa_2=120^\circ$ in cutting edge, nearly to chisel edge for maximum loaded with the force F=100N for every variants of calculations. The values were equal to  $\varepsilon_{max}=149\%$  and  $\sigma_{max}=3253MPa$  respectively – TAB.1, FIG.3.

#### Results of analysis of strain and stress determination - variant II

Results of strength analysis for three values of drill diameter and dif-

ferent geometry of the edge  $(2\kappa_1=90^{\circ} \text{ and } 2\kappa_2=120^{\circ})$  as well as load values F are presented in TABLE 2. In this part of the work one has been concentrated mainly on the strength analysis of the part of drill in the area of drill margin contact in the simulated hole of cortical bone - FIG.2b. Results of the analysis indicate different values of strains and stresses in the this part of the tool. The maximum values of strains and stresses were observed in drill for diameter d<sub>1</sub>=1,0mm and point angle  $2\kappa_2=120^{\circ}$  loaded with the force F=100N in part of tool being in the contact with the hole simulated previously in the femur. The values were equal to  $\varepsilon_{max}=1,27\%$ and  $\sigma_{max}=795$ MPa respectively – TAB.2, FIG.4.

#### Conclusions

The work presents results of the strength analysis of a surgical drill during bone drilling. The analysis for two variants of drilling was carried out. The aim of the first variant of the analysis concerning the drilling in the single cortical bone of femur was to determine the correct values of point angle 2k. On the basis of the analysis it was affirmed that independently of the drill diameter d and load values F the maximum values of strains and stresses were observed in tools for point angle  $2\kappa_2$ =120 - TAB.1, FIG.3. The best resolution is applied of the drill for point angle  $2\kappa_1 = 90^\circ$ . The lower values of strains and stresses can decide about the improvement of usage durability of surgical drills. Additionally it was affirmed that maximum values of the stresses in drill for diameter d<sub>1</sub>=1,0mm for both values of point angle 2k loaded with the force F>20N, exceed the yield point of the metallic material of the tool (Rp0.2=650MPa). So the consequence of the use of higher loading in the drilling process with this type of drill can be its destruction.

The next stage of the work (variant II), due to often cases breaking of drills in the area of first layer of cortical bone was to determine the strains and stresses distribution in the part of tool being in the contact with the hole simulated previously in the bone – FIG.2b. The maximum values of strains and stresses for both values of point angle 2 $\kappa$  were observed in drill for diameter d<sub>1</sub>=1,0mm loaded with the force F=100N in place localized above the cortical bone for every variants of calculations – TAB.2, FIG.4. For the maximum loading F=20N of drills d<sub>1</sub>=1,0mm determined in variant I the maximum values of the stresses were equal to  $\sigma_{max}$ =156MPa (for point angle

wynoszą odpowiednio  $\sigma_{max}$ =156MPa (dla kąta  $2\kappa_1$ =90°) i  $\sigma_{max}$ =159MPa (dla kąta  $2\kappa_2$ =120°). Zatem przy zachowaniu w procesie wiercenia dopuszczalnego obciążenia (F=20N) z wykorzystaniem tej postaci wiertła nie występuje ryzyko jego niszczenia.

#### Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2011 jako projekt badawczy.

# $2\kappa_1=90^\circ$ ) and to $\sigma_{max}=159$ MPa (for point angle $2\kappa_2=120^\circ$ ) respectively. So for these types of the drills the permissible loading limit (F=20N) doesn't cause the risk of tool damage.

#### Acknowledgement

The work was supported by scientific founds in 2009 – 2011 as a research grant.

#### Piśmiennictwo

[1] S. Karmani, F. Lam, The design and function of surgical drills and K-wires, Current Orthopaedics, vol. 18, no. 6, 2004, pp. 484-490. [2] Ming-Dar Tsai, Ming-Shium Hsieh, Chiung-Hsin Tsai, Bone drilling haptic interaction for orthopedic surgical simulator, Computers in Biology and Medicine 37, 2007, pp. 1709-1718.

[3] Hillery M., Shuaib I.: Temperature effects in the drilling of human and bovine bone. Journal of Materials Processing Technology 92-93, 1999, pp. 302-308.

#### References

[4] Udiljak T., Ciglar D, Skoric S.: Investigation into bone drilling and thermal bone necrosis. Advances in Production Engineering&Management 2, 2007, pp.103-112.

[5] Bachus K., Rondina M., Huntchinson D.: The effects of drilling force on cortical temperatures and their duration: an in vitro study. Medical Engineering & Physics 22, 2000, pp. 685–691.
[6] Chacon, Guillermo E., Daniel L., Peter E., Edwin A., Beck F.:

[6] Chacon, Guillermo E., Daniel L., Peter E., Edwin A., Beck F.: Heat Production by 3 Implant Drill Systems After Repeated Drilling and Sterilization. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 64, 2, February 2006, pp. 265-269.
# POZAUSTROJOWE BADANIA NAD TOKSYCZNYM ODDZIAŁYWANIEM KOPOLIMERU PLGA Z DODAT-KIEM HYDROKSYAPATYTU NA LUDZKIE OSTEOBLASTY LINII hFOB 1.19

Magdalena Cieślik<sup>1</sup>, Anna Mertas<sup>2</sup>, Anna Morawska-chochół<sup>3</sup>, Rajmund Orlicki<sup>1</sup>, Aleksander Owczarek<sup>4</sup>, Wojciech Król<sup>2</sup>

 <sup>1</sup> Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katedra i Zakład Materiałoznawstwa Stomatologicznego w Bytomiu,
 <sup>2</sup> Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii w Zabrzu,
 <sup>3</sup> AGH, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, katedra Biomateriałów, Kraków
 <sup>4</sup> Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach Zakład Statystyki w Sosnowcu,

#### Streszczenie

W celu biologicznej oceny w warunkach in vitro kopolimeru glikolidu z laktydem z dodatkiem hydroksyapatytu (PLGA+HA) dokonano oceny stopnia jego cytotoksyczności względem ludzkich osteoblastów linii hFOB 1.19. Wykonano pomiar aktywności dehydrognazy mitochondrialnej (test MTT) oraz dehydrogenazy mieczanowej (test LDH) po 24 i 48 godzinach kontaktu komórek z ekstraktem uzyskanym poprzez 8-dniową inkubację kompozytu w medium do hodowli osteoblastów. Kontaktowano ponadto badany materiał bezpośrednio z komórkami kościotwórczymi, a stopień cytotoksyczności oceniano po 24, 48 i 72 godzinach stosując w tym celu test LDH. W obu metodach badany materiał nie wpływał w sposób toksyczny na ludzkie osteoblasty.

Słowa kluczowe: kompozyt, kopolimer glikolidu z laktydem, hydroksyapatyt, cytotoksyczność, test MTT, test LDH, osteoblasty ludzkie, badania in vitro [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 98-102]

# Wprowadzenie

Jednym z podstawowych badań określających przydatność biologiczną nowego biomateriału jest ocena jego stopnia toksyczności wobec komórek znajdujących się w tkance, z którą ma on bezpośredni kontakt. Stosowanie opracowanych w tym celu testów cytotoksyczności pozwala na ocenę poziomu substancji potencjalnie szkodliwych dla organizmu ludzkiego [1-5]. Wykorzystuje się w tym celu linie komórkowe czy też hodowle pierwotne różnego typu komórek. W trakcie badań pozaustrojowych ocenia się ich aktywność komórkową i zachodzące w nich zmiany morfologiczne. Wyznacza się między innymi takie parametry jak przeżywalność komórkową, tempo i jakość różnicowania się czy proliferacji komórek, a także zdolność ich adhezji do podłoża. Konieczność tego typu badań wymuszają liczne czynniki natury fizyko-chemicznej, technologicznej czy biologicznej związane z badanym biomateriałem, które wpływają w sposób istotny na ostateczną odpowiedź komórkową [6-9]. W przypadku kopolimerów glikolidu z laktydem różnice w zachowaniu się komórek uzależnione są w głównej mierze od sposobu syntezy i przetwórstwa tegoż biomateriału, rodzaju modyfikującej go fazy, charakterystyki powierzchni, struktury

# IN VITRO EXAMINATIONS OF TOXIC INFLUENCE OF PLGA CO-POLYMER MIXED WITH HYDROXYAPATITE UPON HUMAN OSTEOBLASTS LINE hFOB 1.19

Magdalena Cieślik<sup>1</sup>, Anna Mertas<sup>2</sup>, Anna Morawska-chochół<sup>3</sup>, Rajmund Orlicki<sup>1</sup>, Aleksander Owczarek<sup>4</sup>, Wojciech Król<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE, CHAIR AND DEPART-MENT OF STOMATOLOGICAL MATERIAL SCIENCE, BYTOM, POLAND <sup>2</sup>MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE, CHAIR AND DEPART-MENT OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, ZABRZE, POLAND <sup>3</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, CRACOW, POLAND <sup>4</sup>MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE, DIVISION OF STATISTICS, SOSNOWIEC, POLAND

# Abstract

In order to evaluate lactide-glycolide co-polymer with admixture of hydroxyapatite (PLGA+HA) from biological point of view in vitro conditions, its level of toxicity for human osteoblasts line hFOB 1.19 was assessed. The activity of mitochondrial dehydrogenase and lactate dehydrogenase was measured (MTT test and LDH test respectively) after 24 and 48 hours of the cells' contact with the extract obtained through 8-day incubation of the composite in osteoblasts cultivation medium. Apart from that the material examined was contacted with bone-forming cells and its degree of toxicity was assessed after 24, 48 and 72 hours using LDH test. In both methods the material under examination did not have any toxic influence upon human osteoblasts.

*Key words:* composite, lactide-glycolide co-polymer, hydroxyapatite, cytotoxicity, MTT test, LDH test, human osteoblasts, in vitro examinations

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009),98-102]

# Introduction

One of the basic examinations assessing the biological suitability of a new biomaterial is the assessment of its toxicity for the cells of the tissue it is contacted with. Using the appropriate cytotoxicity tests allows for the evaluation of the level of substances which may be harmful for the human body [1-5]. In order to do this, cell lines or primary cultivations of different types of cells are used. In extracorporeal examinations their cellular activity is evaluated, as well as morphological changes taking place in them. Such parameters as cell survival, the rate and the quality of cell diversification or proliferation, as well as their ability to adhere to the ground. These kinds of examinations are necessitated by different factors of physicochemical, technological or biological nature; they influence significantly the cells' final response [6-9]. In the case of lactide-glycolide co-polymers, the differences in cell behavior mainly depend on the synthesis method and processing method of this biomaterial, the kind of modifying phase, the characteristics of the surface, dimensional structure and the degree of porosity or resorption tendency. Besides, the kind of cells contacted, their origin, sowing method and density or the passage after przestrzennej, a także stopnia porowatości czy skłonności do resorpcji. Bardzo ważne znaczenie ma ponadto rodzaj kontaktowanych z materiałem komórek, ich pochodzenie, sposób i gęstość posiewu czy pasaż, po którym zostały użyte do badań [10-13].

Duże zainteresowanie, jakim cieszy się w obszarze nauk biomedycznych, bioresorbowalny kopolimer glikolidu z laktydem (PLGA) ma odzwierciedlenie w licznych opracowaniach naukowych potwierdzających możliwość jego stosowania w takich specjalnościach medycyny jak inżynieria tkankowa i genetyczna, farmakologia, chirurgia czy stomatologia [14-18]. Kopolimer ten łączy się często z różnego rodzaju napełniaczami pochodzenia naturalnego czy syntetycznego, które wpływają między innymi na charakterystykę mechaniczną kompozytu, odpowiedź komórkową i proces jego degradacji [19,20]. Wyjątkowy wpływ na końcowe właściwości kompozytu mają napełniacze ceramiczne oparte o fosforany wapnia (hydroksyapatyt, fosforan trójwapniowy) czy bioszkło [21-23]. Wpływają one bowiem w sposób istotny na aktywność biologiczną powstałego z ich udziałem kompozytu co ma odzwierciedlenie w ich lepszej integracji z żywa tkanka [24,25].

W niniejszej pracy postawiono sobie za cel ocenę stopnia cytotoksyczności kompozytu złożonego z kopolimeru glikolidu z laktydem oraz hydroksyapatytu (PLGA+HA) w kontakcie z ludzkimi komórkami kościotwórczymi linii hFOB 1.19.

#### Materiał i metody

Materiałem badawczym w pracy był kopolimer glikolidu i L-laktydu (PLGA: 82% L-laktydu, 18% glikolidu), który został pozyskany z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu. Syntezę przeprowadzono na drodze otwarcia pierścienia z użyciem nietoksycznego inicjatora - acetyloacetonianu cyrkonu [26]. Kopolimer charakteryzował się średnim ciężarem cząsteczkowy Mn=75kDa oraz współczynnikiem polidyspersji Mn/Mw=2,1. Kompozyt PLGA+HA sporządzono przez dodanie do kopolimeru 15 wt% nanocząsteczek hydroksyapatytu (HA) pochodzenia naturalnego z kości wołowej [27].

Do badań in vitro użyto krążków o średnicy 16mm i grubości 1mm wyciętych z błonek otrzymanych metodą wylewania z roztworu CH2Cl2 kompozytu na szalki. W celu poprawy homogeniczności PLGA+HA przed dodaniem nanocząsteczek hydroksyapatytu do rozpuszczonego w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kopolimeru zwilżano je wcześniej w tym samym roztworze. Połączenie obu składników nastąpiło poprzez mieszanie na mieszadle magnetycznym oraz rozbijanie ultradźwiękami. Całość prowadzona była w temperaturze pokojowej.

Do badań in vitro oceniających cytotoksyczność badanego kompozytu użyto ludzkich osteoblastów linii hFOB 1.19 zakupionych w American Type Culture Collection – ATCC (Manassas, VA, USA), numer katalogowy CRL-11372. Badania przeprowadzono zgodnie z zaleceniami normy PN-EN ISO 10993-5 [3].

Część doświadczalną pracy przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrzu. Hodowlę komórek prowadzono w plastikowych butelkach o pojemności 50 ml (Nunc A/S Roskilde, Dania). Jako medium hodowlane stosowano podłoże Dulbecco's Modified Eagle's Medium oraz podłoże Ham's F12 połączone w proporcji 1:1 (bez czerwieni fenolowej i antybiotyków) z dodatkiem 2,5mM L-glutaminy oraz 0,3mg/ ml G418 Sulphate i 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS) inaktywowanej termicznie. Komórki hodowano w sposób ciągły w temperaturze 34°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Komórki which they were used for the examination [10-13].

The significant amount of interest in bioresorbable lactide-glycolide co-polymer (PLGA) in biomedical sciences is reflected in numerous scientific works which confirm the fact that the material can be used in such medical specializations as tissue engineering, genetic engineering, pharmacology, surgery or stomatology [14-18]. This co-polymer is often combined with different kinds of fillers of natural or synthetic origin, which have an influence upon, among others, the mechanical characteristics of the composite, the cell response and the process of its degradation [19, 20]. Ceramic fillers based on calcium phosphate (hydroxyapatite, tricalcium phosphate) or bio-glass have an exceptional influence on the properties of the composite [21-23]. They have a vital effect on the biological activity of the composite created with their participation, which is reflected by their better integration with living tissue [24,25].

The aim of this work is to assess the degree of cytotoxicity of the composite consisting of lactide-glycolide composite and hydroxyapatite (PLGA+HA) in contact with human bone-forming cells hFOB 1.19 line.

#### Material and methods

The material examined in the research was L-lactideglycolide co-polymer (PLGA: 82% of L-lactide and 18% of glycolide) which was obtained at the Polymer and Carbon Materials Centre of the Polish Science Institute in Zabrze. The synthesis was performed by opening the ring using a non-toxic initiator - zirconium acetylacetonate [26]. The copolymer had a medium molecular weight Mn=75kDa and the polydispersion coefficient Mn/Mw=2.1. PLGA+HA composite was obtained through adding 15wt% of nanoparticles of hydroxyapatite (HA) of natural origin (from bovine bone) to the co-polymer [27].

To perform in vitro examinations discs of 16mm diameter and 1mm thickness were used; they were cut from membranes obtained by pouring the composite on bowls from  $CH_2Cl_2$  solution. In order to improve PLGA+HA homogeneity, before adding hydroxyapatite nanoparticles to the co-polymer dissolved in  $CH_2Cl_2$ , they were moisture in the same solution. Both ingredients were blended by mixing them on a magnetic mixer and breaking them with the use of ultrasound. The whole procedure was performed in room temperature.

To perform in vitro examinations assessing cytotoxicity of the examined composite human osteoblasts hFOB 1.19 line were used. They were purchased in American Type Culture Collection – ATCC (Manassas, VA, USA), catalogue number CRL-11372. The examinations were performed in accordance with the regulations of the PN-EN ISO 10993-5 norm [3].

The experimental part of the research was performed at the Chair and Department of Microbiology and Immunology of the Medical University of Silesia in Zabrze. The cells were cultured in plastic 50ml bottles (Nunc A/S Roskilde). Dulbecco's Modified Eagle's Medium was used together with Ham's F12 in proportion 1:1 (without phenol red and antibiotics) with the addition of 2,5mM L-glutamine, 0,3mg/ml G418 Sulphate and 10% foetal bovine serum (FBS) inactivated thermally. The cells were cultured in a continuous manner at a temperature of 34°C, air containing 5% CO<sub>2</sub>, and 100% relative humidity. The cells used in the research were after 6 passages, which guaranteed their stability and a constant rate of proliferation.

The assessment of cytotoxicity level of the biomaterial assessed was done using two method. The first method used its extract obtained by 8-day incubation of the samples

wykorzystane do badań były po 6 pasażu, co gwarantowało
ich stabilność i stałe tempo proliferacji.

Oceny stopnia cytotoksyczności badanego biomateriału dokonano dwoma metodami. W I metodzie wykorzystano jego ekstrakt uzyskany poprzez 8-dniową inkubację próbek badanego biomateriału umieszczonych na dnie dołków 24dołkowej płytki do hodowli komórek (Nunc A/S Roskilde, Dania) w 2ml medium hodowlanego o składzie identycznym jak medium do hodowli osteoblastów. Próbki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Następnie objętość 0,2ml uzyskanego w ten sposób ekstraktu oraz jego kolejnych rozcieńczeń w medium hodowlanym (rozcieńczenia w postępie geometrycznym od 1:2 do 1:128) dozowano do osteoblastów hFOB 1.19 zaadherowanych do dna dołków 96-dołkowej płytki do hodowli komórkowych. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Czas inkubacji dla dwóch równolegle prowadzonych eksperymentów wynosił: 24 godziny oraz 48 godzin. Ocenę cytotoksycznego działania kompozytu PLGA+HA na ludzkie osteoblasty dokonano poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT) oraz dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) wykonując każde z oznaczeń w trzech niezależnych powtórzeniach [1,2]

Przeprowadzając badania II etapu na dnie dołków 4-dołkowej płytki do hodowli komórek z 1ml medium hodowlanego umieszczano próbki badanego materiałów, a następnie kontaktowano je z jednowarstwową hodowlą osteoblastów. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Czas inkubacji wynosił 24, 48 i 72 godziny. Ocenę cytotoksycznego działania kompozytu na ludzkie osteoblasty dokonano poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) wykonując każde z oznaczeń w trzech niezależnych powtórzeniach [1].

#### Aktywność Dehydrogenazy Mleczanowej (Test LDH)

Dehydrogenaza mleczanowa uwalniana jest z cytoplazmy do medium hodowlanego w wyniku uszkodzenia błony komórkowej i lizy komórek. Wzrost aktywności LDH w supernatantach hodowli komórkowych koreluje z odsetkiem martwych komórek i jest proporcjonalny do stężenia formazanu powstałego przez redukcję soli tetrazolowej. W teście cytotoksyczności (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy) oznaczenia wykonano w 96 dołkowych płytkach według procedury podanej przez producenta [1]. Procent cytotoksyczności CT [%] obliczano według wzoru (1) – I etap, oraz wzoru (2) – II etap, do których wstawiano wartości poszczególnych absorbancji po uprzednim odjęciu wartości Amedium (absorbancja medium hodowlanego):



gdzie A<sub>b</sub> – absorbancja próbki badanej, A<sub>wk</sub> – absorbancja kontroli wysokiej, czyli wartość całkowitego uwolnienia LDH (maksymalne uwolnienie LDH po dodaniu do hodowli komórek 1% roztworu Tritonu X-100), A<sub>nk</sub>–absorbancja kontroli niskiej, czyli wartość spontanicznego uwolnienia LDH (spontaniczne uwalnianie LDH podczas hodowli komórek natywnych), A<sub>ekstr</sub>–absorbancja kontroli badanego ekstraktu.

# Aktywność Dehydrogenazy Mitochondrialnej (Test MTT)

of the examined material placed at the bottoms of the pits of a 24-pit cell cultivation plate (Nunc A/S Roskilde, Denmark) in 2ml of cultivation medium whose composition was identical as that of osteoblasts cultivation medium. The samples were incubated at 37°C temperature, the air containing 5% of CO<sub>2</sub> and having relative humidity of 100%. Next, 0.2ml of the extract thus obtained and its successive dilutions in the cultivation medium (dilutions in geometric progression from 1:2 to 1:128) were dozed to osteoblasts hFOB 1.19 line adhered to the bottom of the pits of a 96-pit cell cultivation plate. The plates were incubated at the temperature of 37°C, the air containing 5% of CO<sub>2</sub> and having relative humidity of 100%. The incubation time for both simultaneously performed experiments was 24 hours and 48 hours. The assessment of cytotoxic influence of the PLGA+HA composite on human osteoblasts was performed by measuring the activity of mitochondrial dehydrogenase (MTT test) and lactate dehydrogenase (LDH test); each marking was done in three independent repetitions [1,2].

While performing the second stage examinations, the samples of the examined material were placed at the bottom of pits in a 4-pit cell cultivation plate with 1ml of the cultivation medium, and then they were contacted with one-layer osteoblasts culture. The plates were incubated at the temperature of  $37^{\circ}$ C, the air containing 5% of CO<sub>2</sub> and having relative humidity of 100%. The incubation time was 24, 48 and 72 hours. The assessment of cytotoxic influence of the composite upon human osteoblasts was performed by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH test); each marking was done in three independent repetitions [1].

#### LDH (Lactate Dehydrogenase) Release Assay

Lactate dehydrogenase is released from the cytoplasm into the culture medium as a result of damage to the cellular membrane and cellular lysis. Increased LDH activity in the supernatants of cell cultures correlates with the percentage of dead cells. LDH activity was measured using a commercial cytotoxicity assay kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), in which released LDH in culture supernatants is measured with a coupled enzymatic assay, resulting in conversion of a tetrazolium salt into red formazan product. The marking of LDH activity was done in 96-pit plates according to the procedure indicated by the manufacturer [1]. The toxicity percentage CT [%] was calculated according to formula (1) – 1st method and formula (2) – 2nd method, to which the values of particular absorbances were inserted, after having subtracted the values the absorbance values of the culture medium:

$$CT[\%] = \left[\frac{(A_{a} - A_{kbnr}) - A_{ni}}{A_{ai} - A_{ni}}\right] \times 100\%$$
(1)  
$$CT[\%] = \left[\frac{A_{b} - A_{nk}}{A_{nk} - A_{nk}}\right] \times 100\%$$
(2)

where  $A_s$ -absorbance of the examined sample,  $A_{hc}$ -high control absorbance, or the value of the total LDH release (maximum LDH release after adding 1% Triton X-100 solution to cell culture),  $A_{hc}$ -low control absorbance, or the value of spontaneous LDH release (spontaneous LDH release during native cells cultivation),  $A_{extr}$ -absorbance of the extract.

#### MTT (Mitochondrial Dehydrogenase) Activity Assay

After 24- or 48-hour incubation with the studied PLGA extract sample, the cells used in the experiment were rinsed and then the MTT solution was added, thereby obtaining the

Wykorzystane do eksperymentu komórki po 24- lub 48godzinnej inkubacji z badaną próbką ekstraktu PLGA+HA odpłukiwano, a następnie dodawano do nich roztwór MTT uzyskując końcowe stężenie 1,1mM. Hodowlę kontynuowano przez 4 godziny w identycznych warunkach jak poprzednio. Po tym czasie komórki odwirowywano, supernatant zlewano, a do zaadherowanych komórek dodawano DMSO w celu ekstrakcji formazanu MTT z komórek. Supernatant pobierano po 20 minutach i oznaczano jego absorbancję przy długości fali 550nm stosując automatyczny czytnik płytek. Procent cytotoksyczności CT [%] obliczano posługując się wzorem (3), do którego wstawiano wartości poszczególnych absorbancji po uprzednim odjęciu wartości ADMSO (absorbancja DMSO):



gdzie  $A_b$ -absorbancja próbki badanej,  $A_k$ -absorbancja próbki kontrolnej

#### Wyniki

Uzyskane w trakcie obu metod wyniki badań mikrobiologicznych, określających procentową wartość poziomu cytotoksyczności (CT) kompozytu PLGA+HA względem ludzkich osteoblastów linii hFOB 1.19, zawarto w TABELI 1. Wynika z niej, iż zarówno w l jak i II metodzie we wszystkich okresach pomiarów wartość cytotoksyczności badanego materiału kształtowała się w granicach dopuszczalnych norm [3]. Wyższe wartości CT uzyskane w trakcie bezpośredniego kontaktu komórek z kompozytem były prawdopodobnie efektem obecności w materiale aktywnych biologicznie nanocząsteczek hydroksyapatytu. Pobudzały one w większym stopniu stykające się z nimi komórki i tym samym intensywniejsza była ich odpowiedź komórkowa. Zetknięcie komórek z ekstraktem (I metoda) było jedynie pośrednim kontaktem komórek z materiałem, a dokładnie z ewentualnie wydzielonymi przez niego do medium hodowlanego substancjami szkodliwymi czy produktami jego rozkładu.

Zastosowanie dwóch metod oceny stopnia cytotoksyczności badanego materiału względem ludzkich komórek kościotwórczych spowodowało uzyskanie jednocześnie dwóch różnych jego procentowych wartości w tym samym okresie pomiaru. Jest to potwierdzeniem wysuwanych przez autorów prac o podobnej tematyce wniosków, iż na końcową odpowiedź komórkową w kontakcie z zawierającym polimerową osnowę biomateriałem ma wpływ wiele czynników natury chemicznej, fizycznej, technologicznej czy biologicznej [6,7,9,10,13,22]. Szczególne znaczenie final concentration of 1,1mM. The culturing was continued for 4 hours in the same conditions as before. After that time the cells were centrifuged, the supernatant was decanted, and DMSO was added to the adhered cells with a view to extract MTT formazane from the cells. The supernatant was collected after 20 minutes and its absorbance was determined at a wavelength of 550nm implementing an automatic plate reader. The cytotoxicity percentage CT [%] was calculated according to formula (3), where the values of particular absorbances had previously been diminished by subtracting ADMSO (DMSO absorbance):



where  $A_s$ -absorbance of the examined sample,  $A_c$ -absorbance of the control sample.

#### Results

The results of microbiological examination obtained from both methods, which determined the percentage value of cytotoxicity level (CT) of PLGA+HA composite to human osteoblasts hFOB 1.19 line are presented in Table 1. It can be concluded that both in the first and the second method, the value of cytotoxicity of the examined materials was within the allowed norms in all examination periods [3]. Higher CT values obtained during the cells' direct contact with the composite were probably caused by the presence of biologically active nanoparticles of hydroxyapatite in the material. They aroused in a higher degree the cells adjoining them and, what followed, their cell response was more intensive. Contacting the cells with the extract (the first method) brought about only an indirect contact between the cells and the material, and more precisely, with harmful substances produced by the material and emitted to the cultivation medium or the products of its decomposition.

Using two methods to assess the degree of cytotoxicity of the examined material to human bone-forming cells enabled to obtain its two different percentage values simultaneously, in the same examination period. This confirms the assumptions put forward by the authors of works on similar subjects that there are many factors (of chemical, physical, technological or biological nature) which may influence the final response of cells in contact with a biomaterial having a polymer warp [6, 7, 9, 10, 13, 22]. However, the kind and origin of the cells used for the examination, as well as the method of contacting them with the samples of the examined material are of special significance [4, 5, 8, 12, 14, 20].

	CT [%] – I metoda CT [%] - 1 <sup>st</sup> method					CT [%] – II metoda CT [%] – 2 <sup>nd</sup> method					
	Test LDH Test MTT LDH Test MTT Test			Test LDH LDH Test							
Czas: Time:	24 h	48 h	р	24h 48 h p		24 h	48 h	72 h	p <sub>24-48</sub>	p <sub>48-72</sub>	
PLGA+HA	0	0	-	0	1,5±1,3	NS	10,4±1,6	7,0±2,4	0,6±1,0	<0,05	<0,05
Oblicze statystycznych dokonano przy u yciu programu											

Oblicze statystycznych dokonano przy u yciu programu Statistica 8.0.

<sup>•</sup> All calculations were performed using the commercially available statistical package Statistica 8.0.

TABELA 1. Procentowy poziom cytotoksyczności (CT) kompozytu PLGA+HA wobec ludzkich osteoblastów linii hFOB 1.19.

TABLE 1. The percentage level of cytotoxicity (CT) of PLGA+HA to human osteoblasts hFOB 1.19 line.

ma jednak rodzaj i pochodzenie użytych do badań komórek, a także sposób ich kontaktowania z próbkami badanego materiału [4,5,8,12,14,20].

#### Podsumowanie

Przeprowadzone w pracy badania in vitro wykazały, iż kompozyt PLGA+HA jest materiałem biozgodnym. Przeprowadzone testy cytotoksyczności nie wykryły jego toksycznego wpływu na ludzkie osteoblasty linii hFOB 1.19. Udowodniono jednak, iż sposób kontaktowania badanego materiału z osteoblastami ma zasadniczy wpływ na ich końcową odpowiedź komórkową.

# Piśmiennictwo

[1] Cytotoxicity detection kit (LDH). Instruction manual. 5th Version. Roche Applied Science: Germany, 2004.

[2] Cell proliferation kit (MTT). Instruction manual. 3th Version. Roche Applied Science, Germany, 2003.

[3] PN-EN ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices. In vitro cytotoxicity studies, March 2001.

[4] Jahno V.D., Ribeiro G.B., Dos Santos L.A., Ligabue R., Einloft S., Ferreira M.R., Bombonato-Prado K.F. Chemical synthesis and in vitro biocompatibility tests of poly (L-lactic acid). J. Biomed. Mater. Res. A 2007, 83, 209-215.

[5] Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. Biomaterials 1996, 17, 93-102.

[6] Wagner M., Kiapur N., Wiedmann-Al-Ahmad M., Hübner U., Al-Ahmad A., Shön R., Schmelzeisen R., Mülhaupt R., Gellrich N.C. Comparative in vitro study of the cell proliferation of ovine and human osteoblast-like cells on conventionally and rapid prototyping produced scaffolds tailored for application as potential bone replacement material. J. Biomed. Mater. Res. A 2007, 83, 1154-1164.

[7] Bilir A., Aybar B., Tanrikulu S.H., Issever H., Tuna S. Biocompatibility of different barrier membranes in cultures of human CRL 11372 osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. Clin. Oral Implants Res. 2007, 18, 46-52.

[8] Di Toro R., Betti V., Spampinato S. Biocompatibility and integrinmediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-coglycolide) copolymers. Eur. J. Pharm. Sci. 2004, 21, 161-169.

[9] Pamula E., Bacakova L., Filova E., Buczynska J., Dobrzynski P., Noskova L., Grausova L. The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. J. Mater. Sci.Mater.Med. 2008, 19, 425-435.

[10] Graziano A., d'Aquino R., Cusella-De Angelis M.G., De Francesco F., Giordano A., Laino G., Piattelli A., Traini T., De Rosa A., Papaccio G. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. J. Cell. Physiol. 2008, 214, 166-172.

[11] Wei G., Ma P.X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2004, 25, 4749-4757.

[12] Lu H.H., Tang A., Oh S.C., Spalazzi J.P., Dionisio K. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. Biomaterials 2005, 26, 6323-6334.

[13] Vagaska B., Bacakova L., Pamuła E., Lisa V., Dobrzyński, P. Adhesion and growth of human osteoblast-like cells on aliphatic polyesters with different chemical compositions, surface roughness and modification with hydroxyapatite. Eng. Biomater. 2006, 58-56, 4-7.

## Conclusion

The in vitro examinations performed in the research demonstrated that PLGA+HA composite is a biocompatible material. Cytotoxicity tests did not detect its toxic influence on human osteoblasts hFOB 1.19 line. However, it was proved that the method of contacting the examined material with osteoblasts has a vital influence on their final cell response.

#### References

[14] Sosnowski S., Woźniak P., Lewandowska-Szumieł M. Polyester scaffolds with bimodal pore size distribution for tissue engineering. Macromol. Biosci. 2006, 6, 425-434.

[15] Balch O.K., Collier M.A., DeBeault L.E., Johnson L.L. Bioabsorbable suture anchor (co-polymer 85/15 D,L lactide/glycolide) implanted in bone: correlation of physical/mechanical properties, magnetic resonance imaging, and histological response. Arthroscopy 1999, 15, 691-708.

[16] Böstman O., Pihlajamäki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopeadic implants for internal fixation: a review. Biomaterials 2000, 21, 2615-2621.

[17] Kumar M.N.V.R., Bakowsky U., Lehr C.M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. Biomaterials 2004, 25, 1771-1777.

[18] Shi X., Wang Y., Ren L., Gong Y., Wang D.A. Enhancing alendronate release from a novel PLGA/hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications. Pharm. Res. 2009, 26, 422-30.

[19] Chłopek J., Morawska-Chochół A., Bajor G., Adwent M., Cieślik-Bielecka A., Cieślik M., Sabat D. The influence of carbon fibres on the resorption time and mechanical properties of the lactide-glycolide co-polymer. J. Biomater. Sci. Polymer Edn 2007, 18, 1355-1368.

[20] Cieślik M., Mertas A., Morawska-Chochół A., Sabat D., Orlicki R., Owczarek O., Król W., Cieślik T. Int. J. Mol. Sci. 2009, 10, 3224-3234.

[21] Kokubo T., Kim H.M., Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. Biomaterials 2003, 24, 2161-2175.

[22] Boccaccini A.R., Blaker J.J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. Expert Rev. Med. Devic. 2005, 2, 303-317.

[23] Willi P., Chandra P.S. Nanoceramic matrices: biomedical applications. Am. J. Biochem. Biotechnol. 2006, 2, 41-48.

[24] Shi X., Wang Y., Ren L., Gong Y., Wang D.A. Enhancing alendronate release from a novel PLGA/hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications. Pharm. Res. 2009, 26, 422-30.

[25] Nagata F., Miyajima T., Teraoka K., Yokogawa Y. Preparation of porous poly(lactic acid)/hydroxyapatite microspheres intended for injectable bone substitutes. Key Eng. Mater. 2005, 284-286, 819-822.

[26] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H. Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(Acac)4. Macromolecules 2001, 34, 5090-5099.

[27] Haberko K., Bućko M., Haberko M., Mozgawa W., Pyda A., Zarębski J. Natural hydroxyapatite - preparation, properties. Eng. Biomater. 2003, 30-33, 32-38.

• • • • • • • • • • • • • • • • •

# ODPORNOŚĆ KOROZYJ-NA DRUTÓW ZE STALI NIERDZEW-NEJ PRZEZNACZONYCH DLA ORTOPEDII

#### ANNA SZUŁA<sup>1</sup>, JOANNA PRZONDZIONO<sup>1</sup>, WITOLD WALKE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Śląska, Katedra Modelowania Procesów i Inżynierii Medycznej, ul. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice <sup>2</sup>Politechnika Śląska, I NSTYTUT Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, ul. Konarskiego 18a, 44-100 Gliwice

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009),103-105]

#### Wstęp

Współczesną medycynę charakteryzuje ciągły rozwój nowoczesnych technik diagnostycznych oraz metod leczenia. Postęp ten związany jest z intensywnym rozwojem inżynierii materiałowej, która zajmuje się między innymi tworzeniem nowoczesnych materiałów dla medycyny. Jak dotąd najpowszechniej stosowane w medycynie są materiały metalowe. Najczęściej używa się ich jako narzędzi chirurgicznych i osprzętu medycznego, ale przede wszystkim znajdują one szerokie zastosowanie w implantologii, zastępując uszkodzone części tkanek czy kości. Jako implanty dla ortopedii szeroko stosowane są różnego rodzaju druty i wyroby z drutu [1÷4].

Celem niniejszej pracy była ocena odporności na korozję elektrochemiczną drutów o zmodyfikowanej powierzchni wykonanych ze stali nierdzewnej typu Cr-Ni-Mo w gatunku X2CrNiMo 17-12-2, powszechnie stosowanej na implanty, w zależności od umocnienia zadawanego w procesie ciągnienia. Badania realizowano w środowisku imitującym tkankę kostną człowieka [1÷3].

## Materiał i metodyka badań

Ponieważ druty ze stali nierdzewnych mogą być one przeznaczone na gwoździe śródszpikowe, druty do wiązania odłamów kostnych, elementy stabilizatorów zewnętrznych, czy też jako implanty stosowane w stabilizacji kręgosłupa, interesującym zagadnieniem jest ustalenie związku między odkształceniem zadawanym w procesie ciągnienia, a odpornością na korozję elektrochemiczną. Materiałem wyjściowym do badań była przesycona walcówka średnicy 5,5mm wykonana ze stali w gatunku X2CrNiMo 17-12-2. Walcówkę ciągniono do średnicy 1,35mm. Po każdym ciągu odcinano próbki do badań korozyjnych. Próbki drutu różniły się zadanym odkształceniem.

Próbki poddano zabiegowi szlifowania, które realizowano przy użyciu papieru ściernego o granulacji 320, 500, 800. Próbki zostały oczyszczone w płuczce ultradźwiękowej. Następnie przeprowadzono polerowanie elektrochemiczne. Każdą z próbek polerowano w roztworze do polerowania stali w temperaturze 50°C, przez ok. 15min. Natężenie prądu wynosiło 3÷6A. Po procesie polerowania elektrochemicznego próbki ponownie oczyszczono w płuczce ultradźwiękowej. Następnie próbki poddano pasywacji powierzchni w kwasie azotowym w czasie 60min. Metal reagował z kwasem, tworząc powłokę tlenkową, która uniemożliwiała dalszą reakcję. Ocenę odporności na korozję wżerową ciągnionych drutów ze stali Cr-Ni-Mo dokonano przy wyko-

. . . . . . . . . . . .

# CORROSION RESISTANCE OF WIRE MADE OF STAINLESS STEEL FOR ORTHOPAEIDCS

#### ANNA SZUŁA<sup>1</sup>, JOANNA PRZONDZIONO<sup>1</sup>, WITOLD WALKE<sup>2</sup>

 <sup>1</sup>Silesian University of Technology, Department of Process Modelling and Medical Engineering,
 8 Krasińskiego str., 40-019 Katowice, Poland
 <sup>2</sup>Silesian University of Technology, Institute of Engineering Materials and Biomaterials,
 18A Konarskiego str., 44-100 Gliwice, Poland

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 103-105] Introduction

Current medicine is characterised by ongoing development of modern diagnostic techniques and treatment methods. This progress is connected with the intensive development in materials engineering that deals among other things with the creation of modern materials for medicine. So far, the most popular materials used in medicine have been metallic materials. They are used most frequently as surgical tools and medical appliances, but most of all they are widely used in implantology, where they replace damaged parts of tissue or bone. A variety of wire and wire products is used as implants in orthopaedics [1÷4].

The purpose of this research is to evaluate electrochemical corrosion resistance of wire with modified surface, made of stainless steel of Cr-Ni-Mo type, grade X2CrNiMo 17-12-2, widely used in implants, depending on hardening created in the process of drawing. Tests have been carried out in the environment imitating human osseous tissue [1÷3].

## Material and methods

Because stainless steel wires may be used as intraosseous nails, wire for bone fragments binding, elements of external stabilisers or as implants used in spine stabilization, an interesting issue is determination of the relation between strain resulting in drawing process and electrochemical corrosion resistance. Initial material for the tests was supersaturated wire rod with diameter of d<sub>0</sub>=5,5mm, made of steel grade X2CrNiMo 17-12-2. Wire rod was drawn up to the diameter of d<sub>9</sub>=1,35mm. After each drawing samples for corrosive tests were cut off. Wire samples differed in the applied strain.

Samples were grounded, which was executed by means of abrasive paper with granulation of 320, 500, 800. Samples were washed in ultrasound washer. Then they were electrochemically polished. Each sample was polished in solution in the temperature of 50°C, by ca. 15min. Current intensity was 3÷6A. After electrochemical polishing samples were washed in ultrasound washer. Next, samples were passivated in nitric acid for 60min. Metal reacted to the acid, creating a coat that prevented further reaction. Evaluation of pitting corrosion resistance of tested wire made of Cr-Ni-Mo steel was made with the employment of electrochemical tests system VoltaLab® PGP 201 made by Radiometr. Tests carried out in Tyrode solution, simulating human bone tissue, in the temperature of 37±1°C and pH 6,9.

. . . . . . . . . . . .

rzystaniu systemu do badań elektrochemicznych VoltaLab® PGP 201 firmy Radiometr. Badania przeprowadzono w roztworze Tyroda, symulującym tkankę kostną człowieka, w temperaturze 37±1°C i pH 6,9.

TABELA 1. Wyniki badań odporności na korozję wżerową. TABLE 1. Pitting corrosion resistance test results.

Odkształcenie

logarytmiczne

w procesie

ci gnienia ε<sub>c</sub>

Logarithmic strain

in the drawing pro-

0,49

1,21

1,58

1,83

2,02

2,18

2,41

2,67

2,81

Potencjał

korozyjny, E<sub>cor</sub>

potential, E<sub>corr</sub>

Corrosion

[Mv]

+187

+131

+47

+41

-1

-24

-109

-115

-137

-183

Potencjał

przebicia, E<sub>np</sub>,

potential, E<sub>b</sub>

[Mv]

+1200

+1120

+730

+650

+600

+582

+521

+480

+440

+392

Breakdown

Opór

polaryzacyjny, R<sub>r</sub>

resistance

Polarisation

[k cm<sup>2</sup>]

4580

4492

4220

3970

3610

3690

3240

3190

3180

2820

rednica

drutu, d

ter, d

Wire diame-

[mm]

5.5

4,3

3,0

2,5

2.2

2,0

1,85

1,65

1,45

1,35

## Wyniki badań

Wyniki badań elektrochemicznych dla próbek o średnicy 5,5mm (walcówka) – 1,35mm (końcowa średnica drutu po procesie ciągnienia) przeprowadzone w roztworze Tyroda wykazały wpływ umocnienia na odporność korozyjną drutów. Potencjał otwarcia EOCP dla wszystkich badanych próbek ustalał się po 30 minutach.

Średnia wartość potencjału korozyjnego walcówki średnicy d<sub>0</sub>=5,5 mm występuje na poziomie  $E_{kor}$ =+187mV, natomiast średnia wartość potencjału przebicia  $E_b$ =+1200mV. Wartości gęstości prądu korozyjnego oraz oporu polaryzacyjnego wynoszą odpowiednio: i<sub>corr</sub>=0,001µA/cm<sup>2</sup> i R<sub>p</sub>=4580kΩcm<sup>2</sup>. Średnia szybkość korozji dla walcówki wynosi corr=0,01µm/rok.

Średnia wartość potencjału korozyjnego drutu średnicy d<sub>9</sub>=1,35mm wynosi E<sub>kor</sub>=-183mV. Wyznaczona wartość potencjału przebicia wynosi E<sub>b</sub>=+392mV. Średnia gęstość prądu korozyjnego wynosi i<sub>corr</sub>=0,009 $\mu$ A/cm<sup>2</sup>, a opór polaryzacyjny R<sub>p</sub>=2820k $\Omega$ cm<sup>2</sup>. Średnia szybkość korozji drutu wynosi corr.=0,11 $\mu$ m/rok.

Wyniki badań odporności na korozję wżerową drutów elektrolitycznie polerowanych i chemicznie pasywowanych przedstawia TABELA 1.

## Podsumowanie

MATERIALS

ш

Przeprowadzone badania potencjodynamiczne w roztworze Tyroda dostarczyły informacji o odporności korozyjnej pasywowanych drutów wykonanych ze stali nierdzewnej typu Cr-Ni-Mo w gatunku X2CrNiMo17-12-2 o zróżnicowanym umocnieniu. Analiza porównawcza otrzymanych pomiarów wykazała, że zachodzące w procesie ciągnienia umocnienie odkształceniowe materiału ma znaczący wpływ na odporność korozyjną próbek. Najlepszymi właściwościami korozyjnymi charakteryzowała się walcówka średnicy d<sub>0</sub>=5,5mm.

#### Results

Electrochemical tests results for samples with diameter of  $d_0$ =5,5mm (wire rod) –  $d_9$ =1,35mm (final diameter of the wire after drawing process) carried out in Tyrode solution proved the influence of hardening on wire corrosion resistance. Open circuit potential EOCP for all tested samples was established after 30 minutes.

G sto pr du

korozyjnego,

current density,

0,001

0,001

0,002

0,006

0,007

0,007

0,008

0,008

0,008

0,009

i<sub>corr.</sub> Corrosion

[µA/cm<sup>2</sup>]

Szybko

korozji,

[µm/Lear]

0,01

0,02

0,04

0,08

0.08

0,08

0,09

0,09

0,09

0,11

Average value of corrosion potential of wire rod with diameter of d<sub>0</sub>=5,5mm is at the level of E<sub>kor</sub>=+187mV, whereas average value of breakdown potential E<sub>b</sub>=+1200mV. Corrosive current density value and polarisation resistance value are, respectively: i<sub>corr</sub>=0,001µA/cm<sup>2</sup> and R<sub>p</sub>= 4580kΩcm<sup>2</sup>. Average corrosion rate for wire rod is corr.=0,01µm/year.

Average value of corrosion potential of wire rod with diameter d<sub>9</sub>=1,35mm is  $E_{kor}$ =-183mV. Established value of breakdown potential is  $E_b$ =+392mV. Average corrosive current density is i<sub>corr</sub>=0,009µA/cm<sup>2</sup>, and polarisation resistance R<sub>p</sub>=2820kΩcm<sup>2</sup>. Average corrosion rate of the wire is corr.=0,11 µm/year.

Pitting corrosion resistance test results for wire after electrolytic polishing and chemical passivation are shown in TABLE 1.

#### Summary

Potentiodynamic tests carried out in Tyrode solution are the source of information concerning corrosion resistance of passivated wire made of stainless steel of Cr-Ni-Mo type, grade X2CrNiMo17-12-2, with varied hardening. Comparative analysis of obtained test results showed that material strain hardening arising as the result of the drawing process influences samples corrosion resistance to a great extent. Wire rod with diameter of d<sub>0</sub>=5,5mm features the best corrosion properties.

Together with the increase in strain in the process of drawing, decrease in corrosion potential, perforation potential and polarisation resistance were observed. Moreover, increase in corrosive current density and corrosion rate were observed.

Completed tests can be directly applied because they combine technological process of manufacturing of wire Wraz ze wzrostem odkształcenia w procesie ciągnienia zaobserwowano spadek potencjału korozyjnego, potencjału przebicia oraz oporu polaryzacji. Stwierdzono również wzrost gęstości prądu korozyjnego i szybkości korozji.

Zrealizowane prace mają bezpośredni efekt aplikacyjny, ponieważ łączą proces technologiczny wytwarzania drutów dla ortopedii z ich właściwościami korozyjnymi. Ponieważ druty na implanty ortopedyczne powinny charakteryzować się odpowiednimi dla danego zastosowania właściwościami mechanicznymi, a od nich przede wszystkim zależna jest technologia ciągnienia, nie jest możliwe wpływanie na ich odporność korozyjną odkształceniem zadawanym w procesach przeróbki plastycznej na zimno. Stwierdzono, że w każdym przypadku, niezależnie od zachodzącego umocnienia odkształceniowego obserwuje się występowanie wżerów korozyjnych. Świadczy to o niskiej odporności korozyjnej stali austenitycznej na korozję elektrochemiczna w środowisku płynów ustrojowych. Wyniki badań świadczą o konieczności stosowania powłok ochronnych na druty wykonane z chromowo-niklowo-molibdenowej stali odpornej na korozję.

## Piśmiennictwo

[[1.] Kaczmarek W., Walke W., Kajzer W., Chemical composition of passive layers formed on metallic biomaterials, Arch. Mater. Sci. Eng. 5, 2007, pp. 273+276.

[2.] Kajzer W., Krauze A., Walke W., Marciniak J., Corrosion resistance of Cr-Ni-Mo steel in simulated body fluids, J. Achiev. Mater. Manuf. Eng. 1/2, 2006, pp. 115+118.

NANOSTRUKTURALNA WARST-WA TLENKOWA OTRZYMYWANA METODĄ ANODOWANIA NA TYTA-NIE I JEGO STOPIE Z NIOBEM

Elżbieta Krasicka-Cydzik<sup>1\*</sup>, Izabela Głazowska<sup>1</sup>, Agnieszka Kaczmarek<sup>1</sup>, Tomasz Klekiel<sup>1</sup>, Kazimierz Kowalski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI, WYDZIAŁ MECHANICZNY, UL. LICEALNA 9, 65-417 ZIELONA GÓRA <sup>2</sup>AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII METALI I INFORMATYKI PRZEMYSŁOWEJ, KATEDRA INŻYNIERII POWIERZCHNI I ANALIZ MATERIAŁÓW AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND \*MAILTO: E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

#### Streszczenie

W pracy przedstawiono rezultaty zastosowania metody utleniania elektrochemicznego do formowania warstwy nanorurek na tytanie i jego implantowym stopie z niobem Ti6AI7Nb. Celem prowadzonych badań było porównanie efektów anodowania 2 materiałów implantowych, o zróżnicowanym składzie chemicznym i fazowym, a zwłaszcza stwierdzenie, czy metoda ta pozwala na wprowadzenie fosforanów do nanorurkowej warstwy wierzchniej dla stymulacji osteointegracji. Anodowanie prowadzono w 1M roztworze kwasu fosforowego z dodatkiem 0,4%wt. kwasu fluorowodorowego. Porównanie właściwości warstw nanostrukturalnych na tytanie i jego stopie z niobem oparto na analizie obrazów otrzymanych mefor orthopaedics with its corrosion properties. As wire for orthopaedic implants should feature certain mechanical properties typical for certain application, and drawing technology is dependent mostly on those properties, it is not possible to affect its corrosion resistance by means of strain applied in the process of cold metal forming. It has been found that in each case, irrespective of strain hardening that took place, corrosion pits were observed. It proves that austenitic steel has low electrochemical corrosion resistance in the environment of body fluids. It has been found that in each case, irrespective of strain hardening that took place, corrosion pits were observed. It proves that austenitic steel has low electrochemical corrosion resistance in the environment of body fluids. Test results show that wire made of chrome-nickel-molibden steel need to be covered with protective coating.

#### References

[3]. Marciniak J., Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002, s. 68÷315.

[4]. Marciniak J., Perspectives of employing of the metallic biomaterials in the reconstruction surgery. Engineering of Biomaterials 1, 1997, pp. 12÷20.

# NANOSTRUCTURAL OXIDE LAYER FORMED BY ANODIZING ON TITANIUM AND ITS IMPLANT ALLOY WITH NIOBIUM

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK<sup>1\*</sup>, IZABELA GŁAZOWSKA<sup>1</sup>, AGNIESZKA KACZMAREK<sup>1</sup>, TOMASZ KLEKIEL<sup>1</sup>, KAZIMIERZ KOWALSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA,

Faculty of Mechanical Engineering 9 Licealna str., 65-417 Zielona Gora, Poland <sup>2</sup>AGH University of Science and Technology, Faculty of Metal Engineering and Industrial Computer Science, Department of Surface Engineering and Materials Characterization

30 Mickiewicza ave., 30-059 Cracow, Poland \*MAILTO: E.Krasicka@ibem.uz.zgora.pl

## Abstract

In this work the results of studies on the use of electrochemical oxidation method to form layer of nanotubes on titanium and its Ti6AI7Nb alloy are presented. The aim of the studies was to compare the effect of anodising of 2 implant materials of different chemical and phase composition, and to confirm whether the anodising method allows to introduce phosphates into the nanotubes in order to enhance the osteointegration. Anodising wasperformed in 1M  $H_3PO_4$  solution with the addition of 0.4% wt of HF. The comparison of nanotube layers properties was based on the analysis of SEM images and EDS results, as well as on the

todą mikroskopii skaningowej SEM oraz mikroanalizie EDS, a także rezultatach rentgenowskiej analizy spektroskopowej XPS. Podobieństwo i różnice właściwości chemicznych pomiędzy tytanem a niobem znalazło potwierdzenie w morfologii i składzie chemicznym nanorurek powstałych na ich powierzchni, składających się z tlenku tytanu i tlenków metali stopowych tworzących Ti6AI7Nb.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009),105-109]

#### Wprowadzenie

Cienkie warstwy tlenkowe na tytanie i jego implantowych stopach charakteryzują się znakomitą biozgodnością i zdolnością do stymulowania procesów osteointegracji [1]. Jedną z metod ich formowania jest anodowanie. Technologie anodowania charakteryzują się szerokim zakresem parametrów polaryzacji, różnorodnością elektrolitów oraz sposobów przygotowania powierzchni metalu. W efekcie powstają warstwy różniące się szeregiem właściwości, morfologią i topografią, grubością i budową krystaliczną, stechiometrią, właściwościami dielektrycznymi i mechanicznymi [2-3]. Cienka warstwa naturalnego tlenku na tytanie i jego stopach nie spełnia funkcji ochronnych w warunkach eksploatacji w środowisku biologicznym, dlatego powierzchnie tych tworzyw poddaje się dodatkowym obróbkom powierzchniowym w celu poprawy biozgodności z otaczającą tkanką i krwią, biofunkcjonalności i ograniczenia zjawisk metalozy. Utlenianie elektrochemiczne należy do grupy chemicznych metod modyfikacji powierzchni, do których obok chemicznej obróbki w roztworach kwasów i zasad, zaliczyć także można wytwarzanie powłok tlenkowych metodą zol-żel, silanowanie TiO<sub>2</sub>, formowanie samotworzących się warstw (SAMs) oraz warstw nanostrukturalnych [4]. Dwutlenek tytanu, zwłaszcza w postaci nanostrukturalnej, wykazuje szereg interesujących właściwości jak np.: zdolność katalizy i fotokatalizy, konwersja energii słonecznej oraz znajduje zastosowanie jako matryce biosensorów, nośników leków, w enkapsulacji komórek oraz w inżynierii tkankowej [5-7].

W ostatnich latach wiele prac poświęcono uzyskaniu samoorganizujących się nanorurek TiO<sub>2</sub> o wysokim uporządkowaniu porów i kontrolowanych rozmiarach na dużej powierzchni utlenianego materiału [8-12]. Tytan pokryty warstwą nanorurek z tlenku tytanu, podobnie jak tytan pokryty warstwą zwartego tlenku tytanu, powinien stanowić tym lepsze podłoże dla osteoblastów, im bardziej rozwinięta jest powierzchnia oraz im większe wykazuje powinowactwo do kationów, np. wapnia [13].

W pracy podjęto badania nad wytwarzaniem nanorurek na tytanie i stopie tytanu z niobem Ti6Al7Nb w celu porównania efektów anodowania 2 materiałów implantowych o zróżnicowanym składzie chemicznym i fazowym, a także stwierdzenia, czy metoda ta pozwala na wprowadzenie fosforanów do nanorurkowej warstwy wierzchniej dla stymulacji osteointegracji.

# Materiały i metodyka badań

Do badań użyto folię tytanową (99,99% Sigma Aldrich) o wymiarach 10×10×0,1 mm oraz stop tytanu Ti6Al7Nb (Boehler) o zawartoúci 6,01%Al, 6,95%Nb, 0,18%O oraz 0,2% zanieczyszczeń, w postaci krŕýków o wymiarach "17mm × 3mm. Stanowiły one elektrody robocze, natomiast w charakterze elektrody pomocniczej zastosowano folię platynową o wymiarach 20×20×0,1 mm, a jako elektrodę odniesienia, nasyconą elektrodę kalomelową (NEK) z kapilarą Luggin'a. Próbki stopu polerowano do uzyskania powierzchni lustrzanej, odtłuszczano ultradźwiękowo w results of the XPS examination. The similarities and differences between chemical properties of titanium and niobium were confirmed in morphology and chemical composition of nanotubes made of titania and oxides of alloying elements of Ti6Al7Nb.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009),105-109]

#### Introduction

Thin anodic films on titanium and its alloys have superior biocompability and capability to stimulate of osteointegration [1]. Anodising is one of the method to form such layers. Anodizing technologies are characterised by diversity of polarization parameters, electrolytes and surface preparation. The resulting layers differ in various properties, morphology, topography, thickness and steochiometry, dielectric and mechanical properties as well [2-3]. The layer of natural oxides on titanium and its alloys does not fully perform protective functions of use in the biological environment, hence surfaces are subjected to modification. The purpose of the modification may consists in improving resistance to corrosion, biocompatibility with surrounding tissues or blood, biofunctionality, bioactivity, osseoconductivity, resistance to abrasion or limiting the phenomenon of metalosis. Electrochemical oxidation belongs to the group of chemical methods of surface modification, which include also sol-gel techniques, TiO<sub>2</sub> silanisation, self-formation of SAMs layers, and formation of nanostructural layers [4].

Titanium oxide layers on titanium, and in particular nanostructured TiO<sub>2</sub>, manifest numerous interesting properties such as catalytic and photocatalytic properties, solar energy conversion, and is used in the production of biomedical devices, biosensors, drug delivery, cells encapsulation and tissue engineering) [5-7].

Significant progress has been made recently in the application of anodizing as a method of forming nano-structural layers of oxides on metal surfaces. A lot of work has been focused on obtaining self-organizing  $TiO_2$  nanotubes of high level of the organization of pores on large surfaces as well controlling the size as well as arrangement of pores [8-12]. Titanium covered with titania layer, similarly to titanium covered with compact titania, should be the better platform for osteoblasts, the more developed is surface and the higher is its affinity to cations, i.e calcium [13].

The paper focuses on formation of oxide nanotubes on titanium and Ti6AI7Nb titanium and niobium alloy aiming on comparison of the anodizing of 2 implant materials of different chemical and phase composition, and testing the possibility of introduce phosphates into nanotubular surface layer to stimulate the osteointegration.

## Materials and methodology

For the purpose of the research  $10 \times 10 \times 0.1$ mm (99,99% Sigma Aldrich) titanium foil and Ti6Al7Nb (Boehler) titanium alloy with 6,01%Al, 6,95%Nb, 0,18%O, 0,2% impurity in the form Ř17mm×3mm discs were used as working electrodes,  $20 \times 20 \times 0.1$ mm platinum foil was used as counter electrode and SCE with Luggin's capillary as reference electrode. Alloy samples were polished until mirror-like surface was obtained, degreased ultrasonically in isopropyl and methanol, rinsed in redistilled water and dried in the stream of nitrogen [14]. Electrolyte solutions were prepared from analytical-grade reagents and re-distilled water. Formation of oxide layers was conducted in 1-molar solution of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> containing 0,4%wt. HF [15]. For anodizing the AutoLab potentiostat/galvanostat and Ecochemie voltage multiplier were used, controlled by Nova 3 software. Anodizing was



izopropanolu i metanolu, następnie płukano w wodzie dejonizowanej i suszono w strumieniu azotu [14]. Formowanie warstw nanorurek prowadzono w roztworze 1-molowym H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> z dodatkiem 0,4% wag HF [15]. Roztwory elektrolitów przygotowano z odczynników chemicznych cz.d.a. i wody redestylowanej. Do badań użyto potencjostat/galwanostat PGSTAT 302N firmy AutoLab z multiplikatorem Ecochemie, sterowany oprogramowaniem Nova 3. Anodowano metoda potencjostatyczną w temperaturze 25°C przy potencjale 20V utrzymywanym przez 2 godziny. Badania mikroskopowe (SEM) powierzchniowych warstw próbek po anodowaniu wykonano przy użyciu mikroskopu skaningowego typu JSM-5600, Jeol Inc., z mikroanalizatorem rentgenowskim EDS. Badania XPS wykonano za pomocą VSW (Vacuum Systems Workshop, Ltd.) przy ekspozycji próbek na promieniowanie Kα Al (1486.6 eV) o mocy 210 W (15 kV - napięcie, 14 mA – prąd) i prózni > 5×10<sup>-8</sup>mbar. Kalibracji energii wiązania dokonano dla wartości C 1s wynoszącej 284.6eV w wiązaniach C-C i C-H.

## Wyniki badań i dyskusja

Na RYSUNKU 1 przedstawiono obrazy SEM morfologii nanorurek na tytanie. Na powierzchni anodowanego tytanu wytworzono nanorurki o średnicy 100nm±20nm pokrywające równomiernie całą jego powierzchnię.

RYSUNEK 2 przedstawia obrazy SEM nanorurek wytworzonych, na stopie tytanu z niobem Ti6Al7Nb, w tych samych warunkach jak poprzednio. Średnice nanorurek na powierzchni stopu Ti6Al7Nb są mniejsze i zróżnicowane w zależności od podłoża na którym je wytworzono. Dwufazowy stop Ti6Al7Nb składa się z fazy  $\alpha$ , bogatej w Al (kolor szary) i fazy  $\beta$ , bogatej w Nb (kolor jasny).

Nanorurki wytworzone na ziarnach fazy  $\alpha$  stopu, o średnicy około 65nm±10nm, są bardzie regularne i pokrywają całą powierzchnię fazy  $\alpha$ . Natomiast nanorurki wytworzone na ziarnach fazy  $\beta$ , pokrywają powierzchnię częściowo (RYS. performed at the temperature of 25°C and 20V maintained over 2 hours.

SEM microscope analysis of surface samples after anodizing was conducted by means of the JSM-5600, Jeol inc., scanning microscope and X-ray EDS micro-analyzer. Surface composition of samples was studied using the X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) in an equipment by VSW (Vacuum Systems Workshop, Ltd.) equipped with a concentric hemispherical electron analyzer with radius of 150mm and a two-plate 18-channel detector (Galileo). The electron analyzer was operated in fixed-analyse transmission mode (FAT) with constant pass energy of 22eV. Samples were exposed to the Ka Al (1486.6eV) X-ray radiation working at power of 210W (15 kV - voltage, 14mA - emission current). The background pressure during the analyses was better than 5×10-8mbar. Calibration of the binding energy scale was done by assuming the position of the adventitious C 1s line of C-C and C-H bonding at 284.6eV.

## **Results and discussion**

FIGURE 1 shows SEM images of the morphology of nanotubes. On the surface of titanium nanotubes of diameters 100nm±20nm were formed. The entire surface of the sample was uniformly covered by nanotubes.

FIGURE 2 shows SEM images of nanotubes formed under identical conditions on the Ti6AI7Nb titanium and niobium alloy. Oxide nanaotubes on the surface of the Ti6AI7Nb alloy are smaller and differ in diameters depending on matrix they were formed on. Two phase Ti6AI7Nb alloy consists of  $\alpha$  phase, rich in Al (grey color) and  $\beta$  phase rich in Nb (light color).

Nanotubes formed on the  $\alpha$  phase grains of the alloy of diameters about 65nm±10nm, were regularly shaped and the entire surface of the  $\alpha$  phase was covered by them. On the  $\beta$  phase grains, nanotubes did not cover the entire



RYS.1. Obraz SEM nanorurek na tytanie Ti – pow. a) 15000x b) 30000x c) 50000x. FIG.1. SEM image of titania nanotubes on titanium – magnification a) 15000x b) 30000x c) 50000x.



RYS.2. Obraz SEM nanorurek na stopie tytanu TiAINb - pow. a) 15000x b) 30000x c) 50000x. FIG.2. SEM image of oxide nanotubes on the Ti6AI7Nb alloy – mag. a) 15000x, b) 30000x, c) 50000x. 107

2b) a ponadto charakteryzują się mniejszymi średnicami 45nm±10nm.

Jakościowa i ilościowa mikroanaliza (EDS) pierwiastków występujących w warstwie powierzchniowej nanorurek utworzonych na ziarnach faz  $\alpha$  i  $\beta$  stopu Ti6AI7Nb (TABELA 1) wykazała zawartość tytanu, glinu, niobu, tlenu i fluoru o zróżnicowanych koncentracjach. W warstwie nanorurek utworzonych na ziarnach fazy  $\beta$ jest więcej niobu niż w warstwie nanorurek na powierzchni ziarn fazy  $\alpha$ , natomiast te ostatnie zawierają większą ilość glinu.

Badania XPS wykazały obecność wymienionych pierwiastków w postaci tlenków – odpowiednie wartości energii wiązania 458,7eV dla Ti<sup>4+</sup>, 207,3eV dla Nb<sup>5+</sup>, 74,1eV dla Al<sup>3+</sup>, a ponadto potwierdziły obecność fluoru w postaci fluorków F- 648,9eV i fosforu jako fosforanów 133,4eV.

W odróżnieniu od podo-

bieństwa anodowego zachowania tytanu i stopu Ti6Al7Nb w roztworach H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [1], wynikającego z podobieństwa natury chemicznej tytanu i niobu [16-19], przeprowadzone badania wykazały zróżnicowane zachowanie tytanu i jego stopu podczas anodowania w roztworze zawierającym jony fluorkowe. Podobnie jak tytan, niob jest metalem o dużej odporności korozyjnej, którą zawdzięcza podatności pokrywania się warstwą tlenkową Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [20]. Podczas polaryzacji anodowej w roztworach bezfluorkowych, niob tworzy tlenki NbO i NbO<sub>2</sub> przy potencjale -0,2V (NEK), które następnie utleniane są do Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> przy potencjale +0,2V (NEK) [21-23]. Zbliżone średnice jonów Nb5+ i Ti4+, wynoszące odpowiednio 0,068nm i 0,063nm, pozwalają na ich izomorficzną wymiane w siatce TiO<sub>2</sub> [24]. Jon Nb<sup>5+</sup> stabilizowany jest wtedy w siatce krystalicznej wymianą elektronów pomiędzy jonami Ti<sup>4+</sup> i Ti<sup>3+</sup>, a jony niobu Nb<sup>5+</sup>, charakteryzujące się niższymi liczbami przeniesienia w porównaniu z tytanem, migrują wolniej w warstwach tlenkowych w polu elektrycznym. W tej sytuacji w kierunku granicy z elektrolitem przemieszczają się przede wszystkim kationy tytanu Ti<sup>3+</sup> i Al<sup>3+</sup>, co wyjaśnia łatwiejsze formowanie warstwy tlenkowej na ziarnach fazy α, bogatej w Al. Obecność niobu głównie w fazie β stopu i niższa szybkość transportu w warstwie tlenkowej oraz niepodatność na rozpuszczanie tlenków niobu w roztworze fluorków, tłumaczą mniejsze średnice nanorurek i większe grubości ścianek nanorurek, zwłaszcza pokrywających ziarna fazy β.

## Wnioski

Różnice w średnicach nanorurek formowanych na powierzchni tytanu i dwufazowego stopu Ti6Al7Nb oraz różnice w ciągłości i jednorodności pokrywania powierzchni ziarn obu faz stopu wynikają z różnic właściwości elektrochemicznych pierwiastków stopowych Al i Nb. Na ziarnach fazy  $\alpha$  stopu formowane są nanorurki o większych średnicach pokrywające całkowicie powierzchnię ziarn tej fazy. Na ziarnach fazy  $\beta$  stopu formowane są nanorurki o mniejszych średnicach i niepełnym pokryciu powierzchni stopu.

Pierwiastki w warstwie na powierzchni stopu Elements in layer on alloy surface	Zawarto pierwiastków w warstwie na powierzchni ziarn fazy Contents of elements in layer over phase grains % wag. [wt.%]	Zawarto pierwiastków w warstwie na powierzchni ziarn fazy Contents of elements in layer over phase grains % wag. [wt.%]
Ti	58,0	53,5
AI	4,0	2,9
Nb	2,5	7,1
0	33,0	34,0
F	2,5	2,5

TABELA 1. Wyniki analizy ilościowej pierwiastków w warstwie nanorurek formowanych na powierzchni stopu Ti6Al7Nb.

TABLE 1. Results of quantitative analysis of elements in nanotubes layer formed on the Ti6AI7Nb alloy. surface (Fig. 2b) and were not uniformly arranged. Moreover they have smaller diameters 45nm±10nm.

Both qualitative and quantitative elemental analysis of the surface layer over the  $\alpha$ and  $\beta$  grains was conducted for the Ti6Al7Nb alloy by EDS method. The results presented in Table 1 show the presence of titanium, niobium, oxygen and fluorine of different concentrations. Nanotubes formed over  $\beta$  grains contain more niobium than the nanotubes over  $\alpha$ grains, whereas the latter contain more aluminium.

XPS studies confirmed the presence of the relevant elements as oxides – the corresponding binding energies are 458,7eV for Ti<sup>4+</sup>, 207,3eV for Nb<sup>5+</sup>, 74,1eV for Al<sup>3+</sup>. Moreover, the fluorine as fluoride ion Fwith binding energy 648,9eV and phosphorus as phosphates with binding energy 133,4eV, were present.

Contrary to the similarity between the anodic behavior of titanium and Ti6AI7Nb alloy in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solutions [1], resulting from the similarity of chemical properties of titanium and niobium [16-19], the performed studies revealed different behavior of titanium and its niobium alloy during anodizing in solution which contains fluoride ions. Similarly to titanium, niobium has high corrosion resistance due its susceptibility to being covered with Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oxide layer [20]. At anodic polarization, niobium forms NbO and NbO<sub>2</sub> oxides at the -0,2V (NEK) potential, which are subsequently oxidized to Nb2O5 at the +0,2V (NEK) potential [21-23]. Similar diameters of Nb<sup>5+</sup> and Ti<sup>4+</sup> ions, 0,068nm and 0,063nm subsequently, permit their isomorphic transfer in the TiO<sub>2</sub> structure [24]. Nb<sup>5+</sup> ion is stabilized then in the crystal structure by the exchange of electrons between Ti<sup>4+</sup> and Ti<sup>3+</sup> ions. Nb<sup>5+</sup> niobium ions have lower transport number compared to titanium and migrate slower in the electric field in oxide layers. In such situation mainly Ti<sup>3+</sup> and Al<sup>3+</sup> cations migrate towards the electrolyte interface, which explains easier formation of the oxide layer over the  $\alpha$  phase grains, rich in Al. At the same time the presence of niobium mainly in the  $\beta$  phase of the alloy and its worse transport properties in the oxide layer as well as insusceptibility of niobium oxides to dissolve in fluoride solutions account for smaller diameters of nanotubes and incomplete coverage of the phase β surface of the alloy by nanotubes.

## Conclusions

The differences in the diameters of nanotubes formed on the surface of titanium and the Ti6AI7Nb alloy as well the differences in the continuity and uniformity of coverage of both phase grains of the alloy result from the difference in the electrochemical properties of the alloy elements: Al and Nb. Over  $\alpha$  phase grains nanotubes of bigger diameters, rich in aluminium, covering the entire surface are formed. Nanotubes of smaller diameters and incomplete surface coverage, rich in niobium are formed over the  $\beta$  phase grains. The presence of phosphates in surface layer of nanotubes Obecność fosforu w postaci fosforanów w powierzchniowej warstwie nanorurek na stopie wskazuje na ich zdolność do stymulacji osteointegracji.

#### Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków MNiSzW w latach 2007-2009 jako projekt badawczy nr N507 082 31/2009, za co autorzy wyrażają serdeczne podziękowanie.

#### Piśmiennictwo

[1] E. Krasicka-Cydzik. Formowanie cienkich warstw anodowych na tytanie i jego implantowych stopach w środowisku kwasu fosforowego. Monografia.UZ, Zielona Góra 2003.

[2] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, D.M. Brunette, in: D.M.Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, Titanium in Medicine, Springer, Berlin, 2001,171–230.

[3] X. Liu, Paul K. Chu, Chuanxian Ding, Materials Science and Engineering R 47 (2004) 49–121.

[4] D. Gong, C.A. Grimes, O.K. Varghese, W.C. Hu, R.S. Singh, Z. Chen and E.C. Dickey, Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation, J. Mater. Res., 2001 (16): 3331-3334.

[5] E. Krasicka-Cydzik, Elektrochemiczne aspekty kształtowania warstwy anodowej na stopach tytanu, Ochrona przed Korozją, XLII (1999) 48-52.

[6] H. Habazaki, K. Shimizu, S. Nagata, P. Skeldon, G.E. Thompson and G.C. Wood, Ionic Mobility in Amorphous Titania, J. Electrochem. Soc. 149,(2002) B70.

[7] C.E.B.Marino, P.A.P.Nascente, S.R.Boaggio, R.C. Rocha-Filcho, N. Bocchi, Thin Solid Films 468(2004) 109.

[8] G.K. Mor, O. Varghese, M. Paulose, N. Mukherjee, C.A.Grimes, J.Mater.Res. 18 (2003) 2588.

[9] J. Zhao, X. Wang, R. Chen, L. Li, Solid State Commun. 134 (2005) 705.

[10] L. Taveira, J. Macak, H. Tsuchiya, L. Dick, P. Schmuki: J. Electrochem. Soc.152 (2005) B405.

[11] Y. Park, K. Shin, H. Song, Applied Surface Science 253 (2007) 6013–6018.

[12] X. Chen, M. Schriver, T. Suen: S. Mao, JSMThin Solid Films 515 (2007) 8511–8514.

[13] D.V. Bavykin, E.V. Milsom, F. Marken, D.H. Kim, D.H. Marsh, D.J. Riley, F.C. Walsh, K.H. El-Abary, A.A.Lapkin, Electrochemistry Communications 7 (2005) 1050–1058. formed on titanium alloy confirmed its capability to stimulate osteointegration.

#### Acknowledgement

The financial support from the Ministry of Science and Higher Education (N507 082 31/2009) is greatly appreciated.

#### References

[14] E. Krasicka-Cydzik, I. Głazowska, A. Kaczmarek, K. Białas-Heltowski: Wpływ szybkości narastania potencjału na proces anodowego formowania nanorurek TiO<sub>2</sub>, Inżynieria Biomateriałów 77-80 (2008) 48-51

[15] E. Krasicka-Cydzik,I.Głazowska,A.Kaczmarek, K.Białas-Heltowski: Wpływ stężenia jonów fluorkowych na wzrost anodowej samoorganizującej się warstwy nanorurek TiO<sub>2</sub>, Inżynieria Biomateriałów 77-80 (2008) 46-48

[16] C. Sittig, G. Hahner, A. Marti, M. Textor, N.D. Spencer, R. Hauert: The implant material, Ti6AlNb7 surface microstructure, composition and properties, J.Mat. Sci., Materials in Medicine10(1999) 191

[17] I. Metikosz, A. Kowal, J. Piljac, The influence of niobium and vanadium on passivity of titanium-based implants in physiological solution, Biomaterials 24, 21 (2003) 3765

[18] W.A. Badawy Electrochemical and Photo-Electrochemical Behaviour of Passivated Niobium Electrodes During Hydrogen Evolution, J.Appl.Electrochem. 20 (19900 139

[19] S.Y. Yu, J.R. Scully, C.M. Vitus: Influence of niobium and zirconium alloying additions on the anodic dissolutions behaviour of activated titanium in HCl solutions, J.Electrochem.Soc., 148(2001) B68-B78

[20] C.V. D'Alkalaine, L.M.M. De Souza, F.C. Nari: The anodic behaviour of Niobium-I-III, Coros.Sci. 34,

1 (1993) 109

[21] J.R.W. Beye R. Gronsky, The anodic behaviour of niobium, Acta Metall. Mater. 42 (1994) 1373

[22] Q.Lu, S.Mato, P.Skeldon, G.E. Thompson, D.Masheder, H.Habazaki, K.Shimizu, Anodic film growth on tantalum in dilute phosphoric acid solution at 20 and 85C, Electrochim.Acta 47 (2002) 2761

[23] M.H.Wang, K.Hebert: Metal and Oxygen Ion Transport during Ionic Conduction in Amorphous Anodic Oxide Films, J.Electroch. Soc.146, 10 (1999) 3741

[24] S.R.Morrison: Electrochemistry at Semiconductors and Oxidized Metal Electrodes, Plenum Press, New York 1980

> MGINEERING OF MATERIALS

110

# PROGNOZOWANIE WŁAŚCI-WOŚCI MECHANICZNYCH I KOROZYJNYCH DRUTÓW DLA ORTOPEDII

#### JOANNA PRZONDZIONO<sup>1\*</sup>, WITOLD WALKE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Modelowania Procesów i Inżynierii Medycznej, Politechnika Śląska w Katowicach <sup>2</sup>Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Politechnika Śląska w Gliwicach MAILTO:joanna.przondziono@polsl.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 110-112]

## Wprowadzenie

Wśród wielu właściwości, którymi powinny charakteryzować się druty i wyroby z drutu stosowane na implanty ortopedyczne, wymienić należy przede wszystkim odpowiedni dla danego zastosowania zespół właściwości mechanicznych oraz wysoką odporność na korozję elektrochemiczną w środowisku tkanek i płynów fizjologicznych [1]. Właściwości te uzależnione są m. in. od składu chemicznego materiału, jego czystości metalurgicznej, parametrów procesu wytwarzania.

Istotny wpływ na dobór optymalnych parametrów procesu wytwarzania drutu mają prawidłowe charakterystyki technologicznej plastyczności materiału. Od nich zależy zarówno uzyskanie struktury podatnej do procesu ciagnienia, jak i otrzymanie wyrobu charakteryzującego się wymaganymi właściwościami użytkowymi (m. in. właściwościami mechanicznymi i odpornością na korozję). Odkształceniu plastycznemu towarzyszy zjawisko umocnienia odkształceniowego, które związane jest ze wzrostem naprężenia uplastyczniającego op [2]. Poprawne ustalenie parametrów przeróbki plastycznej oraz uzyskanie odpowiednich właściwości końcowych wyrobów niezmiennie związane są z analizą przebiegu funkcji  $\sigma_{0}$ =f( $\epsilon$ ). Krzywe zmiany naprężenia uplastyczniającego w funkcji odkształcenia (tzw. krzywe umocnienia) pozwalają na przewidywanie zachowania się materiału w trakcie procesów przeróbki plastycznej. Odkształcenie zadawane w procesie ciągnienia ma również istotny wpływ na właściwości korozyjne drutu. W pracach [3,4] stwierdzono, że wzrost odkształcenia powoduje pogorszenie charakterystyk korozyjnych ciągnionego materiału.

Technolodzy projektujący technologię wytwarzania drutów korzystają z krzywych umocnienia celem takiego doboru parametrów ciągnienia, aby uzyskać druty o wymaganych dla danego zastosowania właściwościach mechanicznych. W tym celu można także wykorzystać tzw. krzywe technologiczne, tzn. krzywe przedstawiające zależność wytrzymałości na rozciąganie drutu w funkcji odkształcenia [5]. Praca stanowi propozycję podobnego postępowania celem prognozowania właściwości korozyjnych drutu w zależności od odkształcenia zadawanego podczas ciągnienia.

Druty stosowane w ortopedii na implanty krótkotrwałe produkowane są najczęściej ze stali nierdzewnej w gatunku X2CrNiMo17-12-2. W pracy przedstawiono przebieg krzywej umocnienia drutów wykonanych z tej stali oraz matematyczną postać funkcji naprężenia uplastyczniającego. Podano również przykładowe krzywe obrazujące zależność oporu polaryzacji w funkcji odkształcenia w procesie ciągnienia drutów elektrochemicznie polerowanych oraz elektrochemicznie polerowanych, a następnie chemicznie pasywowanych.

# FORECAST OF MECHANICAL AND CORROSIVE PROPERTIES OF WIRE FOR ORTHOPAEDICS

JOANNA PRZONDZIONO<sup>1\*</sup>, WITOLD WALKE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTAMENT OF PROCESS MODELLING AND MEDICAL ENGINEE-RING, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY IN KATOWICE <sup>2</sup>INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY IN GLIWICE MAILTO:JOANNA.PRZONDZIONO@POLSL.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 110-112]

# Introduction

The list of properties that wire and wire products for orthopaedics implants should feature includes most of all a set of mechanical properties respective for each application and high electrochemical corrosion resistance in tissue and in physiologic saline [1]. These properties depend on, among other things, chemical composition of the material, its metallurgical purity, parameters of manufacturing process.

Proper characteristics of technological plasticity of the material is vital for the selection of optimum parameters of wire manufacturing process. They determine both, obtaining the structure prone to drawing process as well as obtaining the product featuring required application properties (among other things, mechanical properties and resistance to corrosion). Plastic strain is accompanied by the phenomenon of strain hardening, which is connected with the increase in yield stress op [2]. Correct determination of plastic working parameters and acquisition of final products proper characteristics are invariably connected with an analysis of the course of  $\sigma_p = f(\epsilon)$  function. Yield stress curves in the strain function (so called flow curves) enable to predict the behaviour of the material during plastic working. Strain resulting in drawing process affects wire corrosion properties to a great extent. In the studies [3,4] it was ascertained that the increase in strain involves deterioration of corrosion characteristics of drawn material.

Production engineers who are responsible for wire manufacturing technologies make use of flow curves in order to select such a set of drawing parameters to obtain wire that features mechanical properties required for respective applications. For this purpose one may also use so called technological curves i.e. curves showing relationship of wire resistance to drawing in strain function [5]. In this study a similar behaviour is suggested in order to anticipate wire corrosive properties depending on strain obtained in drawing process.

Wire used in orthopaedics for short-term implants are manufactured most frequently from stainless steel of X2CrNiMo17-12-2 grade. This work shows the course of flow curve of wire made of this grade of steel and mathematical form of yield stress function. The study also presents exemplary curves showing the dependence of polarisation resistance in strain function in the drawing process of electrochemically passivated and electrochemically polished, and then chemically passivated wire.

# Test methodology

Initial material for tests was wire rod made of X2CrNiMo17-12-2 steel with diameter of 5,5mm in supersaturated

#### Metodyka badań

Materiałem wyjściowym do badań była walcówka wykonana ze stali X2CrNiMo17-12-2 średnicy 5,5mm w stanie przesyconym. Walcówkę ciągniono do średnicy 1,35mm. W trakcie realizacji procesu ciągnienia odcinano próbki do badań mechanicznych oraz korozyjnych. Właściwości mechaniczne ustalano przy pomocy statycznej próby jednoosiowego rozciągania na maszynie wytrzymałościowej Instron typu 1116.

Odporność na korozję wżerową oceniano w oparciu o rejestrację krzywych polaryzacji anodowej metodą potencjodynamiczną z wykorzystaniem systemu do badań elektrochemicznych VoltaLab® PGP 201. Badania korozyjne drutów przeprowadzono w roztworze Tyroda na próbkach elektrochemicznie polerowanych oraz polerownych, a następnie chemicznie pasywowanych.

#### Wyniki badań

Metodykę postępowania podczas wyznaczania krzywej umocnienia opisano w pracy [2]. Określone z próby rozciągania wielkości naprężeń rzeczywistych odpowiadających granicy plastyczności posłużyły do wykreślenia krzywej umocnienia badanych drutów oraz ustalenia matematycznej postaci funkcji naprężenia uplastyczniającego. Krzywą aproksymowano funkcją typu  $\sigma_p=\sigma_{p0}+C\epsilon^n$ , która uwzględnia wielkość naprężenia dla stanu początkowego (tzn. dla drutu obrobionego cieplnie, przeznaczonego do ciągnienia). Na

(1)

RYS.1 przedstawiono krzywą umocnienia badanych drutów. Matematyczna postać funkcji naprężenia uplastyczniającego dla badanej stali jest następująca:

σ<sub>p</sub>=224,8 + 878ε<sup>0,4</sup>.

Analiza wyników badań potencjodynamicznych wykazała, że najlepszą odpornością korozyjną charakteryzuje się walcówka w stanie przesyconym. Wzrost odkształcenia zadawanego w procesie ciągnienia drutu spowodował obniżanie się wartości potencjału korozyjnego, potencjału przebicia oraz oporu polaryzacji. Jednocześnie następował wzrost gęstości prądu korozyjnego i szybkości korozji. Tendencje te dotyczą zarówno drutów szlifowanych, jak i elektrolitycznie polerowanych.

Na RYS.2 i 3 pokazano krzywe otrzyma-



RYS.2. Zależność oporu polaryzacji od odkształcenia w procesie ciągnienia drutów elektrochemicznie polerowanych.

FIG.2. Dependence of polarisation resistance on strain in the drawing process of electrochemically polished wire.

condition. Wire rod was drawn up to diameter of 1,35 mm. During the drawing process samples for mechanical and corrosion tests were taken. Mechanical properties were determined by means of static tensile tests. The Instron tensile testing machine, type 1116 was applied.

Pitting corrosion was determined on the ground of registered anodic polarisation curves by means of potentiodynamic method with application of electrochemical testing system VoltaLab® PGP 201. Wire corrosion tests were carried out in Tyrode solution on samples that were electrochemically polished and electrochemically polished with finally chemically passivated.

#### Test results

The method of procedure during determination of flow curve was described in study [2]. Values of actual stress, determined on the ground of tensile test, corresponding to yield point were used draw work hardening curve of tested wire and determine mathematical form of yield stress function. The curve was used to approximate the function of  $\sigma_p = \sigma_{p0} + C\epsilon^n$  type that takes into consideration the value of stress for the initial condition (i.e. for wire after heat treatment , used for drawing). FIG.1 presents flow curve for tested wire. Mathematical form of yield stress function for tested steel is shown below:

#### $\sigma_{p}=224,8+878\epsilon^{0,4}.$

Analysis of potentiodynamic tests showed that wire rod in supersaturated condition featured the best corrosion resist-



RYS.1. Krzywa umocnienia drutu ze stali X2Cr-NiMo17-12-2

FIG.1. Flow curve of wire made of X2CrNiMo17-12-2 steel.

ance. Increase in strain obtained in wire drawing caused decrease in the value of corrosion potential, perforation potential and polarisation resistance. At the same time, increase in corrosive current density and corrosion rate were observed. Those tendencies can be related to both, ground wire and electrochemically polished wire.

FIGs.2 and 3 show curves obtained on the ground of selected results of corrosive tests,



RYS.3. Zależność oporu polaryzacji od odkształcenia w procesie ciągnienia drutów elektrochemicznie polerowanych i pasywowanych.

FIG.3. Dependence of polarisation resistance on strain in the drawing process of electrochemically polished and passivated wire.

111

BI MATERING OF

ne na podstawie wybranych wyników badań korozyjnych, a mianowicie zmianę oporu polaryzacji w funkcji odkształcenia zadawanego w procesie ciagnienia.

Przeprowadzone badania pozwoliły na dobranie funkcji obrazujących zmianę oporu polaryzacji w zależności od odkształcenia zadawanego podczas ciągnienia. Mają one postać następującą:

R<sub>p</sub>=-267,05ε<sub>c</sub>+1381,2 (druty elektrochemicznie polerowane) (2)

R<sub>p</sub>=-631,65ɛ<sub>c</sub>+4785,6 (druty elektrochemicznie polerowane i pasywowane) (3)

Z podanych krzywych można wnioskować, jak kształtował się opór polaryzacji drutów poddanych obróbce powierzchniowej. Wartość oporu polaryzacji świadczy o zasadności stosowania zabiegu chemicznej pasywacji w przypadku drutów dla ortopedii wykonanych ze stali X2CrNiMo17-12-2.

#### Podsumowanie

Przeprowadzone badania właściwości mechanicznych pozwoliły na ustalenie przebiegu krzywych umocnienia i dobranie funkcji naprężenia uplastyczniającego ciągnionych drutów wykonanych ze stali X2CrNiMo17-12-2. Z kolei wyniki badań odporności na korozję elektrochemiczną umożliwiły uzyskanie zależności funkcyjnych obrazujących wpływ odkształcenia w procesie ciągnienia na zmianę parametrów korozyjnych. W pracy przedstawiono jedynie przykłady takich zależności dla oporu polaryzacji, ale można je również wyznaczyć dla pozostałych wielkości (potencjału przebicia, gęstości prądowej, szybkości korozji).

Przedstawiona problematyka jest bardzo istotna dla technologów zajmujących się projektowaniem procesów ciągnienia, gdyż zagadnienie poprawnego opisu plastyczności materiałów jest ściśle związane z doborem optymalnych parametrów procesu technologicznego wytwarzania drutów. Zagadnienie to jest równie ważne dla producentów implantów kostnych z drutu i wyrobów z drutu, gdyż mając do dyspozycji podane krzywe lub funkcje, można z góry przewidzieć, jakimi właściwościami korozyjnymi będzie charakteryzował się drut o żądanej wytrzymałości ciągniony z zadanym odkształceniem.

Należy nadmienić, że podane zależności funkcyjne nie mają charakteru uniwersalnego i dotyczą jedynie drutów wykonanych ze stali X2CrNiMo17-12-2 badanych w roztworze Tyroda. W przypadku zastosowania na druty bądź to innego materiału, bądź innego przeznaczenia implantu, konieczne jest zrealizowanie analogicznych badań drutów w innym środowisku symulującym płyny fizjologiczne organizmu ludzkiego.

# Piśmiennictwo

[1] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.

[2] Grosman F., Przondziono J.: Metodyka wyznaczania naprężeń rzeczywistych w statycznej próbie rozciągania cienkich drutów. Obróbka Plastyczna Metali. 15, 2004, Nr 4, s. 5.

[3] Przondziono J., Walke W., Kulak K.: Badania potencjodynamiczne drutów ze stali nierdzewnych w środowisku płynów ustrojowych (Potentiodynamic research of wires made of stainless steels in the environment of body fluids). Inzynieria Biomateriałów (Engineering of Biomaterials), 11, 2008, Nr 77-80, s. 104-106.

namely the change of polarisation resistance in the function of strain resulting from drawing process.

These tests enabled to select functions showing the change of polarisation resistance dependent on strain resulting from drawing. They have the following forms:

 $R_{p}$ =-267,05 $\epsilon_{c}$ +1381,2 (electrochemically polished wire) (2)

 $R_p$ =-631,65 $\epsilon_c$ +4785,6 (electrochemically polished and passivated wire) (3)

Those curves enable to understand the form of polarisation resistance of wire subjected to surface treatment. The value of polarisation resistance demonstrates that it is purposeful to use chemical passivation for wire made of X2CrNiMo17-12-2 steel used in orthopaedics.

## Summary

Testing of mechanical properties enabled to determine the course of work hardening curves and selection of yield stress function of drawn wire made of X2CrNiMo17-12-2 steel. Next, the results of electrochemical corrosion resistance tests enabled to obtain functional dependencies showing the influence of strain in drawing process on the change of corrosion parameters. The study only shows examples of such relationship for polarisation resistance, but they may also be determined for the other parameters (breakdown potential, current density, corrosion rate).

The problem that has been presented is crucial for production engineers dealing with the design of drawing processes, because the issue of proper description of material plasticity is closely related to the selection of optimum parameters of wire production. This issue is also important for manufacturers of bone implants made of wire and wire products, because having the given curves or functions one can predict, in advance, corrosive properties of wire with required strength, drawn with obtained strain.

It must be mentioned that given functional dependencies are not universal and they are only related to wire made of X2CrNiMo17-12-2 steel tested in Tyrode solution. If the application concerns either wire made of a different material, or wire used for other implants, it is necessary to carry out similar wire tests in other environment similar to human body fluids.

# References

[4] Przondziono J., Walke W.: Potentiodynamic studies of stainless steel wire for endourology. Archives of Materials Science and Engineering, 35, 2009, iss.1, s. 21-28.

[5] Łuksza J., Skołyszewski A., Witek F., Zachariasz W.: Druty ze stali i stopów specjalnych, WNT, Warszawa 2006.

. . . . . . . .

# BADANIA MIKROSTRUKTURY POROWATYCH POKRYĆ MODELOWYCH IMPLANTÓW DOKOSTNYCH

#### Ryszard Uklejewski<sup>1</sup>, Mariusz Winiecki<sup>1\*</sup>, Piotr Rogala<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Podstaw Bioinżynierii Medycznej, Instytut Techniki, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz. Polska <sup>2</sup>Klinika Chirurgii Kręgosłupa, Ortopedii Onkologicznej i Traumatologii, Uniwersytet Medyczny im.Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska \*MAILTO: winiecki@ukw.edu.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 113-115]

W pracy przedstawiono wyniki badań struktury geometrycznej porowatych pokryć modelowych (cylindrycznych) implantów dokostnych. Celem badań była próba określenia zależności cech mikrogeometrii porowatych pokryć opisanej przez wybrane parametry mikrostruktury powierzchni od parametrów technologicznych procesu wytwarzania porowatych pokryć na powierzchni implantów ortopedycznych.

Porowate pokrycia wytworzone zostały z proszku tytanu metodą natryskiwania plazmowego na powierzchni modelowych implantów w postaci wałeczków ze stali St3s o średnicy 16mm (wymiar zbliżony do średniego wymiaru przekroju trzpienia endoprotezy stawu biodrowego). Wytworzonych zostało 5 wariantów (oznaczonych odpowiednio W1-W5) porowatych pokryć (po 10 próbek) o grubości 120–255µm (średnio 165µm) i przyczepności powłoki tytanowej do pod-

łoża min. 20MPa. Dla uzyskania zróżnicowanej chropowatości i mikrostruktury poszczególnych wariantów pokryć w procesie natrysku plazmowego zmieniano parametry procesu wg danych przedstawionych w TABELI. 1. Wytworzenie porowatych pokryć zlecono firmie Plasma SYSTEM S.A. (Siemianowice Śląskie, Polska).

Do charakterystyki mikrogeometrii porowatych pokryć zastosowano zestaw parametrów porodostępności zaproponowany w pracach [1,2,4,8] do biostrukturalnej oceny porowatych implantów dokostnych charakteryzujących daną powierzchnię pod względem zdolności utworzenia właściwego połączenia kość-porowaty implant, tj.: efektywna porowatość objętościowa

Parametr natryskiwania Variables Nat enie Napi cie Odległo Ar Wariant glowicy od pr du pokrycia pr du Plasma gun Current Voltage Porous distance intensity coating from implant variant surface [A] [V] [l/h] [l/h] [mm] W1 480 45 70 2500 90 490 48 75 2650 95 W2 W3 500 50 81 2800 100 W4 505 52 90 2900 105 W5 510 55 98 3000 110

TABELA 1. Parametry procesu natryskiwania plazmowego pięciu wariantów próbek tytanem. TABLE 1. The variables of plasma spraying process for five variants of titanium porous coating.

 $- \phi_{Vef}$ , wskaźnik pojemności przestrzeni porów porowatego pokrycia – V<sub>PM</sub>, efektywna głębokość porów – p<sub>def</sub>, reprezentatywny rozmiar porów – p<sub>Srep</sub>, reprezentatywny kąt porodostępności –  $\Omega_{rep}$ , współczynnik zwiększenia powierzchni adhezyjnej –  $\psi$ . Dodatkowo zmierzone zostały wartości standardowych parametrów chropowatości 2D (Rq – średnia kwadratowa rzędnych profilu, Rk – wysokość chropowatości rdzenia profilu) i 3D (Sq – średnie kwadratowe odchylenie rzędnych powierzchni). Badania są kontynuacją prac referowanych w [3,6,7].

Pomiary struktury geometrycznej porowatych pokryć na modelowych implantach wykonano metodą profilo-

#### Ryszard Uklejewski<sup>1</sup>, Mariusz Winiecki<sup>1\*</sup>, Piotr Rogala<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Fundamentals of Medical Bioengineering, Institute of Technology, Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz, Poland <sup>2</sup>Department of Spine Surgery, Oncologic Orthopaedics and Traumatology, Poznan University of Medical Sciences, Poland

\*MAILTO: WINIECKI@UKW.EDU.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 113-115]

This paper presents results of experimental investigations of porous coatings microstructure of model (cylindrical) endoosseous implants. The purpose of the research was the attempt to determine the dependence of the implant porous coatings microstructure properties on variables of a plasma spraying process.

The titanium porous coatings were deposited by plasma spraying on stainless steel cylindrical shafts (16mm in diameter). There were prepared five variants (W1-W5) of porous coating (10 samples of each kind) 120–255µm thick (average thickness – 165µm) with titanium coating adherence – min. 20MPa. To diversify roughness and the porous coating microstructure during plasma spraying the typical process variables were changed as it is shown in TABLE 1. The manufacturing of plasma sprayed porous coatings

was subcontracted to Plasma SYSTEM S.A. (Siemianowice Śląskie, Poland).

The evaluation of the porous coatings microgeometry were powierzchni performed with use of parameters of poroaccessibility of implant porous coatings for bone tissue ingrowth: the effective volumetric porosity  $\phi_{Vef}$ , the index of the porous coating space capacity  $V_{PM}$ , the effective pores depth pdef, the representative pore size  $p_{Srep}$ , the representative angle of poroaccessibility  $\Omega_{rep}$ and the bone-implant interface adhesive surface enlargement index ψ. The parameters set was proposed in [1,2,4,8] for biostructural evaluation of the porous coated orthopaedic implants in the aspect of its poroaccessibility - the potential of porous coating

to accommodate the penetrating bone tissue during the porous implant bone-ingrown fixation. Additionally there were measured the standard linear roughness parameters (Rq – root mean square roughness, Rk – core roughness) and the surface root mean squared roughness – Sq. This investigation is the continuation of our previous research presented in [3,6,7].

The measurement of model implants porous coatings were carried out with contact profile measurement gauge (Perthometer S8P, Perthen, Germany) equipped with standard contact stylus (diamond cone tip with 90 degrees vertical angle and 5±2µm nose radius). The SEM observa-

114



RYS.1. a) Przykładowy obraz SEM przedstawiający tytanowe porowate pokrycie wykonane metodą natryskiwania plazmowego na modelowym implancie W4, (powiększenie: 250x); b) przekrój poprzeczny przez fragment porowatego pokrycia na modelowym implancie W4.

FIG.1. The exemplary SEM micrograph of W4 variant of plasma sprayed porous coating: (left) morphology and (right) cross-section microstructure.

metrii stykowej z użyciem profilometru Perthometer S8P firmy Perthen wyposażonego w głowicę pomiarową ze znormalizowaną końcówką pomiarową (diamentowe ostrze w kształcie stożka z wierzchołkiem kulistym o kącie wierzchołkowym 90° i promieniu zaokrąglenia 5 ± 2 µm). W badaniach mikroskopowych zastosowano elektronowy mikroskop skaningowy Vega 5135 firmy Tescan. Wartości parametrów porodostępności wyznaczono wg metodyki opisanej w pracach [3,4,5].

Na RYS.1 przedstawiono przykładowy obraz SEM tytanowej porowatej warstwy wytworzonej na wałeczkach oraz przekrój poprzeczny wykonany przez fragment porowatego pokrycia tego samego wałeczka. Na RYS.2 przedstawiono przykładowy obraz izometryczny (wykonany w programie Matlab 6,5 na podstawie pomiarów chropowatości 3D) tytanowej porowatej warstwy wierzchniej na modelowym implancie w kształcie walca.

Na RYS.3 przedstawiono wykresy współzależności poszczególnych parametrów porodostępności warstwy



RYS.2. Przykładowy obraz izometryczny (wykonany w programie Matlab 6,5 na podstawie pomiarów mikrogeometrii) tytanowej porowatej warstwy wierzchniej na modelowym trzpieniu w kształcie walca W4.

FIG.2. The exemplary isometric plot (made in Matlab 6,5 on the base of the 3D roughness measurement) of W4 variant of titanium plasma sprayed porous coating.

tions of porous coatings fragments have been performed on Vega 5135, Tescan, Czech Republic. The values of the poroaccessibility parameters were determined according to the methodology presented in [3,4,5].

In FIG.1 there is presented the exemplary SEM micrograph of the W4 variant of titanium plasma sprayed porous coating morphology and cross-sectional microstructure. In FIG.2 there is presented the exemplary isometric plot (made in Matlab 6,5 on the base of the 3D roughness measurement) of W4 variant of titanium plasma sprayed porous coating.

In FIG.3 there are presented interrelation diagrams with mean values of the poroaccessibility parameters put together with the roughness parameters. FIG.3a shows the



RYS.3. Wykresy współzależności parametrów porodostępności porowatego pokrycia modelowego implantu (Rq, Rk, Sq i  $p_{def}$ ) i b) pozostałe (objętościowe, przestrzenne, hybrydowe, funkcjonalne) parametry:  $\phi_{Vef}$ ,  $V_{PM}$ ,  $p_{Srep}$ ,  $\Omega_{rep}$ , w.

FIG.3. The diagram of interrelation of the particular poroaccessibility parameters of model implant porous coating with the roughness parameters: (left) amplitude parameters (Rq, Rk, Sq and  $p_{def}$ ), (right) the remaining (volumetric, spatial, hybrid, functional) parameters:  $\phi_{Vef}$ ,  $V_{PM}$ ,  $\Omega_{rep}$  and $\psi$ .

wierzchniej implantu i podstawowych parametrów chropowatości powierzchniowej. RYSUNEK 3a dotyczy parametrów amplitudowych: Rq, Rk, Sq i p<sub>def</sub>, a RYS.3b – pozostałych parametrów:  $\phi_{Vef}$ , V<sub>PM</sub>, p<sub>Srep</sub>,  $\Omega_{rep}$ ,  $\psi$  (o charakterze zróżnicowanym – objętościowe, przestrzenne, hybrydowe, funkcjonalne).

Na podstawie analizy wyników tych współzależności stwierdzono, że różnicowanie parametrów procesu natrysku plazmowego (natężenie prądu, napięcie prądu, przepływ gazów H<sub>2</sub> i Ar oraz odległość głowicy od natryskiwanej powierzchni) w zakresie wartości przedstawionych w TABELI 1 pozwoliło uzyskać wzrost wartości efektywnej głębokości porów p<sub>def</sub> (o 33%), wskaźnika pojemności przestrzeni porów porowatego pokrycia V<sub>PM</sub> (o 26%) oraz Rk (o 21%). Stwierdzono także nieznaczny wzrost wartości Sq. Nie stwierdzono natomiast zależności pozostałych parametrów porodostępności ( $\phi_{Vef}$ , p<sub>Srep</sub>  $\Omega_{rep}$ ,  $\psi$ ) od parametrów procesu natrysku plazmowego w zakresie wartość przedstawionych w TABELI 1.

Powyższe wyniki pilotażowych badań wskazują na konieczność poszukiwania możliwości sterowania w procesie wytwarzania wartościami pozostałymi parametrami porodostępności:  $\varphi_{Vef}$ ,  $p_{Srep} \Omega_{rep}$  oraz  $\psi$ , które wg [3] mogą mieć istotne znaczenie dla promowania wrastania tkanki kostnej w przestrzeń porów pokrycia. Współcześnie najlepsze możliwości wytwarzania porowatych pokryć implantów o pożądanej porodostępności (tzw. designed poroaccessibility) mają tzw. technologie przyrostowe, np. SLS/SLM (Selective Laser Sintering/ Selective Laser Melting) – selektywne spiekanie/stapianie proszków metali wiązką lasera. Kolejnym etapem badań autorów jest zbadanie możliwości wytworzenia w technologii SLM porowatych pokryć o pożądanej porodostępności. amplitude parameters: Rq, Rk, Sq and  $p_{def}$ , while FIG.3b – the remaining parameters:  $\phi_{Vef}$ ,  $V_{PM}$ ,  $p_{Srep}$ ,  $\Omega_{rep}$  and  $\psi$  (volumetric, spatial, hybrid, functional).

On the basis of the interrelation diagrams analyses there can be ascertained that the differentiation of the plasma sprayed process variables (current intensity, voltage, H2 and Ar gases flows, as well as the gun distance from substrate) in the range of values presented in TABLE 1 causes the 33% raise of the effective pores depth pdef, the 26% raise of the index of the porous coating space capacity VPM and the 21% raise of the core roughness Rk. There was also ascertained a slight increase of the mean Sq parameter value. There was ascertained no influence of the plasma spraying process variables in the range of values presented in TABLE 1 on the remaining poroaccessibility parameters ( $\phi_{Vef}$ ,  $p_{Srep}$ ,  $\Omega_{rep}$  and  $\psi$ ).

The results of this pilot study the suggest to search the possibility of the remaining poroaccessibility parameters controling:  $\phi_{Vef}$ ,  $p_{Srep}$ ,  $\Omega r_{ep}$  and  $\psi$ , during the porous coating manufacturing process, because these parameters might be important for promotion of bone tissue ingrowth, which is essential for the proper fixation of the implant in bone [3]. Nowadays, the best potential to manufacture implant porous coatings with designed poroaccessibility have the additive technologies e.g.: Selective Laser Sintering/ Selective Laser Melting (SLS/SLM). The next stage of our research is the investigation on the possibilities to manufacture the porous coating with designed poroaccessibility in SLM.

#### Piśmiennictwo

[1] Mielniczuk J, Uklejewski R, Winiecki M, Rogala P. The poroparameters for evaluation of structural-osteoinductive and mechanical properties of bone-implant porous coating interface. Part 1. Theoretical background on the basis of the poroelastic model of bone. J Biomech, 2006; Vol. 39, Suppl 1, p. S14.

[2] Uklejewski R, Rogala P, Winiecki M. On the characterization of orthopaedic implants porous coatings with three-dimensional roughness measurement, Proceedings of the 11th International Conference on Metrology & Properties of Engineering Surfaces 2007, Huddersfield, UK, 16-20.07.2007, 241–245.

[3] Uklejewski R, Winiecki M, Czapski T, Rogala P, Kochański J. Parametric evaluation of implant porous coatings – the results from representative examples of femoral stems measurements. Engineering of Biomaterials, 2008, Vol. 11 (77-80), 101–103.

[4] Uklejewski R, Winiecki M, Mielniczuk J, Rogala P, Auguściński A. The poroaccessibility parameters for three-dimensional characterization of orthopaedic implants porous coatings. Metrology and Measurement Systems. 2008, Vol. 15 (2), 215–226.

[5] Uklejewski R, Winiecki M, Mielniczuk J, Rogala P, The stereometric evaluation of the structural-osteoinductive properties of intraosseous implants porous coatings by means of the poroaccessibility parameters, (in Polish), Praca zaakceptowana do druku w czasopiśmie MECHANIK – dane zostana uzupełnione.

References

[6] Uklejewski R, Winiecki M, Rogala P, Mielniczuk J, Auguściński A, Stryła W. Structural and biomechanical biocompatibility in bone-porous implant fixation region – on the basis of two-phase poroelastic biomechanical model of bone tissue. Engineering of Biomaterials, 2007; Vol. 10 (69-72), 93–95.

[7] Uklejewski R, Winiecki M, Rogala P. On the structural-adaptive compatibility of bone with porous coated implants on the base of the traditional one-phase and the modern two-phase poroelastic biomechanical model of bone tissue. Engineering of Biomaterials, 2006, Vol. 9 (54-55), 1–13.

[8] Winiecki M. The investigation on the microgeometrical constructional properties of porous endoosseous implants and the influence of these properties on the strength of the bone-implant model fixation, (in Polish), PhD Thesis, Poznan University of Technology, Faculty of Working Machines and Transportations, Poznan, 2006.

. . . . . . . . . . . .

#### 115

116

# ANALIZA NUMERYCZNA I DOŚ-WIADCZALNA ROTOTYPOWEGO, ROZPRĘŻNEGO GWOŹDZIA ŚRÓDSZPIKOWEGO

#### A.KAJZER\*, W.KAJZER, J.MARCINIAK

Politechnika Śląska, Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, ul. Konarskiego 18a, 44-100 Gliwice,Polska \*MAILTO: anita.kajzer@polsl.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 116-119]

## Wprowadzenie

Aktualnie, do leczenia złamań odłamów kostnych lansowane są elastyczne metody stabilizacji. Podstawowym celem tych metod jest zapewnienie mikroruchów odłamów kostnych, które stymulują powstawanie regenerującej się tkanki i różnicowanie jej struktury, począwszy od ziarniny przez tkankę włóknistą i chrzęstną, aż do uzyskania struktury kości pierwotnej.

Ostatnio, bardzo popularna stała się metoda leczenia śródszpikowego złamań kości z zastosowaniem rozprężnego gwoździa typu "Fixion IM Nail". Zastosowanie tego typu stabilizacji eliminuje potrzebę stosowania śrub blokujących [1-6].

#### Metodyka

#### Analiza numeryczna

W analizie numerycznej rozprężnego gwoździa śródszpikowego i układu gwóźdź śródszpikowy – kość udowa wykorzystano model numeryczny kości o następujących własnościach: moduł Young'a E=18600MPa, liczba Poisson'a  $\upsilon$ =0,3.

Model geometryczny rozprężnego gwoździa śródszpikowego wykonano w programie ANSYS. Dla potrzeb analizy przyjęto własności materiałowe stopu Ti-6AI-4V: moduł Young'a E=1,1·10<sup>5</sup> MPa, liczba Poisson'a v=0,33. Model geometryczny oraz po dyskretyzacji elementem typu SOLID95 układu kość udowa – rozprężny gwóźdź śródszpikowy przedstawiono na RYSUNKU 1. W celu przeprowadzenia analizy numerycznej układu zasymulowano złamanie proste kości

# NUMERICAL AND EXPERIMENTAL ANALYSIS OF THE NEW, EXPANSION INTRAMEDULLARY NAILS

#### A.KAJZER\*, W.KAJZER, J.MARCINIAK

SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, 18 KONARSKIEGO STR., 44-100 GLIWICE, POLAND \*MAILTO: ANITA.KAJZER@POLSL.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 116-119]

## Introduction

Nowadays, to stabilization of proximal femur in adults elastic methods of osteosynthesis are promoted. The basic aim of these methods is assuring micromovements of bone fragments that stimulate remodeling of bone by differentiation of its structure.

Application of a new expansion "Fixion IM" nails has become very popular treatment of long bone fractures. Application of these systems eliminates the need for interlocking screws [1-5].

## Methods

#### Numerical analysis

Numerical model of femur in the numerical analysis of the expandable intramedullary nail was applied. Young's modulus E=18600MPa and Poisson's ratio  $\upsilon$ =0,3 were assumed for femur model.

Geometrical model of expandable intramedullary nail was prepared in ANSYS. The following mechanical properties of Ti-6Al-4V alloy were selected: Young's modulus  $E=1,1\cdot10^{5}MPa$ , Poisson's ratio  $\upsilon=0,33$ .

Geometrical model and after discretization the SOLID 95 finite element of the analyzed femur – expandable intramedullary nail system was presented in FIGURE 1. The analysis was carried out for proximal simple fracture (100 mm below trochanter).

#### Numerical analysis

In order to carry out the calculations, appropriate initial



RYS.1. Model geometryczny układu kość udowa – gwóźdź śródszpikowy rozprężny: a) widok ogólny, b) gwóźdź śródszpikowy, c) rygiel, d) śruba blokująca, e) model po dyskretyzacji (SOLID95).

FIG.1. Geometrical model of the femur – expandable intramedullary nail system: a) view of the system, b) intramedullary nail, c) lock, d) blocking screw, e) discrete model of the system SOLID95.

w odcinku bliższym około 100mm poniżej krętarza.

#### Warunki brzegowe

Dla przeprowadzenia obliczeń niezbędne było określenie i zadanie warunków początkowych i brzegowych, które z odpowiednią dokładnością odwzorowywały zjawiska zachodzące w układzie rzeczywistym. Dla potrzeb analizy przyjęto następujące założenia:

 dolna część kości została unieruchomiona poprzez odebranie węzłom leżącym na płaszczyźnie wszystkich stopni swobody,

 część bliższą kości udowej obciążono wg schematu przedstawionego na RYSUNKU 2.

W celu możliwości porównania wyników analizy doświadczalnej z numeryczną zastosowano jedynie ściskanie układu (maksymalną siła ściskającą F=2000N, od 100N do 2000N) – RYS.2.

Zakres analizy obejmował wyznaczenie stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń zredukowanych według hipotezy wytężeniowej Hubera–Misesa–Henckiego:

• w zdrowej kości udowej,

 w elementach układu kość udowa – gwóźdź śródszpikowy wykonany ze stopu Ti-6AI-4V.

Obliczenia realizowano w programie ANSYS 11 przy wykorzystaniu komputera klasy PC (Procesor Intel Core 2 Duo E6600, 4 GB RAM, Windows Vista Ultimate 64 bit).

#### Analiza doświadczalna

Do badań doświadczalnych układu kość udowa – rozprężny gwoźdź śródszpikowy, wytypowano 3 modele kości udowej szwedzkiej firmy Sowbones o własnościach zbliżonych do własności mechanicznych kości ludzkiej.

Do kości został zaimplantowany gwoźdź środszpikowy rozprężny typu "Fixion IM Nail" (ze stopu Ti-6AI-4V) – RYS.3a,b. W celu porównania charakterystycznych wartości przemieszczenia analizę biomechaniczną przeprowadzono dla trzech modeli:

Model 1 – kość bez przecięcia,

 Model 2, 3 – kość z zaimplantowanymi gwoździami z przecięciem 100mm poniżej krętarza większego.

Do badań wykorzystano maszynę wytrzymałościową firmy Zwick/Roell Z100/SN5A. Czujniki rejestrowały wartości przemieszczeń w dwóch płaszczyznach: czołowej (wzdłuż osi x-czujniki 2,3,4) i strzałkowej (wzdłuż osi v-czujnik 1) - RYS.3c. Dodatkowo badano przemieszczenia w osi pionowej (z) rejestrowane przez układ pomiarowy na maszynie wytrzymałościowej. Przemieszczenia z czujników były rejestrowane co 100N. Od 10N do 2000N obciążanie i od 2000N do 10 N - odciążanie.

#### Wyniki

Porównanie wyników uzyskanych podczas analizy numerycznej i doświadczalnej obrazują wykresy na RYSUNKU 4. Przedstawiono wartości przemieszczeń dla poszczególnych punktów modeli odpowiadających wskazaniom



RYS.2. Schematyczna prezentacja warunków brzegowych zastosowanych w badaniach numerycznych. FIG.2. Loading scheme of model. and boundary conditions reflecting phenomena in real system were determined. The following assumptions were set:

 lower part of the femur was immobilized (all degrees of freedom of nodes on external surfaces of condyles were taken away),

• proximal part of femur was loaded according to the scheme presented in FIGURE 2.

The first stage of the analysis was determination of displacements, strains and stresses: in

healthy femur, in elements of the femur – expandable intramedullary nail made of Ti-6AI-4V alloy.

The obtained stresses and strains were reduced values according to the Huber-Misses-Henck hypothesis.

Calculations were carried out in ANSYS 11 with the use of PC of the following parameters: (Procesor Intel Core 2 Duo E6600, 4 GB RAM, Windows Vista Ultimate 64 bit).

#### **Experimental analysis**

Three femur – expansion intramedullary nails system were applied in experimental investigations. Research was performed on femur models produced by Swedish company Sawbones.

The intramedullary ",Fixion IM" nails (Ti-6AI-4V alloy) were implanted in to the bone - FIG.3.

In order to compare displacements characteristic a biomechanical analysis of three models was carried out:

• Model 1 – femur without fracture gap,

Model 2,3 – femur with expansion intramedullary nails
 – fracture gap was located 100

mm under greater trochanter.

The tests of the femur - expansion intramedullary nails system were carried out with the use of the test machine Zwick/Roell Z100/SN5A. The sensors registered displacements in the frontal (x direction - sensors 2, 3, 4) and sagittal (y direction - sensor 1) plane. Additionally, displacements in "z" direction were registered. Displacements were beeing recorded from the sensors every 100N from 10N to 2000N - loading and from 2000 N to 10N - unloading.

#### Results

Comparison between numerical and experimental investigation are presented in the FIGURE 4. This figure show displacement from the sensors I, II, III i IV (x i y) and vertical direction (z - 0) for three choosen models 1, 2 i 3. The numerical analysis was carried out in order



RYS.3. Model kości udowej -a), gwóźdź śródszpikowy rozprężny -b), rozmieszczenie czujników zegarowych- c)

FIG.3. Model of the femur – a), expansion intramedullary nail – b), displacement sensors set-up – c).



RYS.4. Porównanie wartości przemieszczenia od siły obciążającej (badania numeryczne i doświadczalne: a) czujnik I, b) czujnik II, c) czujnik III, d) czujnik IV, e) czujnik 0, f) wartości dla kość nieprzeciętnej. FIG.4. Displacements in the x, y direction as a function of loading for models 1, 2 and 3 for clock sensors 1 - a), (2 - b), (3 - c) i (4 - d), displacement of the vertical direction (z) - e, displacement for bone without fracture bone - f).

czujników: I, II, III, IV oraz 0.

W wyniku przeprowadzonych obliczeń numerycznych wyznaczono stan przemieszczeń, odkształceń i naprężeń zredukowanych. Maksymalne uzyskane wartości naprężeń zredukowanych były zlokalizowane w miejscu kontaktu rygla blokującego gwóźdź w odcinku bliższym kości udowej z gwoździem śródszpikowym. Wartości naprężeń w tym punkto calculate displacements, strains and stresses. Maximum reduced stresses were localized in the area of contact between the lock and the expandable intramedullary nail. In the contact point the maximum value was exceed Rp0.2=780MPa for the titanium alloy. Exceed of R<sub>p0,2</sub> value may cause permanent deformation of the lock. The obtained results in FEM analysis was confirmed by the results of experimental

researches where the MPa lock was 86,667 also permanently 346.667 distorted in 433.333 520 the area of 606.66 contact be-WYGIĘCIE



RYS.5. Koncentracja naprężeń w gwoździu – miejsce styku rygla z kością. FIG.5.

cie przekraczały wartość granicy plastyczności dla stopu Ti-6Al-4V, wynoszącą R<sub>p0,2</sub>=780MPa powodując trwałe odkształcenie i w rezultacie uszkodzenie rygla. Uzyskane podczas badań numerycznych wartości naprężenia potwierdzają uszkodzenie rygla w miejscu kontaktu z gwoździem śródszpikowym podczas badań doświadczalnych – RYS.5.

#### Podsumowanie

Przeprowadzona analiza wykazała, że charakter przemieszczeń w analizowanych punktach modeli w warunkach badań doświadczalnych i numerycznych był zbliżony. Zauważono podczas badań laboratoryjnych układu kość – gwóźdź odkształcenie się górnego rygla, co odpowiada uzyskanym w tym obszarze, maksymalnym wartościom odkształceń i naprężeń w modelach podczas analizy numerycznej. Wartości przemieszczeń uzyskane podczas analizy doświadczalnej charakteryzują się mniejszymi wartościami niż uzyskane w analizie numerycznej. Wiąże się to z warunkami brzegowymi przyjętymi do obliczeń.

#### Conclusion

The obtained results of the numerical and experimental analysis shows that the character of displacement of the specified points of the models were similar. Maximal deformation of the system in experimental researches was located in the lock of the nail in the area of contact between the lock and the expandable intramedullary nail. That results corresponding with the results of the numerical analysis where the maximal strains and stresses were located in the lock in proximal part of the nail. The value of displacement determined during experimental analysis was lower then displacement determined in numerical analysis. It seems that the difference in the obtained results was caused by the border conditions established during the numerical analysis.

## Piśmiennictwo

[1] Marciniak J., Chrzanowski W., Krauze A., Gwoździowanie śródszpikowe w osteosyntezie. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2006, pp. 15-120.

[2] Lepore S., Capuano N., Lepore L., Jannelli P., Clinical and Radiographic Results with the Fixion Intramedullary Nails: An Inflatable Self-Locking System for Long Bone Fracture, OsteoTrauma Care, 10/2002; pp. 32-35.

[3] Lepore S., Capuano N., Lepore L., Romano G., Preliminary clinical and radiographic results with the Fixion intramedullary nail: an inflatable self-locking system for long bone fractures, Journal of Orthopaedics and Traumatology 3/2000, pp. 135-140.

#### References

[4] Steinberg E., Tauber M., Blumberg M., Izquerdo F., Dekel S., Role of Fixion™ IM in the management of acute traumatic diaphyseal humeral fractures (preliminary study results). Orthopaedic Trauma Association Meeting 2001, San-Diego 2002.

[5] Kajzer A., Kajzer W., Marciniak J.: Osteosynthesis with the use of expansion intramedullary nails. Engineering of Biomaterials, (Inżynieria Biomateriałów), Numer 77-80, Volume XI, Rok XI, ISSN 1429-7248, pp. 74-76.

[6] Kajzer W., Krauze A., Kaczmarek M., Marciniak J.: FEM analysis of the expandable intramedullary nail. Conference on Information Technologies in Biomedicine June 16 - 18, 2008. Advances in soft computing 47, 2008 Springer-Verlag, pp. 537-544.

#### •••••

# SIŁA WIĄZANIA UKŁADU METAL-CERAMIKA W ZASTOSOWANIACH STOMATOLOGICZNCYH

MAŁGORZATA LUBAS\*, JÓZEF JASIŃSKI, LEOPOLD JEZIORSKI

Politechnika Częstochowska, Instytut Inżynierii Materiałowej, Al. Armii Krajowej 19, 42-200 Częstochowa, Polska \*MAILTO:mlubas@mim.pcz.czest.pl

#### Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań stanu powierzchni próbek ze stopu kobaltowo-chromowego po przeprowadzanej obróbce mechanicznej z zastosowaniem różnych mediów piaskujących (mieszanina Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+SiO<sub>2</sub> oraz tradycyjnie stosowany piasek korundowy - Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Wpływ mechanicznej obróbki na jakość powierzchni, określono na podstawie badań topografii powierzchni próbek metalicznych z zastosowaniem mikroskopu sił atomowych AFM. Przeprowadzone badania pozwoliły określić podstawowe parametry chropowatości R<sub>a</sub> i R<sub>z</sub>. Ponadto określono wpływ medium piaskującego na trwałość połączenia uzyskanych próbek ceramiczno-metalowych, stosując

# SHEAR BOND STRENGTH OF CERAMIC - METAL SYSTEM FOR THE DENTAL APPLICATIONS

#### MAŁGORZATA LUBAS\*, JÓZEF JASIŃSKI, LEOPOLD JEZIORSKI

Technical University of Czestochowa, Institute of Materials Science, 19 Armii Krajowej Ave., 42-200 Czestochowa, Poland \*MAILTO: mlubas@mim.pcz.czest.pl

#### Abstract

In this paper the influence of sanding material type used for sand blasting mechanical treatment of cobalt-chromium alloy for metal to porcelain shear bond strength was investigated. Corundum sand (Al<sub>2</sub>03) and corundum (Al<sub>2</sub>0<sub>3</sub>)+silica (SiO<sub>2</sub>) mixture was used as a sand blasting process medium. Metallic elements surface topography after sand blasting process was determined using AFM microscopy. Basic roughness parameters,  $R_a$  i  $R_z$  were also investigated. Two specimens series were tested for a shear load on a universal testing machine using a 1mm/min crosshead speed. Each series single specimen was tested on a tirpoint bending machine for failure stress (MPa) determination and observed using SEM microscopy. Re-

31 MATERIALS

119

120

mikroskopię świetlną, skaningową oraz próbę zginania dwupunktowego. Wyniki badań wytrzymałościowych wykazały większą wytrzymałość połączenia dla próbek piaskowanych mieszaniną  $AI_2O3$  i SiO<sub>2</sub> -  $\sigma_2$ =54MPa ( $\sigma_1$ =49MPa - próbki piaskowane  $AI_2O_3$ ).

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 119-122]

#### Wprowadzenie

Metale i ich stopy wraz z materiałami ceramicznymi stanowią znaczny udział materiałów stosowanych w stomatologii, zarówno w protetyce jak i ortodoncji. Połączenie tych dwóch rodzajów materiałów wykorzystywane jest głównie w protetyce, do wykonywania między innymi impalntów dentystycznych i licówek. Konstrukcje tego typu umożliwiają połączenie wytrzymałości mechanicznej odlewu metalowego z estetyką porcelany [1,2]. Wykonanie aparatów jest jednak procesem dość trudnym, głównie ze względu na różnice w charakterze wiązań chemicznych występujących w tych materiałach. Natura wiązań zmienia się skokowo na granicy metal-ceramika, przy przejściu od sieci metalicznej do jonowo-atomowej [3]. W ostatnich latach prowadzone prace na temat połączeń metal-ceramika dentystyczna dowodzą, że zakres siły połączeń dla stopów metalicznych (Co-Cr, Ni-Cr) mieści się w zakresie 35÷96MPa [4]. Aby poprawić trwałość złącza ważną rolę odgrywają warstwy pośrednie między metalem i porcelaną dentystyczną, które coraz częściej wytwarzane są w tym układzie metal-ceramika [5].

#### Materiał oraz metodyka badań

Do badań zastosowano stop kobaltowo – chromowy o składzie: Co–65%mas., Cr–32,0%mas, Mo-3,5%mas, Si–2,0%mas, Fe<1,0%mas, Al<1,0%mas), który stanowił podłoże dla porcelany dentystycznej Synspar.

W celu określenia wpływu obróbki mechanicznej na stan powierzchni oraz siły połączenia, przeprowadzono proces piaskowania w dwóch seriach przy ciśnieniu ~3,9 bar. W serii 1 jako medium użyto piasek korundowy (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o uziarnieniu 50µm. Dla serii 2 zastosowano mieszaninę: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (80%) o wielkości ziaren 75µm i SiO<sub>2</sub><20µm (20%). W ramach badań przeprowadzono badania topografii powierzchni po procesie piaskowania, a następnie na metaliczne podłoże nałożono odpowiednie warstwy ceramiczne: opaker, dentyna I, -dentyna II, według zaleceń producenta i wypalono w zakresie temperatur 935°C÷990°C, w zależności od nakładanej warstwy. Wszystkie parametry procesu wypalania (temperatura początkowa, czas suszenia, przyrost temperatury, próżnia, temperatura końcowa) realizowano automatycznie w piecu Jeneric/Pentron 1200 Porcelain Fournace.

Wpływ procesu piaskowania na jakość powierzchni podłoża metalicznego oraz trwałość połączenia metal - porcelana dentystyczna określono na podstawie badań: mikroskopu sił atomowych MultiMode V (Veeco Instruments), mikroskopii skaningowej (Hitachi S-4700) oraz próby trójpunktowego zginania, określając wytrzymałość łączenia metal-ceramika zgodnie z normą ISO 9693 [6]. Wyniki AFM przedstawiono w postaci parametrów chropowatości powierzchni R<sub>a</sub> i R<sub>z</sub> według normy PN-EN ISO 4287:1999 [7].

# Wyniki badań

Jednym z głównych czynników decydujących o uzyskaniu prawidłowego połączenia, bezpośrednio wpływającym na jakość układu, jest powierzchnia rozdziału podłoże metalowe – porcelana. Duże znaczenie ma również stan powierzchni podłoża metalicznego. sults showed higher metal to porcelain bond strength for samples that were sand blasted with corundum  $Al_2O_3$ +silica SiO<sub>2</sub> mixture,  $\sigma_2$ =54MPa, as compared with corundum sand blasted samples  $\sigma_1$ =49MPa. [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 119-122]

## Introduction

Metallic materials and alloys interconnection with ceramics are commonly used in dental. prosthodontia and ortodonthics. Junction of these materials is used mainly in prosthodontia for dentistry implants and facing tile production. Such interconnections give ability to obtain mechanical metallic material strength coupled with porcelain aesthetics [1,2]. Execution of these materials is rather difficult mainly because of differences in chemical bonding between materials. Chemical Bonding nature transforms in stroke on the metal-ceramic boundary and transform from metallic to ionic-atomic lattice [3]. Recent experiments demonstrate that bond strength of (Co-Cr, Ni-Cr) alloys is among 35÷96MPa [4]. For the improvement of metal to dentistry porcelain interconnection, valid role perform layers produced in metalceramic system [5].

## Materials and methods

Metal substrate for dental porcelain Synspar was (Co-Cr-Mo-Si-Fe) alloy with chemical analyses as follows alloy Co-65%mas., Cr-32,0%mas, Mo-3,5%mas, Si-2,0%mas, Fe<1,0%mas, Al<1,0%mas). For mechanical treatment influence on interconnection (bond) strength and surface state determination, two series of sand-blasting process near 3,9 bar was made. First series, corundum (50µm) was used as a blasting medium. Second series sand blasting medium used was 80% corundum (75µm) and 20% silica (<20µm) mixture. After sand blasting process surface topography researches were made. Afterwards alloy surface, was coated with ceramic layer Opaker, Dentyna I, Dentyna II and fired in 935°C and 990°C according to layer type. Firing process parameters (Initial Temperature, Predrying Time, Temperature Rise, Vacuum, Final Temperature) were automatically set in Jeneric/Pentron 1200 Porcelain Fournace. Sand blasting effect on the metallic surface quality and metal to dental porcelain interconnection durability was investigated using AFM microscopy (method) MultiMode V (Veeco Instruments), SEM microscopy (Hitachi S-4700) and tripoint bending test in accordance to ISO 9693 standard [6]. Results of AFM microscopy are shown in surface roughness parameters form according to PN-EN ISO 4287:1999 standard. [7].

## Results

Main factor which decide about correctness of alloy to ceramic interconnection is interface substrate (metal) – dentistry porcelain. Metallic surface mechanical treatment has also high influence on an alloy to ceramic interconnection. Surface topography results present that mechanical treatment using different sand blasting medium has a high effect on the surface roughness (TABLE 1).

Surface roughness depth for initial state samples amount 369nm. Maximum value 455 nm was obtained for first series probe that was sand blasted with corundum. Surface roughness results demonstrated that fine SiO<sub>2</sub> particles caused surface roughness decrease (R<sub>2</sub>=232nm). Addition of 20% SiO<sub>2</sub> (<20um) caused kinetic-chemical reaction and surface roughness decrease as a result of fine particles setting on the rough substrate surface. Large specific surface of SiO<sub>2</sub>

Parametry/parameters	Próbka w stanie wyj cio- wym/ Initial state surface Próbka po piaskowaniu Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> / Sand-blast cleaned surface Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		Próbka po piaskowaniu Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +SiO <sub>2</sub> / Sand-blast cleaned surface (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +SiO <sub>2</sub> )	
rednie arytmetyczne odchylenie profilu nie- równo ci od linii redniej, R <sub>a</sub> , [nm] Roughness profile mean derivation R <sub>a</sub> , [nm]	387	416	398	
Najwi ksza wysoko nierówno ci, R <sub>max</sub> , [nm] Maximum roughness dpeth R <sub>max</sub> , [nm]	3795	6735	4043	
Wysoko nierówno ci, R <sub>z</sub> , [nm] Roughness depth, R <sub>z</sub> , [nm]	369	455	232	

TABELA 1. Parametry chropowatości powierzchni podłoża metalicznego po procesie piaskowania TABLE. 1 The parameters characterizing the roughness of a metallic surface in initial state and after sand blasting process.

Uzyskane wyniki topografii powierzchni wykazały, iż przeprowadzona obróbka mechaniczna z zastosowaniem różnych mediów piaskujących ma istotny wpływ na jej hropowatość (TABELA 1).

Wysokość chropowatości powierzchni - R<sub>z</sub>, dla próbek w stanie wyjściowym wynosi 369nm. Najwyższą wartość R<sub>z</sub>=455nm otrzymano dla próbek serii 1, piaskowanych Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Badania topografii powierzchni wykazały, że drobne cząstki SiO<sub>2</sub> spowodowały zmniejszenie chropowatości powierzchni (R<sub>2</sub>=232nm). Zastosowany dodatek bardzo drobnych cząstek SiO<sub>2</sub>, poniżej 20µm, spowodował natomiast zajście reakcji kinetyczno - chemicznej w wyniku, której nastąpiło osadzenie tych cząstek na chropowatej powierzchni podłoża metalicznego i tym samym obniżenie wartości podstawowych parametrów chropowatości. Ponadto duża powierzchnia właściwa cząstek SiO<sub>2</sub>, może wpływać na zwiększenie ich aktywności chemicznej w procesach zachodzących podczas wypalania kolejnych warstw ceramicznych i przyczyniać się do uzyskania lepszego połączenia układu metal-ceramika.

Wyniki badań wytrzymałości złączenia metal – porcelana dentystyczna, na podstawie metody trójpunktowego zginania, wykazały, iż zastosowany dodatek SiO<sub>2</sub> wpływa korzystnie na jakość połączenia. Średnia wartość wytrzymałości dla próbek z serii 1 wynosi 49MPa, natomiast dla serii 2 - 52MPa, (RYS.1).

Uzyskane wyniki spełniają podstawowe wymaganie stawiane połączeniom stomatologicznym z podłożem metalicznym. Zgodnie z normą ISO9693 minimalna wartość



RYS.1. Wyniki badań przyczepności połączenia metal-ceramika dla obu serii. FIG.1. Results of the bond strength for both series of metal – ceramic system.

has a high influence on their activity increment during the firing process of succeeding ceramic layers and contribute to obtain righteous metal to ceramic interconnection. Strength results of metal to dentistry porcelain interconnection were based on tripoint bending method which showed that  $SiO_2$  addition favorably effects on the interconnection life. Mean strength value for the first series samples is 49 MPa and for the second series 52MPa (FIG.1.)

Results fulfil requirements for metal substrate dentistry interconnections according to ISO9693. Minimal value for metal substrate dental bonds is 25MPa according to ISO9693 [6]. Results showed that sand blasting mixture using has an influence on metallic to porcelain intercon



RYS.2. Struktura połączenia układu metal – porcelana dentystyczna; a) piaskowanie  $Al_2O_3$ , b) piaskowanie  $Al_2O_3+SiO_2$ , pow. x100.

FIG.2. Structure of joint metal – dental porcelain: a) sand-blasting  $AI_2O_3$  b) sand blasting  $AI_2O_3+SiO_2$ . Mag. x100.

dla połączeń stomatologicznych musi przyjmować wartość powyżej 25MPa [5]. Wyniki badań wykazały, iż zastosowanie mieszaniny piaskującej Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+SiO<sub>2</sub>, wpływa na wzrost wytrzymałości uzyskanych połączeń Dane literaturowe, ostatnich lat, dotyczące połączeń metalicznych na bazie stopów kobaltowo-chromowych wykazały, iż wartość wytrzymałości połączenia metal-ceramika, dla zastosowań stomatologicznych mieści się w dość szerokim zakresie 35÷95MPa. Na wartości te mają wpływ głównie: skład chemiczny oraz rodzaj stopu (producent), właściwie dobrane współczynniki rozszerzalności cieplnej, jak również wytworzone warstwy pośrednie między metalem a ceramiką oraz wstępna obróbka mechaniczna [4].

Wyniki badań mikroskopowych, dla próbek piaskowanych Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, wykazały obecność większej ilości pęcherzy w obszarze łączenia metal-ceramika, w porównaniu z próbkami piaskowanymi mieszaniną Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+SiO<sub>2</sub> (RYS.2). Obserwowane pęcherze stanowią poważny problem podczas eksploatacji uzupełnień stomatologicznych (koron, licówek). Mogą powodować powstawanie, a w następstwie rozprzestrzenianie pęknięć oraz odprysków warstw ceramicznych w wyniku, czego doprowadzają do defektu estetycznego oraz dyskomfortu pacjenta.

#### Wnioski

1. Rodzaj medium piaskującego w dużym stopniu decyduje o stanie powierzchni podłoża metalowego. Próbki piaskowane Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, uzyskały największe wartości chropowatości -R<sub>z</sub>=455nm, a dodatek krzemionki zmniejsza chropowatość, R<sub>z</sub>=232nm.

2. Drobne cząstki SiO<sub>2</sub> zastosowane w obróbce mechanicznej, wpływają na zwiększenie aktywności chemicznej podczas procesu wypalania warstw ceramicznych. Powodują obniżenie temperatury spiekania porcelany dentystycznej, co prowadzi do wydzielenia większej ilości fazy szklistej i lepszego połączenia metal - ceramika.

 Średnia wartość wytrzymałości połączenia metalceramika dla próbek serii 1 wynosi 49MPa, natomiast dla serii 2 - 52MPa. nection strength. Recent literature data referred to Co-Cr base alloys proved that metal to ceramic bond for dentistry prosthodontia strength is between 35÷95MPa. Results mostly depends on an alloy chemical constitution, producer, thermal expansion value and intermediary layers between metal and ceramics.

Microscope results for samples sand blasted with corundum showed larger quantity of blisters presence in metal to ceramic interconnection in comparison to samples sandblasted with corundum and SiO<sub>2</sub> mixture (FIG.2.) Unfavourably influence of porous show the strength results. Porous structure become a problem during exploitation of tooth crown and facing tile with reason of surface checking and in result lead to aestethetical defect and patient discomfort.

#### Conclusion

. . . . . . . . . . . . . . .

1. Sand-blasting process medium highly decide on the base material surface state. Samples sand-blast cleaned with corundum had better roughness, where  $SiO_2$  addition decrease roughness to 232nm

2. Silica fine particles used in mechanic treatment have a big influence on chemical activity increment of ceramic layers during firing process, decrease firing temperature and improve metal – ceramic interface.

3. Metal to ceramic interconnection strength mean value for the first series samples amount 49, for the second series: 52MPa

#### Piśmiennictwo

[1] Raszewski Z.: Materiały do licowania koron i mostów, Nowoczesny Technik .Dentystyczny 3, 2006

[2] Atsü S. Berksan S.: Bond strenght of three porcelains to two form sof titanium Rusing two friting atmospheres, The Journal of Prosthetic Dentistry 5, 2000

[3] Stoch L.: Materiały szkło-ceramiczne dla stomatologii estetycznej, Szkło.i ceramika 6, 2005 [4 ]Morale Joasi R., Nisie Tango R., Junho de Araujo J. E., et all: Shear bond strength of ceramic to Co-Cr alloys, The Journal of Prosthetic Dentistry, Volume 99, Issue 2008

References

 [5] Song Z. X., Xu K. W., Chen H.: Thin Solid Films 468, 2004
 [6] International Organization for Standardization. ISO 9693:1999, Metal-ceramic dental restorative system
 [7]PN-EN ISO 4287:1999

122

# MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI BIOMATERIAŁÓW CHITOZANO-WYCH PRZEZ DODATKI HYDROLIZATÓW KERATYNY

J.Skopińska-Wiśniewska\*, A.Sionkowska, J.Kozłowska, A.Płanecka

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, WYDZIAŁ CHEMII, UL.GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ \*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 123-125]

#### Wstęp

W ostatnich latach biodegradowalne polimery naturalne, takie jak białka i polisacharydy, są coraz szerzej stosowane w medycynie oraz biotechnologii. Nasza uwaga skupiła się na keratynie i chtozanie jako biopolimerach wykazujących zarówno biodegradowalność jak i biokompatybilność. Właściwości te sprawiły, że znalazły one zastosowanie przy wytwarzaniu opatrunków, implantów, bioaktywnych powierzchni, czy trójwymiarowych struktur imitujących macierz międzykomórkową dla inżynierii tkankowej [1-3].

Chitozan jest polisacharydem uzyskiwanym przez deacetylację chityny – podstawowego budulca pancerzyków niektórych bezkręgowców. Dzięki obecności wolnych grup aminowych wykazuje on dobrą rozpuszczalność w roztworach kwasów i reaktywność chemiczną. Charakteryzuje się on także zmianą właściwości w zależności od rodzaju roztworu wodnego otaczającego materiał chitozanowy. Powierzchnia materiałów na bazie chitozanu przejawia dość dużą hydrofilowość, dzięki czemu sprzyja adhezji, różnicowaniu i proliferacji komórek. Pomimo tych atrakcyjnych cech, właściwości materiałów chitozanowych często jednak nie są zadowalające ze względu na ich niską wytrzymałość mechaniczną [3-6].

Keratyny to rodzina białek strukturalnych, stanowiących podstawowy budulec zewnętrznej okrywy ciała ptaków, gadów, czy ssaków, np. piór, paznokci, sierści, włosów, rogów, wełny. Charakterystyczną cechą tego białka jest duża zawartość cysteiny. Utlenione reszty tego aminokwasu mogą tworzyć wewnątrz- i międzycząsteczkowe wiązania disulfidowe, co w efekcie prowadzi do powstania trójwymiarowej, usieciowanej struktury sieci keratynowej. Zdolność ta decyduje o mechanicznych, termicznych i chemicznych właściwościach białka [1,2,7-10]. Niestety zjawisko to powoduje także nierozpuszczalność keratyny. W konsekwencji, ogromna większość uzyskiwanych obecnie materiałów keratynowych zawiera zmodyfikowane reszty cysteiny i zakłóconą strukturę przestrzenną. To sprawia, że filmy uzyskane metodą odparowywania rozpuszczalnika są zbyt kruche by można było poddać je manipulacjom.

Celem pracy było zbadanie wpływu dodatku hydrolizatów keratyny na właściwości mechaniczne i stabilność termiczną biomateriałów chitozanowych.

# Materiały i metodyka badań

Chitozan (o niskiej masie cząsteczkowej) zakupiono w Sigma-Aldrich.

Hedrolizaty keratyny otrzymano przez oczyszczenie i hydrolizę piór kurzych w roztworze wodnym zawierającym mocznik (8mol/dm<sup>3</sup>), dodacylosiarczan sodu (SDS, 0,26mol/dm<sup>3</sup>), 2-merkaptoetanol (1,66mol/dm<sup>3</sup>) w temp. 50°C przez

# THE MODIFICATION OF BIOMATERIALS PROPERTIES BY ADDITION OF KERATIN HYDROLYZATES

J.Skopińska-Wiśniewska\*, A.Sionkowska, J.Kozłowska, A.Płanecka

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY, 7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND \*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 123-125]

#### Introduction

In recent years, naturally derived biodegradable polymers such as proteins and polysaccharides have been widely used to obtain materials for application in biomedical and biotechnological fields. Our attention have been focused on keratin and chitosan due to their biocompatibility and biodegradability. The both biopolymers can be designed for creation of wound dressings, implantable devices, bioactive surfaces for tissue engineering and three-dimensional scaffolds which take the role of extracellular matrix analogs [1-3].

Chitosan is the product of the deacetylation of chitin – the biopolymer, which is the primary component of arthropod exoskeletons. Due to presence of free amine groups chitosan reveals great solubility in acid solutions, chemical reactivity and water attractive properties. The surfaces of chitosan-based materials exhibit hydrophilicity, which favor cell adhesion, differentiation and proliferation but very often their mechanical properties are not satisfactory [3-6].

Keratins are a family of a structural proteins which are a main components of outer covering such as hair, wool, feathers, nails, horns and stratum corneum of mammalians, reptiles and birds. The most characteristic feature of this fibrous protein is the high content of cysteine residues. It provides to creation of inter- and intramolecular disulfide bonds and, as a result, the three-dimensionally linked network of keratin. This process decides about mechanical, thermal and chemical properties of keratins [1,2,7-10]. Unfortunately it also causes the insolubility of keratin, so the most of keratin-based materials are obtained with chemically modified cysteine residues. Consequently, the films prepared by casting keratin solutions are to fragile to handle.

The aim o this work was to study the influence of addition of different amounts of keratin hydrolysates on the mechanical properties and thermal stability of chitosan biomaterials.

## Materials and methods

Chitosan (low molecular weight) was obtained from Sigma-Aldrich.

Keratin was obtained from chicken feather. After purification, the material was hydrolyzed in aqueous solution containing urea (8mol/dm<sup>3</sup>), sodium dodecyl sulphate (SDS, 0,26mol/dm<sup>3</sup>), 2-mercaptoethanol (1,66mol/dm<sup>3</sup>) at the temperature 50oC for 16 hours. Then the insoluble parts were separated by filtration and the solution was dialyzed against deionised water for 3 days and liophylized. The solution of keratin hydrolysates was obtained by dissolving of suitable amount of keratin powder in water. 123

Biopolymeric blends were prepared by mixing of chi-





16 godz. Nierozpuszczalna pozostałość została odfiltrowana. Uzyskany roztwór poddano dializie względem wody dejonizowanej przez 3 dni, a następnie zliofilizowano. Roztwór hydrolizatów keratyny uzyskano przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości proszku keratynowego w wodzie.

Mieszaniny biopolimerowe otrzymano przez zmieszanie chitozanu i keratyny odpowiednich stosunkach wagowych (95/5, 85/15, 70/30) i oznaczono je odpowiednio jako 5% 15%, 30%. Roztwory wylano na płyty szklane i w wyniku odparowania rozpuszczalnika uzyskano filmy.

Analizę termiczną przeprowadzono przy użyciu TA Instruments SDT 2960 z szybkością grzania 10°C/min w zakresie temp. 20-600°C, w atmosferze azotu.

Właściwości mechaniczne badano na maszynie wytrzymałościowej Zwick&Roell Z 0.5.

## Wyniki i dyskusja

Krzywe TG i DTG degradacji termicznej keratyny i mieszaniny chitozan/keratyna 30% przedstawiono na RYS.1. Zaobserwowano, że keratyna ulega przemianom ter

	Chitosan	5%	15%	30%	Keratin		n
t <sub>1</sub> [ºC]	77	65	71	67	55,3		
m₁ [%]	14,6	13,1	11,4	10,5		7	
t <sub>2</sub> [ºC]	284	288	291	264	221	227	322
m <sub>2</sub> [%]	49,8	56,6	52,7	58,9	20,1	17,4	34,8

TAB.1. Wartości temperatur i ubytków masy poszczególnych etapów degradacji termicznej chitozanu, keratyny i ich mieszanin.

TAB.1. Values of thermal parameters of chitosan and its blends with keratin determined by thermal analysis. tosan and keratin hydrolysates solutions in appropriate weight ratios (95/5, 85/15, 70/30) signed as 5%, 15% and 30% respectively. Then the films were obtained by solvent evaporation from solutions poured onto glass plates.

Thermal analysis was performed using TA Instruments SDT 2960 at a rate of 10°C/min from 20 to 600°C in an atmosphere of nitrogen.

The mechanical properties have been investigated by Zwick&Roell Z 0.5.

## **Results and discussion**

TG and DTG curves of thermal destruction of keratin and chitosan/keratin 30% blend are presented in FIG.1.

We observed that keratin destruction had been proceeded in four stages. The first one was an effect of evaporation of water connected with protein. In the next stages bounded water was released and small molecular products of thermal degradation of keratin were liberated. The chitosan and

	Chitosan	5%	15%	30%
σ <sub>γ</sub> [MPa]	64,2	68,1	61,9	52,1
ε <sub>γ</sub> [MPa]	3,5	2,5	2,6	4,6
σ <sub>в</sub> [MPa]	55,4	58,7	51,9	46,5
ε <sub>в</sub> [MPa]	15,1	6,2	8,4	6,4

TAB.2. Wartości naprężenia na granicy plastyczności ( $\sigma_{\gamma}$ ) i przy zerwaniu ( $\sigma_{B}$ ) oraz wydłużenia względnego na granicy plastyczności ( $\epsilon_{\gamma}$ ) i przy zerwaniu ( $\epsilon_{B}$ ) dla filmów chitozu i jego mieszanin z keratyną.

TAB.2. The values of ultimate tensile strength at a yield point ( $\sigma_{\rm Y}$ ) and at breaking point ( $\sigma_{\rm B}$ ) and ultimate percentage elongation at a yield point ( $\epsilon_{\rm Y}$ ) and at breaking point ( $\epsilon_{\rm B}$ ) of chitosan films, and its blends with keratin.

micznym w czterech etapach. Pierwszy z nich związany jest z parowaniem wody obecnej w strukturze białka. W kolejnych etapach uwalniana jest woda zwiazana oraz małocząsteczkowe produkty termicznego rozkładu keratyny. Natomiast na termogramach filmów chitozanowych oraz mieszanin widoczne są tylko dwa etapy degradacji. Najwyższą temperaturę dla procesu odparowania wody zaobserwowano w przypadku chitozanu, a dodatek keratyny obniża jej wartość, TAB.1. Film chitozanowy charakteryzuje się także największym ubytkiem masy w tym etapie przemian termicznych, a wzrost zawartości keratyny w materiale powoduje obniżenie ilości wody ulegającej odparowaniu. Sugeruje to, że dodatek keratyny obniża hydrofilowość materiału chitozanowego. Drugi pik na krzywej DTG chitozanu, charakteryzujący maksymalną szybkość procesu termicznego rozkładu próbki, zanotowano przy temp. 284°C. Niewielki dodatek keratyny (5, 15%) poprawia nieznacznie stabilność termiczną materiału, jednak 30% udziału białka w mieszaninie obniża tą wartość, TAB.1. Ubytek masy próbki wzrasta wraz z zawartością keratyny w próbce, by osiągnąć maksymalna wartość dla czystego białka (72,3% przy uwzględnieniu ostatnich trzech etapów degradacji)

Wartości parametrów mechanicznych takich jak naprężenie na granicy plastyczności ( $\sigma_v$ ) i przy zerwaniu ( $\sigma_B$ ) oraz wydłużenie względne na granicy plastyczności ( $\epsilon$ Y) i przy zerwaniu ( $\epsilon_B$ ) zestawiono w TABELI 2. Stwierdzono, że 5% dodatek keratyny poprawia wytrzymałość filmów chitozanowych zarówno przy granicy plastyczności jak i zerwaniu, jednak niekorzystnie wpływa na wartość wydłużenia względnego. Prawdopodobnie efekt ten jest spowodowany powstawaniem międzycząsteczkowych wiązań wodorowych między składnikami materiału. Większy udział keratyny w filmie (15, 30%) powoduje pogorszenie właściwości mechanicznych. Wysoka zawartość keratyny, pomimo tworzenia wiązań poprzecznych, powoduje destabilizację struktury filmu, najprawdopodobniej ze względu na zbyt małą długość łańcuchów białkowych.

#### Wnioski

Na podstawie badań stwierdzono, że mały dodatek hydrolizatów keratyny (5%) do chitozanu poprawia wytrzymałość materiału, jednak zwiększenie dodatku białka niekorzystnie wpływa na właściwości mechaniczne. Także stabilność termiczna materiałów chitozanowych nieznacznie rośnie w obecności niewielkich ilości keratyny. Można także przypuszczać, że materiały zawierające keratynę będą wykazywały mniejszą zdolność do absorpcji wody niż filmy z czystego chitozanu.

#### Piśmiennictwo

[1] A. Aluigi, M. Zoccola, C. Vineis, C. Tonin, F. Ferrero, M. Canetti, Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid, Int. J Biol. Macromol. 2007, 41, 266-273

[2] A. Kurimoto, T. Tanabe, A. Tachibana, K. Yamauchi, Keratin sponge: immobolization of lysozyme, J Biosc. Bioeng. 2003, 96, 307-309

[3] H.J. Chun, G.-W. Kim, C.-H. Kim, Fabrication of porous chitosan scaffold in order to improve biocompatibility, J Phys. Chem. Sol. Stat. 2008, 69, 1573-1576

[4] L. Zhao, J. Chang, Preparation and characterization of macroporous chitosan/wollastonite composite scaffolds for tissue engineering, J Mat. Sci.: Mat. Med. 2004, 15, 625-629

[5] O.C. Wilson JR., J.R. Hull, Surface modification of nanophase hydroxyapatite with chitosan, Mat. Sci. Eng. C 2008, 28, 434-437

chitosan/keratin films underwent the thermal changes only in two stages. The temperature of the water evaporation was the highest for chitosan film and addition of keratin decreased this value, TAB.1. Also the highest value of weight loss at the firs stage for chitosan sample was observed. As the keratin content in samples had increased, the loss of water was smaller, TAB.1. It suggests that addition of keratin has decreased the hydrophilicity of chitosan films. The second peak on the DTG curve of chitosan sample appeared with a maximum at 284°C. Small additions of keratin (5, 15%) improved slightly the thermal stability of blends, while the samples with high content of the protein exhibited the lower temperature of the maximum speed of the thermal degradation, TAB.1. The weight loss increased with the higher amount of keratin in the sample and accomplished the maximum value for pure keratin (72,3% as a sum of three stages), TAB.1.

Mechanical properties as ultimate tensile strength at a yield point ( $\sigma_v$ ) and at breaking point ( $\sigma_B$ ) and ultimate percentage elongation at a yield point ( $\epsilon_v$ ) and at breaking point ( $\epsilon_B$ ) of chitosan films and its blends with keratin are presented in TABLE 2. The 5% of addition of keratin hydrolysates to chitosan material improved its strength, at the yield point as well as at breaking point while the ultimate percentage of elongation exhibited the lowest value. Probably the intermolecular hydrogen bonds between both biopolymers had been created. However, the films containing 15% and 30% of keratin hydrolysates were less strong. High amount of keratin, despite of formation of hydrogen bonds, have destabilized the structure of the materials, probably because of too low length of keratin chains.

#### Conclusion

. . . . . . . . . . . . . . . .

Our study demonstrated that small addition (5%) of keratin hydrolysates to chitosan biomaterial improved its mechanical strength. However higher amount of keratin in film decreased its mechanical parameters. Also thermal stability increased with the small addition of keratin. We can also expect that absorption of water will be smaller for keratin/chitosan blends than for pure polysaccharide.

#### References

[6] S.V. Madihally, H.W.T. Mattew, Porous chitosan scaffolds fro tissue engineering, Biomaterials 1999, 20, 1133-1142

[7] A. Vasconcelos, G. Freddi, A. Cavaco-Paulo, biodegradable materials based on silk fibroin and keratin, Biomacromolecules 2008, 9, 1299-1305

[8] P. Sierpinski, J. Garrett, J. ma, P. Apel, D. Klorig, T. Smith, L.A. Koman, N. Atala, M. Van Dyke, The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripherial nerves, Biomaterials 2008, 29, 118-128

[9] M. Zoccola, A. Aluigi, C. Vineis, C. tonin, F. Ferrero, M.G. Piacentino, Study on cast membranes and electrospun nanofibres made from keratin/fibroin blends, Biomacromolecules 2008, 9, 2819-2825

[10] T. Tanabe, N. Okitsu, A. Tachibana, K. Yamauchi, Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film, Biomaterials 2002, 23, 817-825 125



# MIKROSTRUKTURA I WŁAŚCIWO-ŚCI STOPU Ti-6AI-7Nb PO DYFUZYJNEJ OBRÓBCE UTWARDZAJĄCEJ TLENEM

T.Moskalewicz<sup>1\*</sup>, B.Wendler<sup>2</sup>, S.Zimowski<sup>1</sup>, S.Milc<sup>1</sup>, A.Czyrska-Filemonowicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akademia Górniczo-Hutnicza, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

<sup>2</sup>Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 1, 90-924 Łódź \*MAILTO: tmoskale@agh.edu.pl

#### Streszczenie

W pracy przedstawiono charakteryzację mikrostruktury, właściwości mikro-mechanicznych i tribologicznych stopu Ti-6AI-7Nb w stanie dostawy oraz po obróbce utwardzającej tlenem. Badania mikrostruktury przeprowadzono za pomocą skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej na próbkach z przekroju poprzecznego. Stwierdzono, że strefa przypowierzchniowa utwardzonego stopu zbudowana była głównie z roztworu stałego tlenu w tytanie  $\alpha(O)$ . Zastosowana obróbka powierzchniowa istotnie poprawiła twardość oraz właściwości tribologiczne stopu (wzrost odporności na zużycie przez tarcie, zmniejszenie współczynnika tarcia).

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 126-129]

## Wprowadzenie

Stopy tytanu są szeroko stosowane w medycynie na elementy endoprotez stawu biodrowego i kolanowego [1,2]. Obecnie najczęściej stosowane są dwufazowe ( $\alpha$ + $\beta$ ) stopy tytanu, Ti-6Al-4V oraz Ti-6Al-7Nb. Materiały te mają wysoką wytrzymałość względną i dobrą odporność na korozję [2]. Stop Ti-6Al-7Nb charakteryzuje się lepszą biokompatybilnością od stopu Ti-6Al-4V, ponieważ toksyczny wanad został w tym stopie zastąpiony niobem [2,3].

Stopy tytanu mają stosunkowo małą odporność na zużycie przez tarcie i duży współczynnik tarcia. W celu poprawy tych niekorzystnych właściwości tribologicznych stosuje się obróbkę powierzchniową [1]. Bardzo obiecującą metodą poprawy tych niekorzystnych właściwości stopów tytanu jest obróbka powierzchniowa polegająca na utwardzeniu dyfuzyjnym powierzchni stopu tlenem w plazmie wyładowania jarzeniowego [4].

Celem obecnej pracy była charakteryzacja mikrostruktury i właściwości tribologicznych stopu Ti-6AI-7Nb w stanie dostawy i po dyfuzyjnej obróbce utwardzającej tlenem.

## Materiał i metodyka badań

Badania przeprowadzono na dwufazowym ( $\alpha$ + $\beta$ ) stopie Ti-6Al-7Nb. Materiały został dostarczony przez firmę BÖHLER Edelstahl GmbH, Niemcy, w stanie po walcowaniu na gorąco i wyżarzaniu (750°C/2h), zgodnie z normą ASTM F1295/ISO 5832-11.

Próbki stopu Ti-6Al-7Nb poddano obróbce powierzchniowej polegającej na dyfuzyjnym utwardzeniu warstwy wierzchniej atomami tlenu w plazmie wyładowania jarzeniowego przy temperaturze 1173K w atmosferze Ar+O<sub>2</sub>.

Badania mikrostruktury przeprowadzono za pomocą mikroskopii świetlnej, skaningowej- oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (SEM, TEM). Cienkie folie z przekroju

# MICROSTRUCTURE AND PROPERTIES OF OXYGEN DIFFUSION STRENGTHENED Ti-6AI-7Nb ALLOY

T.Moskalewicz<sup>1\*</sup>, B.Wendler<sup>2</sup>, S.Zimowski<sup>1</sup>, S.Milc<sup>1</sup>, A.Czyrska-Filemonowicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AGH University of Science and Technology, 30 Mickiewicza Ave., 30-059 Cracow, Poland <sup>2</sup>Technical University of Lodz, 1 Stefanowskiego str., 90-924 Lodz, Poland \*MAILTO: tmoskale@agh.edu.pl

## Abstract

The microstructure as well as micro-mechanical and tribological properties of the as received and glow discharge plasma thermal oxidized Ti-6AI-7Nb alloy were examined. Scanning and transmission electron microscopy investigations on cross-section specimens were used for microstructure investigations. The  $\alpha$  (O) solid solution enriched by oxygen up to 22at % was mainly present in the near-surface region. Applied surface treatment significantly improved microhardness and tribological properties (wear resistance, friction coefficient) of the alloy.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 126-129]

#### Introduction

Titanium-based alloys are widely used in medicine for load bearing components of hip and knee joint prostheses [1,2]. Two phase ( $\alpha$ + $\beta$ ) Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys are used at the most. These materials exhibit high relative strength and good corrosion resistance [2]. The Ti-6Al-7Nb alloy has better biocompatibility than Ti-6Al-4V, because the toxic vanadium is replaced by niobium, which is non-toxic in interaction with human tissue [2,3].

The application of titanium and its alloys as biomaterials is limited by poor tribological properties (e.g. relatively low wear resistance and high friction coefficient). Therefore, surface treatment is often applied [1]. Diffusion strengthening of the titanium alloy by glow discharge plasma in Ar+O2 atmosphere is a very promising method for improving surface properties of titanium alloys [4].

The goal of this study was to characterise microstructure as well as micro-mechanical and tribological properties of the as received and surface treated Ti-6AI-7Nb alloy.

## Materials and methods

The Ti-6AI-7Nb is a two phase  $(\alpha+\beta)$  titanium alloy. The alloy was delivered by BÖHLER Edelstahl GmbH, Germany, as hot rolled and annealed at 750°C/2h alloy, according to ASTM F1295/ISO 5832-11.

The Ti-6Al-7Nb specimens were surface treated by thermal oxidation at 1173K in the  $Ar+O_2$  atmosphere in the presence of plasma glow discharge.

Microstructure of the as received and surface treated samples was characterised by light microscopy (LM), scanning- and analytical transmission electron microscopy (SEM, TEM). TEM investigations were carried out on cross-section thin foils prepared by dimpling and subsequently ion-beam thinning using Precision Ion Polishing System (PIPS; Gatan). Phase identification was performed by means of



RYS.1. Mikrostruktura stopu Ti-6AI-7Nb w stanie dostaw, dyfraktogramy elektronowe i ich identyfikacja; TEM – cienka folia z przekroju poprzecznego (a) oraz liniowa analiza składu chemicznego wykonana wzdłuż linii zaznaczonej na rysunku; STEM-EDS (b).

FIG.1. Microstructure of the as received Ti-6AI-7Nb alloy, SAED patterns taken from the  $\alpha$  and  $\beta$  grains and their identification, TEM-BF (a) as well as STEM-EDS linescane analysis along line marked on the figure (b).

poprzecznego próbki przygotowano za pomocą ścieniarki jonowej PIPS (ang. Precision Ion Polishing System) firmy GATAN. Identyfikację faz przeprowadzono metodą selektywnej dyfrakcji elektronów (SAED). Do analizy składu chemicznego wykorzystano spektroskopię promieniowania rentgenowskiego z dyspersją energii (STEM-EDS). Interpretację dyfraktogramów elektronowych przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego JEMS [5].

Pomiary mikrotwardości i modułu Younga przeprowadzono na przekrojach poprzecznych próbek za pomocą urządzenia Micro Combi Tester (MCT) firmy CSEM Instruments stosując wgłębnik Vickers'a. Badania tarciowo-zużyciowe w ruchu obrotowym próbki wykonano na sucho w styku kula–płaszczyzna na tribotesterze typu "kula-tarcza" stosując kulę Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o średnicy 1mm.

#### Wyniki i dyskusja badań

Mikrostruktura stopu Ti-6Al-7Nb w stanie dostawy zbudowana była z ziaren fazy  $\alpha$  (struktura heksagonalna zwarta; HZ) i ziaren fazy  $\beta$  (struktura regularna przestrzennie centrowana; RPC) (RYS.1a). Wielkość ziaren oszacowano na obrazach mikrostruktury z TEM na ok. 0,1-1,5µm dla fazy  $\alpha$  i 0,1-0,3µm dla fazy  $\beta$ . Liniowa analiza składu chemicznego oraz mapy rozmieszczenia pierwiastków STEM-EDS wykazały większą zawartość Al w fazie  $\alpha$  oraz Nb, Fe i Ta w fazie  $\beta$ . Wyniki liniowej analizy składu chemicznego przedstawiono na RYSUNKU 1b. Podobne wyniki uzyskano we wcześniejszych naszych badaniach wykonywanych na stopie Ti-6Al-7Nb [6].

Stwierdzono, że w wyniku obróbki powierzchniowej mikrostruktura stopu uległa zmianie. Utworzyła się dyfuzyjna strefa przypowierzchniowa, która zbudowana była głównie z roztworu stałego tlenu w tytanie  $\alpha(O)$  (RYS.2a). Analiza zawartości tlenu wyznaczona w TEM metodą EDS potwierdziła znacznie większą zawartość tlenu w tej strefie przypowierzchniowej stopu (RYS.2b). Pod tą strefą obserwowano dwufazową mikrostrukturę, w której ziarna fazy  $\alpha$  wzrosły do ok.12 µm i ziarna fazy  $\beta$  do ok. 5µm, w porównaniu z ziarnami tych faz w stopie w stanie dostawy.

Stwierdzono istotny wpływ zastosowanej obróbki powierzchniowej na poprawę twardości i właściwości tribologicznych stopu Ti-6AI-7Nb. Twardość powierzchni stopu po obróbce utwardzającej tlenem znacznie wzrosła, selected area electron diffraction (SAED). The diffraction patterns were interpreted with the help of JEMS software [5]. EDS point-, STEM/EDS line- and element distribution maps analyses were carried out to determine the chemical composition and element distribution in the alloy.

The microhardness and Young's modulus were measured on cross-section samples using Micro Combi Tester (MCT) of CSEM Instruments with a Vickers' indenter. Friction wear resistance was tested by means of the "ball-on-disc" method using a ball of  $Al_2O_3$ .

#### **Results and discussion**

Microstructure of the as received Ti-6Al-7Nb alloy was consisted of  $\alpha$  grains (hexagonal close-packed; hcp) and  $\beta$  grains (body-centred cubic; bcc) (FIG.1a). The average size of  $\alpha$  and  $\beta$  grains was measured to be in the range of 0.1-1.5µm and 0.1-0.3µm, respectively. Linescan and element distribution maps, recorded using the STEM-EDS method, showed an enrichment of Al in  $\alpha$  phase and of Nb, Fe, Ta in the  $\beta$  phase. Typical linescan results are presented in FIGURE 1b. Similar results were found also in our earlier studies [6].

The microstructure of the Ti-6Al-7Nb substrate after surface treatment was changed. A diffusion zone consisting mainly of  $\alpha$  (O) solid solution enriched by oxygen was present in the near surface region (FIG.2a). TEM-EDS analysis confirms the presence of oxygen (up to 22at.%) in the zone close to the surface (FIG.2b). Oxygen is a strong  $\alpha$  stabilizer in titanium alloys, therefore accompanying the inward diffusion of oxygen atoms, the retained  $\beta$  would transfer into stable  $\alpha$ , thus leading to a reduced content of  $\beta$  phase in the near surface area. The underlying bulk material (substrate) was consisted of  $\alpha$  and  $\beta$  grains. The size of  $\alpha$  and  $\beta$  grains was measured as up to 12µm and up to 5µm, respectively. Both grains were larger in the Ti-6Al-7Nb substrate after surface treatment than those in the as received material.

It was established that the applied surface treatment has strong positive influence on microhardness and tribological properties of the alloy. The microhardness of the alloy surface increases from 3.4GPa for the as received alloy up to 10.6GPa after surface treatment (FIG.3a). It has been proved by means of a "ball-on-disc" test that the friction



RYS.2. Mikrostruktura stopu Ti-6AI-7Nb po obróbce powierzchniowej, SEM obraz w elektronach rozproszonych wstecznie (a) oraz wyniki analizy zawartości tlenu w strefie przypowierzchniowej, TEM-EDS (b). FIG.2. Microstructure of the surface treated Ti-6AI-7Nb alloy, SEM electron back scattered image (a) and oxygen content determined by TEM-EDS in the near surface zone as a function of the distance to the specimen surface (b).



RYS.3. Mikrotwardość stopu Ti-6AI-7Nb po obróbce powierzchniowej (a) oraz odporność na zużycie przez tarcie stopu przed i po obróbce powierzchniowej (b).

FIG.3. Microhardness of the surface treated Ti-6AI-7Nb alloy (a) and a vertical profile of wear track of the as received and surface treated Ti-6AI-7Nb alloy (b)

z 3,4GPa do ok. 10,6GPa (rys. 3a). Wyniki testu tribologicznego wykazały, że współczynnik tarcia stopu po obróbce powierzchniowej wynosi ok. 0,15-0,18, zaś materiału podłoża 0,4-0,5. Głębokość wytarcia stopu w stanie dostawy wynosiła 11,5µm, natomiast stopu po utwardzaniu tlenem tylko 0,3µm (RYS.3b).

Uzyskane wyniki badań wskazują na przydatność wysokotemperaturowej obróbki utwardzającej tlenem w obecności plazmy wyładowania jarzeniowego do poprawy mikrotwardości i właściwości tribologicznych powierzchni stopu Ti-6AI-7Nb.

# Wnioski

1. Mikrostruktura stopu Ti-6AI-7Nb po obróbce powierzchniowej - dyfuzyjnym utwardzaniu tlenem jest zbudowana ze strefy przypowierzchniowej, w której występuje głównie roztwór stały tlenu w tytanie  $\alpha$  (O), oraz dwufazowego podłoża zbudowanego z ziaren fazy  $\alpha$  i fazy  $\beta$ .

2. Zastosowana obróbka powierzchniowa istotnie poprawia twardość powierzchni i odporność stopu Ti-6AI-7Nb na zużycie przez tarcie oraz pozwala na zmniejszenie współczynnika tarcia stopu. coefficient of the surface treated alloy is in the range 0.15-0.18, while for a substrate material it is 0.4-0.5 and the depth of the wear track after the test was  $0.3\mu m$  and 11.5, respectively (FIG.3b).

The results of the investigations show, that diffusion strengthening of the near-surface zone of the Ti-6AI-7Nb alloy due to interstitial oxygen atoms with use of the glow discharge plasma in the  $Ar+O_2$  atmosphere is a very effective method for improvement of the mechanical and tribological properties of the alloy.

## Conclusions

1. The applied surface treatment increases the microhardness of the Ti-6Al-7Nb alloy and improves its tribological properties.

2. These improvements are due mainly to enrichment of the  $\alpha$  (O) solid solution in the near surface region in oxygen atoms up to 22at.% and to depletion of this zone in the  $\beta$  phase.

## Podziękowania

Badania zostały dofinansowane przez AGH-UST (projekt nr 11.11.110.791)

# Piśmiennictwo

[1]. X. Liua, P.K. Chub, Ch. Dinga, Mater. Sci. Eng. R 47 (2004) 49–121

[2]. D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, Titanium in medicine. Berlin: Springer-Verlag; 2001

[3]. M.F. López, A. Gutiérrez, J.A. Jiménez, Surf. Sci. 482-485 (2001) 300-305

## Acknowledgment

The study was partially supported by the AGH-UST (project nr 11.11.110.791).

## References

[4]. B. Januszewicz, D. Siniarski, Vacuum 81 (2006) 215-220
[5]. P. Stadelmann, JEMS: Java Electron Microscopy Software, http://cimewww.epfl.ch

[6]. T. Moskalewicz, A. R. Boccaccini, A. Czyrska-Filemonowicz, Surf. Coat. Technol. 201 (2007) 7467–7471

•••••

# BADANIA ADHEZJI WYBRANYCH STOMATOLOGICZNYCH WYPEŁNIEŃ KOMPOZYTOWYCH

JAROSŁAW BIENIAŚ<sup>1\*</sup>, AGATA NIEWCZAS<sup>2</sup>, KRZYSZTOF PAŁKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Lubelska, Katedra Inżynierii Materiałowej, ul. Nadbystrzycka 36, 20-608 Lublin,Polska <sup>2</sup>Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul.Karmelicka 7, 20-081 Lublin, Polska \*MAILTO: j.bienias@pollub.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 129-131]

# Wstęp

Głównym niedomaganiem współczesnych stomatologicznych wypełnień kompozytowych jest ich ograniczona trwałość w warunkach in vivo [1]. Najczęściej wymienianymi w literaturze uszkodzeniami jest utrata retencji i adaptacja brzegowa [2,3]. Stąd korzystne są działania zmierzające w kierunku podwyższenia trwałości połączeń adhezyjnych, m.in. poprzez polepszenie stabilności wiązania materiałów do tkanek zęba. Skuteczność szybkiego wiązania większości dostępnych obecnie systemów wiążących jest dość dobra, niezależnie od rodzaju materiału [3]. Jednakże testy kliniczne wykazują duże różnice w stabilności wiązania [4]. Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy jest ocena adhezji w układzie materiał kompozytowy – ząb dla 4 materiałów i 3 rodzajów systemów wiążących.

# Materiał i metodyka badań

W badaniach wykorzystano 4 komercyjne stomatologiczne materiały kompozytowe o odcieniu A3 wraz z dedykowanymi systemami wiążącymi: Filtek Silorane/Silorane, Filtek Supreme XT/Adper (3M ESPE), Grandio/Futura Bond (Voco GmbH) oraz Gradia Direct/G-Bond (GC Corporation). Porównawczo wykonano połączenia z zastosowaniem samowytrawiającego systemu wiążącego Clearfil SE Bond (Kuraray) [5] oraz bez systemu wiążącego. W badaniach wykorzystano zęby przedtrzonowe, do których, po odsłonięciu zębiny, mocowano próbki (RYS.1) stosując standardowe stomatologiczne techniki przygotowania powierzchni i utwardzania materiału. Badania wykonano w oparciu

# ADHESION STUDIES OF SOME RESTORATIVE COMPOSITES

JAROSŁAW BIENIAŚ<sup>1</sup>, AGATA NIEWCZAS<sup>2</sup>, KRZYSZTOF PAŁKA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Lublin University of Technology, Department of Materials Engineering 36 Nadbystrzycka str., 20-608 Lublin, Poland <sup>2</sup>Medical University of Lublin, Department and Chair of Dental Protective 7 Karmelicka str., 20-081 Lublin, Poland \*MAILTO: j.bienias@pollub.pl

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 129-131]

## Introduction

The major shortcoming of contemporary adhesive restoratives is their limited durability in vivo [1]. The most cited reasons for failure of adhesive restorations are loss of retention and marginal adaptation [2,3]. Hence, a valuable approach to prolong the clinical lifetime of adhesives might be to focus on improving the stability of the bond of these biomaterials to tooth tissue. The immediate bonding effectiveness of most current adhesive systems is quite favorable [3], regardless of the adhesive used. However, a clinical trial more differences in bonding stability appeared [4].

The paper presents the studies of composite material/ tooth adhesion with the use of four composites and three kinds of adhesive systems

# Materials and methods

The subject of examinations were four commercial restorative composites (A3 shade) with proper adhesive system: Filtek Silorane/Silorane, Filtek Supreme XT/Adper (3M ESPE), Grandio/Futura Bond (Voco GmbH) and Gradia Direct/G-Bond (GC Corporation). For comparison, the joints with Clearfil SE Bond (Kuraray) self-etching [5] and without adhesive system were prepared. The human premolar teeth were used and the composite fillings to dentine were deposited in accordance with the manufacturer's recommendations. The adhesive was investigated according to ISO/TS 11405:2003 standard: Dental materials – testing of adhesion to tooth structure. The drawing of the specimen geometry and the test method are presented in FIG.1. The load was applied at a crosshead speed of 1mm/min until a bond failure

 o normę ISO/TS 11405:2003: Dental
 materials – testing of adhesion to tooth structure. Adhezję określono jako maksymalne naprężenia ścinające. Wyniki pomiarów analizowano statystycznie oprogramowaniem Statistica (StatSoft) przy poziomie istotności p<0,05.</li>

## Wyniki i dyskusja

Grandio ok. 6MPa.

Wyniki pomiarów adhezji materiałów kompozytowych do zębiny zamieszczono na RYS.2. We wszystkich przypadkach obserwowano odrywanie się materiału na powierzchni rozdziału zębina - bond. Praktycznie wszystkie materiały wykazują bardzo słabe przyleganie do powierzchni zębiny, jeśli nie zastosowa-

no żadnego systemu wiążącego, wartość naprężeń wynosi

w tym przypadku ok. 1MPa, jedynie w przypadku materiału

siłę wiązania. Najwyższe wartości uzyskano ponownie dla

materiału Grandio - 14,34MPa. Zmiana systemu wiążą-

cego w tym przypadku nie wykazała istotnej statystycznie

różnicy, podobnie jak dla materiału Filtek Supreme. Jedynie

w przypadku kompozytu Gradia zastosowanie systemu

Clearfil istotnie podwyższyło adhezję z poziomu 5,78 MPa

do 9,71MPa. Filtek Silorane, wykazujący najniższy skurcz

Zastosowanie systemu wiążącego zwiększa istotnie



RYS.1. Schemat układu pomiarowego adhezji materiałów kompozytowych do tkanek zęba: 1–oprawka, 2-żywica utwardzana na zimno, 3-materiał kompozytowy, 4– system wiążący, 5– pierścień teflonowy, 6–nóż.

FIG.1. The drawing of the specimen geometry and shear bond strength method. 1-holder 2-cold cured resin, 3-composite material, 4-adhesive system, 5-teflon ring, 6-knife. occurred. The adhesive was calculated as shear bond strength using the following formula:  $\tau$ =F/A, where F (N) is maximum force and the A (mm2) is a joint area. The results were analyzed statistically by the t-Student test (p < 0.05).

# Results and discussion

The results of the composite materials adhesion to dentine are presented

in FIGURE 2. The separates of composite materials at the interface between dentine and bond in the all cases were observed. The low bond strength of composite materials without adhesive systems to dentine was noted. Value of stresses in that cases are about 1MPa and only for Grandio was higher - 6MPa.

Application of adhesive system significantly improved the bond strength. The highest values were obtained for Grandio material - 14,34MPa. The change of adhesive system for Grandio and Filtek Supreme did not show significant differences. The use of the Clearfil system only for Gradia composite significantly increased the adhesion from 5,78 MPa to 9,71 MPa. Filtek Silorane with the lower polymerization



RYS.2. Wyniki pomiarów naprężeń ścinających, ▪ średnia □ 0,95 przedz.ufn. ⊥ odch.std. FIG.2. The results of shear bond strength, ▪ mean, □ 0,95 confidence interval, ⊥ standard deviation.

130

*I***ERIAI** 

ш 🗰

wej, w odróżnieniu od pozostałych materiałów bazujących na żywicach akrylowych. Zmiana żywicy skutkuje jednak znacznie słabszym wiązaniem adhezyjnym o wartości 6,02MPa.

#### Wnioski

Zastosowanie systemu wiążącego zwiększa istotnie siłę wiązań adhezyjnych pomiędzy zębiną a wypełnieniem kompozytowym. Połączenie ma charakter adhezyjny, a pękanie następowało na granicy rozdziału zębina – system wiążący. Najwyższą wytrzymałością połączenia cechował się materiał Grandio, co wynikać może ze struktury materiału (nanohybrydowy) oraz jego koherencji z systemem wiążącym i tkankami zęba.

#### Podziekowania

Prezentowana praca była finansowana z projektu badawczego na lata 2008-2011

#### Piśmiennictwo

 Van Meerbeek B., Perdigao J., Lambrechts P., Vanherle G.: The clinical performance of adhesives. J.Dent, 26 (1998) 1-20
 Mjör I.A., Gordan V.V.: Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. Oper. Dent. 27 (2002) 528-534
 De Munck J., Van Landuyt K., Peumans M., Poitevin A., Lamb-

[3]. De Munck J., Van Landuyt K., Peumans M., Potevin A., Lambrechts P., Braem M., Van Meerbeek B.: A Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue: Methods and Results. J. Dent. Res. 84(2) (2005) 118-132.

. . . . . . . . .

# BADANIA ODDZIAŁYWANIA KOMPOZYTU WĘGLOWO-KRZEMOWEGO NA ELEMENTY MORFOTYCZNE KRWI

 $\label{eq:marked} \begin{array}{l} \mbox{Maria Szymonowicz}^{1*}, \mbox{Stanisław Pielka}^1, \mbox{Danuta Paluch}^1, \\ \mbox{Bogusława Żywicka}^1, \mbox{Ewa Karuga}^1, \mbox{Dorota Obłąkowska}^2, \\ \mbox{Stanisław Błażewicz}^2 \end{array}$ 

<sup>1</sup>Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateria-Łów, Akademia Medyczna, ul. Poniatowskiego 2; 50-326 Wrocław, Polska <sup>2</sup>katedra Biomateriałów, Wydział Inżynierii Materiałowej I Ceramiki, Akademia Górniczo-hutnicza, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska \*mailto: Biochem@cheksp.am.wroc.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 131-135]

## Wprowadzenie

Wszczepy biomateriałów nie powinny wpływać, lub tylko w niewielkim stopniu niekorzystnie oddziaływać na komórki tkanek, z którymi mają kontakt. Ma to szczególne znaczenie w kontakcie z krwią, której komórki szczególnie reagują na wszelkie niekorzystne czynniki, a ich zaburzenia mogą wywoływać także ogólnoustrojowe skutki. Również produkty biodegradacji materiału, same lub w kompleksach białkowych, mogą w różnych okresach po implantacji wywoływać wczesne reakcje miejscowe lub odległe. Stopień biozgodności, stabilność materiału w płynach ustrojowych i shrinkage is a material based on silane resin as opposed to the other materials with acrylic resin. The change of resin system reduced the shear bond strength (6,02 MPa).

#### Conlusions

The application of adhesive system significantly improves the bond strength between dentine and composite filling. The failure in all systems was adhesive, observed at the interface between dentine and adhesive system. The highest shear bond strength showed Grandio, which may be due to its structure (nanohybrid) and coherence between bond system and tooth tissues.

#### Acknowledgements

Presented work was financed from the scientific funds in the years 2008-2011 as a research project.

#### References

131

[4]. Van Dijken J.W.: Clinical evaluation of three adhesive systems in class V non-carious lesions. Dental Materials 16 (2000) 285-291.
[5]. Koibuchi H., Yasuda N., Nakabayashi N.: Bonding to dentin with a self-etching primer: the effect of smear layers. Dental Materials 17 (2001) 122-126.

[6]. Dickens S, Milos MF. Relationship of dentin shear bond strengths to different laboratory test designs. Am. J. Dent. 15(3) (2002) 185-92.

# STUDIES OF COMPOSITE CARBON/SILICON REACTION ON CELLULAR MORPHOTIC ELEMENTS OF BLOOD

Maria Szymonowicz<sup>1</sup>, Stanisław Pielka<sup>1</sup>, Danuta Paluch<sup>1</sup>, Bogusława Żywicka<sup>1</sup>, Ewa Karuga<sup>1</sup>, Dorota Obłąkowska<sup>2</sup>, Stanisław Błażewicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF EXSPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY 2 PONIATOWSKIEGO STR, 50-326 WROCLAW, POLAND <sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND \*MAILTO: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 131-135]

#### Introduction

Biomaterial implants should not influence, or only to a small extend unfavourably influence the cells of tissues they have contact with. It has a particular significance in contact with the blood whose cells particularly lively react to all unfavourable factors, and their disturbances can also cause systemic effects. Also the products of material biodegradation, alone or in protein complexes, can in various periods after implantation cause local or remote reactions. The biocompatibility degree, stability of material in systemic bezpośrednie oddziaływanie na składniki morfotyczne krwi związane są zarówno ze strukturą jak i chemiczną, i fizycznym stanem powierzchni wszczepu. Węgiel jako biomateriał, mający wiele korzystnych cech biologicznych, fizycznych i chemicznych stanowi potencjalnie wartościowy materiał wyjściowy do szerokiego zastosowania w lecznictwie.

Celem pracy była ocena wpływu kompozytu węglowokrzemowego na składniki morfotyczne krwi.

## Materiał

Do badań użyto kompozytu typu węgiel/krzem (C/Si). Materiał węglowy został wytworzony z kompozytu węgiel/węgiel modyfikowanego polimerem polisiloksanowym.

#### Metody

#### Badania laboratoryjne

#### Przygotowanie wyciągu wodnego

Z kompozytu C/Si sporządzono wyciągi wodne z zachowaniem proporcji 4g (1,0x4,0 cm) materiału na 30ml wody do iniekcji oraz warunków ekstrakcji 37°C przez 72 godz. Roztwór kontrolny stanowiła woda do iniekcji użyta do sporządzenia wyciągów i inkubowana w tych samych warunkach co badane próby [1,2]. Oznaczono pH [3] i przewodność elektryczną właściwą [4].

#### Badania biologiczne in vitro

Badania wykonano na krwi ludzkiej AB Rh+ pobranej na płyn konserwujący CPD (citrate-phosphate-dextrose, USP). Do badań użyto pełnej krwi, zagęszczonych erytrocytów oraz 10% zawiesiny erytrocytów.

#### Badanie działania hemolitycznego metodą bezpośredniego kontaktu

Na próbkę materiału (1,0x1,0cm) umieszczonej w probówce naniesiono 0,2ml krwi i inkubowano przez 15min w temp. 37°C. Następnie dodano 4 ml 0,9% NaCl i inkubowano przez kolejne 60 min. w temp. 37°C. W płynie, znad osadu komórek zmierzono absorbancję i obliczono odsetek hemolizy, którego wartość nie powinna przekroczyć 1% [5]. Osad krwinek poddano ocenie mikroskopowej.

# Badanie działania hemolitycznego metodą pośredniego kontaktu

#### Badanie działania hemolitycznego wyciągu wodnego

Wyciąg wodny z materiału oraz wodę do iniekcji (kontrola) w ilości 5ml w doprowadzono do izotoniczności stałym chlorkiem sodu. Dodano 0,25ml 10% zawiesiny krwinek czerwonych i inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C. Następnie w płynie znad osadu krwinek czerwonych oznaczono absorbancję i obliczono odsetek hemolizy, którego wartość nie powinna przekroczyć 1% [6]. Osad erytrocytów oceniono mikroskopowo.

# Badanie działania hemolitycznego wyciągu w soli fizjologicznej

Izotoniczny roztwór chlorku sodu z materiałem (5 ml/0,6 g) oraz bez materiału (kontrola) inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C. Następnie dodano 0,02ml zagęszczonych krwinek czerwonych i ponownie inkubowano w temp. 37°C przez 4 godz. W płynie znad osadu erytrocytów zmierzono absorbancję i obliczono odsetek hemolizy, którego wartość nie powinna przekroczyć 3% [7, 8, 9]. Osad krwinek poddano ocenie mikroskopowej.

#### Badania hematologiczne

Krew pełną ludzką z materiałem (6 ml/0,6 g) oraz bez materiału (kontrola) inkubowano przez 4 godz. i 24 godz.

fluids and the direct reaction on blood elements is connected both with its chemical structure as well as the physical condition of the implant surface.

Carbon as biomaterial, having many favourable biological and physical features, constitutes potentially valuable initial material for a wide use in the health care.

The aim of the work was evaluation of the influence of carbon-silicon composite on morphotic elements of blood.

#### Material

To the study the carbon-silicon composite (C/Si) was used. Carbon material was prepared of composite carbon/ carbon modificated with polysiloxane polimer

# Methods

#### Laboratory tests

#### Aqueous extract preparation

Aqueous extracts were prepared from composite C/Si with maintenance of proportion 4g (1,0 x 4,0cm) of material for 30ml of water for injection and extraction conditions 37şC over 72h. Aqueous for injections used for extracts preparation and incubated in the same conditions as the tested samples constituted the control solution [1, 2]. Ph [3] and electrical conductivity were determined [4].

#### **Biological studies in vitro**

The tests were performed on human blood AB Rh+ taken for preserving fluid CPD (citrate-phosphate-dextrose, USP). Full blood, condensed erythrocytes and 10% suspension of erythrocytes were used for the tests.

# Study of the haemolytic action with the method of direct contact

0,2 ml of blood was deposited on a material sample (1.0x1.0 cm) placed in a test-tube and incubated over 15min at temp. 37°C. Next, 4 ml 0,9% NaCl was added and incubated over the next 60min. at temp. 37°C. In the fluid above the cells sediment, absorbance was measured and haemolysis percentage was counted, whose value should not exceed 1% [5]. The blood cells sediment was subjected to microscopic evaluation. with sodium chloride.

#### Study of the haemolytic action with the method of indirect contact

#### Tests of haemolytic action of aqueous extract

Aqueous extract from the material and water for injection (control) in the amount of 5 ml was brought to isotonic state with constant sodium chloride. 0,2 ml 10% erythrocytes suspension was added and incubated over 24h at temp. 37°C. Next, in the fluid above the erythrocytes sediment, the absorbance was determined and haemolysis percentage was counted, whose value should not exceed 1% [6]. The erythrocytes sediment was evaluated microscopically.

# Tests of haemolytic action of extract in physiological saline

Isotonic solution of sodium chloride with material (5 ml/0,6 g) and without material (control) was incubated over 24h at temp. 37°C. Next, 0,02ml condensed erythrocytes were added and incubated again at temp. 37°C over 4h. In the fluid above the erythrocytes sediment, the absorbance was measured and hemolysis percentage was counted, whose value cannot exceed 3% [7,8,9]. The cells sediment was subjected to microscopic evaluation.

#### Haematological tests

Human full blood with material (6 ml/0,6 g) and without material (control) was incubated over 4h and 24h at temp. 37şC. After removing the material samples, the blood was

w temp. 37°C. Po wyjęciu próbek materiału krew pobrano do badań hematologicznych, oznaczenia pH i hemoglobiny pozakrwinkowej.

W pełnej krwi oznaczono wartość hematokrytu (Ht), stężenie hemoglobiny (Hb), liczbę krwinek czerwonych (RBC) oraz wskaźniki czerwonokrwinkowe: średnią objętość krwinki czerwonej (MCV), średnią masę hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych (MCHC) i rozkład krwinek czerwonych (RDW). Określono liczbę krwinek białych (WBC) z uwzględnieniem leukogramu: odsetka granulocytów (GRA), limfocytów (LYM) i monocytów (MON). Oznaczono liczbę krwinek płytkowych (PLT), średnią objętość płytek (MPV) i hematokryt płytkowy (PCT). Badania wykonano na aparacie hematologicznym Cobas Micros firmy La Roche. Stężenie jonów wodorowych (pH) we krwi oznaczono na aparacie Chiron Diagnostics 248 firmy Bayer. Stezenie hemoglobiny pozakrwinkowej w osoczu oznaczono metodą cyjanomethemoglobinową [10].

#### Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 6.02. Obliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Istotne różnice w średnich wartościach parametrów określono testem T dla prób niezależnych. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy p<0,05.

#### Wyniki

Średnie wartości pH i przewodności elektrycznej właściwej wyciągów wodnych podano w TABELI 1. Wyciągi wodne z kompozytu C/Si sączono z powodu obecności w nich drobnych cząstek materiału (pyłu węglowego). Po czasowym kontakcie z materiałem węglowym z stwierdzono zmniejszoną objętość płynu ekstrakcyjnego. Świadczy to o chłonności wody przez materiał. Średnia wartości pH w wyciągu wodnego była zmniejszona w porównaniu do pH kontroli. Przewodność elektryczna właściwa dla wyciągu była zwiększona.

W badaniach działania hemolitycznego kompozytu węglowego C/Si z użyciem krwi pełnej, mającej bezpośredni kontakt z powierzchnią materiału, średnia wartość odsetka hemolizy nie przekroczyła wartości dopuszczalnej przez normę, czyli 1%. W obrazie mikroskopowym krwinki czerwone miały kształt echinocyta. W badaniach wpływu wyciągu z materiału na krwinki czerwone, wartość odsetka hemolizy przekroczyła wartość objętą normą (1%). W obrazie mikroskopowym krwinki miały postać echinocyta i tworzyły agregaty. W badaniach działania hemolitycznego z użyciem zagęszczonych krwinek czerwonych, mających kontakt zarówno z ocenianym materiałem, jak i z wyciągiem z niego w soli fizjologicznej, stwierdzone wartości odsetka hemolizy

			Przewodno	llo wchłoni-
Materiał Material	рН	pН	elektryczna wła ciwa Electrical conductivity	tego płynu Amount of absorber fliud
			[uS/cm]	[ml]
Kompozyt C/Si Composite C/Si	6,04	0,76	40,33 ± 1,53	2,5
Kontrola Control	6,80		1,6 ± 0,33	_

TABELA 1. Badania laboratoryjne wyciągu wodnego z kompozytu C/Si.

TABLE 1. Laboratory tests water extract from the composite C/Si.

taken for hematological tests, determinations pH and plasmatic hemoglobin.

In the whole blood were designated: the value of hematocrit (Ht), hemoglobin concentration (Hb), red cells count (RBC) and red cells indexes: mean red cell volume (MCV), mean hemoglobin mass in red cell (MCH), mean hemoglobin concentration in red cells (MCHC) and red cell distribution width (RDW). White cells count (WBC) was determined including granulocyte (GRA) lymphocyte(LYM) and monocyte (MON) percentage. Platelets count (PLT), mean platelet volume (MPV) and platelet hematocrit (PCT) were also marked. Blood parameters studies were made on a hematologic apparatus Cobas Micros produced by La Roche. The pH value of blood was marked on an apparatus for Chiron Diagnostics 248 produced by Bayer. Extracellular hemoglobin concentration was marked in plasma with cyanomethemoglobin method [10].

#### **Statistical analysis**

The studies results were subjected to statistical analysis with program Statistica 6.02. Arithmetical mean and standard deviation were counted. Statistical essentiality of evaluated parameters was estimated with test T for independent samples. It was assumed that correlation coefficients were essential at p<0,05.

#### Results

The mean values pH and electrical conductivity of water extracts are presented in TABLE 1. Water extracts from composite C/Si were filtered because of the presence of small particles of material (coal dust) in them. A decreased volume of extraction fluid was observed after temporal contact with carbon material. It proves water absorptiveness by the material. The mean value pH in the water extract was decreased in comparison to pH of the control. The electrical conductivity for the extract was increased.

In the tests of haemolytic action of carbon composite C/Si with use of full blood having direct contact with the material surface, the mean value of haemolysis percentage did not exceed the values accepted by the standard, that is 1%. In the microscopic picture erythrocytes had the shape of echinocyte. In the tests of the influence of extract from the material, the haemolysis percentage value exceeded the value included in the standard (1%). In the microscopic picture the cells had the form of echinocyte and created aggregates. In the tests of haemolytic action with use of condensed erythrocytes, having contact both with the evaluated material and with the extract from it in physiological saline, the observed values haemolysis percentage exceeded largely the accepted value, that is 3% (TABLE 2). In the fluid over the erythrocytes sediment after contact with the

	Działanie hemolityczne Hemolytic action				
Materiał Material	material/material pełna krew/full blood H, %	wyci g/extract 10% erytrocyty /erythrocytes H, %	material/material wyci g/extract erytrocyty/ erythrocytes H, %		
Kompozyt C/Si Composite C/Si	0,85 ± 0,02	1,06 ± 0,09	58,43 ± 3,61		

TABELA 2. Wartości odsetka hemolizy dla kompozytu węglowego C/Si. TABLE 2. Hemolysis percentage values of the composite C/Si.
. . . .

Material Material	Czas Time	RBC	Hb	Ht	
Wateria	[11]		ر، <i>ر</i> ور	[,, ,]	
Kompozyt C/Si	4	4,25±0,10*	12,50±0,24	37,23±1,48	
Composite C/Si	24	3,73±0,13***	9,82±0,37***	32,30±1,45**'	
Kontrola	4	4,43±0,09	12,56±0,31	39,13±1,52	
Control	24	4,35±0,10	12,75±0,25	38,54±1,06	
Min-Max: RBC: 4,34-4,55; Hb: 12,30-13,00; Ht: 39,85-42,70 ****p<0,001					

TABELA 3. Liczba czerwonych krwinek (RBC), stężenie hemoglobiny (Hb) oraz wartość hematokrytu (Ht) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z kompozytem C/Si w temp. 37°C.

TABLE 3. Count of red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (Hb) and hematocrit in blood in the control group and contact with the composite C/Si in  $37^{\circ}$ C.

	Czas	WBC	LYM	MON	GRAN	
Materiał	Time					
Material	[h]	[10 <sup>9</sup> /l]	[%]	[%]	[%]	
Kompozyt	4	5,23±1,53	31.75±6,57	4,80±0,86	65,18±5,20	
C/Si Composite C/Si	24	3.10±0,36*	33,90±2,17	6,33±0,97*	59,62±2,04	
Kontrola	4	5,41±1,37	24,27±5,59	5,15±1,56	67,57±5,41	
Control	24	4,80±1,05	31,37±5,72	9,47±1,07	59,86±4,38	
Min-Max: WBC: 4,30-7,60; LYM: 26,90-40,90;						
MON	MON: 3,80-6,70; GRAN: 52,70-66,70; *p<0,05					

TABELA 5. Liczba białych krwinek (WBC), wartość odsetka limfocytów (LYM), monocytów (MON) i granulocytów (GRAN) we krwi kontrolnej i po kontakcie z materiałami węglowymi w temp.37°C.

White blond cells count (WBC) and lymphocyte (LYM), monocyte (MON) and granulocyte (GRAN) differentia count in the control group blond and after contact with the composite C/Si in 37<sup>s</sup>C.

znacznie przekroczyły dopuszczalną wartość , czyli 3% (TABELA 2). W płynie znad osadu erytrocytów po kontakcie z materiałem wartość pH wyniosła 5,50, a dla kontroli 6,25. W wyniku uwolnienia hemoglobiny z krwinek czerwonych w obrazie mikroskopowym widoczne były jedynie cienie komórek (błony), które do siebie przylegały, tworząc mniejsze i większe agregaty.

Średnie wartości parametrów hematologicznych wraz z odchyleniem standardowym dla krwi kontrolnej po 4 i 24 godz. kontaktu z materiałem węglowym w temp. 37°C oraz zakres wartości referencyjnych (Min-Max) czas 0 podano w TABELACH 3 -7.

Wartość RBC (liczba krwinek czerwonych), WBC (liczba krwinek białych), PLT (liczba krwinek płytkowych), stężenie Hb (hemoglobiny) i wartość Ht (hematokrytu) po 4 godz. kontaktu z materiałem była porównywalna do wartości kontrolnej. Po 24 godz. we krwi stwierdzono istotne zmniejszenie wartości oznaczonych parametrów (TABELE 3,5, 6). Wartości wskaźników czerwo-

Materiał Material	Czas Time [h]	Hb [mg/dl]	рН	
Kompozyt C/Si	4	64,98±9,38*	7,21± 0,04	
Composite C/Si	24	97,28±6,91***	7,05±0,02**	
Kontrola Control	4	27,82±3,55	7,33±0,10	
	24	30,14±2,60	7,16±0,02	
Min-Max: Hb: 15,40-17,30; pH; 7,20-7,45; *p<0,001, **p<0,001, ***p<0,001				

TABELA 7. Stężenie hemoglobiny (Hb) w osoczu kontrolnym i po kontakcie z materiałami węglowymi oraz pH krwi w temperaturze 37°C.

TABLE 7. Extracellular hemoglobin concentration in control plasma and after contact with the composite C/Si in 37°C.

Materiał	Czas Time	MCV	МСН	MCHC	RDW
Material	[h]	[µm]	[pg]	[g/dl]	[%]
Kompozyt C/Si	4	88,65±1,25	29,67±0,37	33,31±0,53	14,20±0,65
Composite C/Si	24	91,70±1,35	28,85±0,26	31,10±0,26	17,33±0,64
Kontrola	4	89,03±1,18	29,03±0,45	32,83±0,57	14,33±0,35
Control	24	92,00±4,50	28,63±0,65	31,32±0,66	17,53±0,80
Min-Max: MCV: 88,00-90,10; MCH: 28,80-29,30; MCHC: 32-33,30; RDV: 13,50-15,40					

TABELA 4. Wartości wskaźników czerwonokrwinkowych: średnia objętość krwinki (MCV), średnia masa hemoglobiny (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach (MCHC), we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z kompozytem C/Si w temp. 37°C. TABLE 4. Red cells parameters: mean red cells volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin in red cell (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration in red blood cells (MCHC) in control group blood and after contact with the composite C/Si in 37°C.

Materiał	Czas Time	PLT	РСТ	MPV	
Material	[h]	[10 <sup>9</sup> /l]	[%]	[fl]	
Kompozyt C/Si	4	188,33±69,00	0,138±0,044	7.36±0,98	
Composite C/Si	24	133,30±22,51*	0,118±0,046	7,40±0,44	
Kontrola	4	213,00±48,28	0,149±0,030	7,23±0,76	
Control	24	183,66±44,07	0,134±0,029	7,16±0,35	
Min–Max: PLT: 176-288; PCT: 0,079-1,170; MPV: 6,90-8,20; *p<0,001					

TABELA. 6. Liczba płytek krwi (PLT), hematokryt płytkowy (PCT) średnia objętość płytek (MPV) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z materiałami węglowymi w temperaturze 37°C.

TABLE 6. Blood platelet count (PLT), platelet hematocrit (PCT), mean platelet volume (MPV) in the control group blond and after contact with the composite C/Si in 37°C.

material the value pH was 5,50 and for the control 6,25. As the result of hemoglobin release from red cells, in the micro-

scopic picture only shades of cells (membranes) are seen, which adhere to each other creating smaller and bigger aggregates.

The mean values of haemaological parameters together with the standard deviation for the control blood after 4 and 24h of contact with the carbon material at temp. 37°C and the range of referential values (Min-Max) time 0 are presented in TABLES 3 -7.

Values RBC, WBC, PLT, concentration Hb, value Ht after 4h was comparable to the control value. After 24h an essential decrease of the determined parameters values nokrwinkowych (TABELA 4), białokrwinkowych (TABELA 5) i płytkowych (TABELA 6) były w zakresie wartości referencyjnych tych parametrów. We krwi po kontakcie z materiałem stwierdzono istotne zwiększenie hemoglobiny pozakrwinkowej po 4 i 24 godz. (TABELA 7).

#### Podsumowanie

Biomateriały przeznaczone do czasowego i stałego kontaktu z organizmem powinny odznaczać obojętnością biologiczną. W żywym organizmie krew jest najbardziej kompleksowym dynamicznym układem biologicznym. Jednym z ważniejszych wskaźników badaniem in vitro zgodności materiału z krwią są badania działania hemolitycznego oraz ocena parametrów morfologicznych krwi. Celem przeprowadzonych badań była ocena biologiczna in vitro kompozytu C/Si jako materiału mogącego mieć zastosowanie w formie wszczepu do bezpośredniego kontaktu z krwią.

W badaniach wyciągu wodnego z kompozytu C/Si stwierdzono zmniejszenie wartości pH, a zwiększoną przewodność elektryczną właściwą. Związane to jest ze strukturą materiału, jego porowatością i chłonnością płynu, co sprzyja migracji z niego składników do płynu ekstrakcyjnego.

W badaniach działania hemolitycznego kompozytu C/Si stwierdzono zróżnicowane wartości odsetka hemolizy w zależności od metody oznaczenia. Najmniejszą wartość odsetka hemolizy stwierdzono dla wyciągu z materiału i z użyciem rozcieńczonych krwinek czerwonych. W oznaczeniu z zastosowaniem zagęszczonych krwinek czerwonych lub pełnej krwi, gdzie oceniany materiał był w stałym kontakcie z krwinkami, stwierdzono zwiększoną wartość odsetka oraz zmiany kształtu krwinek czerwonych. Na otrzymane wartości pomiarowe miało wpływ prawdopodobnie niskie pH materiału i wyciągów wodnych. Uwolnione składniki z kompozytu C/Si wywołały zmianę pH, a to spowodowało rozpad krwinek czerwonych.

Ocenę wpływu kompozytu C/Si na krew dokonano na podstawie ilościowych zmian wybranych parametrów hematologicznych Pełną krew poddano czasowemu, bezpośredniemu kontaktowi z materiałem. We krwi po czasowym, dłuższym kontakcie z kompozytem C/Si stwierdzono zmniejszenie wartości parametrów czerwonokrwinkowych (Hb, Ht, RBC), PLT i pH oraz zwiększenie stężenia Hb pozakrwinkowej.

Na podstawie uzyskanych wyników badań działania hemolitycznego oraz parametrów krwi stwierdzono, że czasowy bezpośredni dłuższy kontakt krwi z kompozytem C/Si wpływa na ilościowe i morfologiczne zmiany krwinek czerwonych, białych i płytkowych. Zmiany te związane są prawdopodobnie ze składem, strukturą i właściwościami powierzchni materiału.

# Piśmiennictwo

[1] Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials. PN-EN ISO 10993-12, (2005), 1-15.

[2] Biological evaluation of medical devices. Part 4. Selection of tests for interactions with blood. PN-EN ISO 10993-4, (2003), 1-34.

[3] Polska Norma 86/C-04963: Oznaczanie pH wodnych roztworów produktów chemicznych.

 [4] Polska Norma 76/C-89291: Oznaczanie przewodności elektrycznej właściwej wyciągów wodnych.

[5] SinghalJ,P, RayA.: Synthesis of blood compatible polyamide block copolymers. Biomaterials 23, (2002), 1139-1245.

[6] Borzemska M: Comparative study of methods estimating the haemolytic activity of agueus plastic extracts .Polymers in Medicine 8, 2, (1978) 57-61.

was observed (TABLE 3, 5, 6). The values of erythrocytic (TABLE 4), leucocytic (TABLE 5) and thrombocytic (TABLE 6) indexes were in the range of referential values of those parameters. In the blood after contact with the material, an essential increase of plasmatic hemoglobin was observed after 4 and 24h (TABLE 7).

#### Summary

Biomaterials assigned for temporal and permanent contact with the organism should have biological neutrality. Blood is the most complex dynamic biological system in the living organism. Tests of hemolytic action and evaluation of blood morphotic parameters are one of more important indexes of tests in vitro of biocompatibility of the material with blood. The biological of in vitro of composite C/Si as material which can have use in the form of implant for direct contact with blood was the aim of the performed tests.

In the tests of the extract, decrease of value pH, and increased electrical conductivity were observed. It is connected with the structure of material, its porosity and the absorptiveness of fluid which helps migration of its components to the extraction fluid.

In the tests of the hemolytic action of composite C/Si, differentiated values of haemolysis percentage depending on the method of determination were observed. The lowest value of haemolysis percentage was observed for the extracts from composite C/Si and with use of diluted red cells. An increased percentage value and changes of red cells shape were observed in the determination with use of condensed erythrocytes or full blood where the evaluated material was in constant contact with the cells. Low pH of the aqueous extracts probably influenced the obtained measurement values. The released components from the composite C/Si caused the change of pH, and that caused decomposition of erythrocytes.

Evaluation of the influence of composite C/Si on blood was performed on the basis of the quantitative changes of the chosen haematological parameters. Full blood was subjected to temporal, direct contact with the material. In blood after temporal longer contact with composite C/Si, decrease of the values of erythrocytic (Hb, Ht, RBC) and PLT and pH parameters and increase of extracellular Hb concentration were observed.

On the basis of the obtained results of the tests of hemolytic action and blood parameters, it was observed that temporal direct longer contact of blood with composite C/Si influences quantitative and morphological changes of red, white cells and platelets. Those changes are probably connected with the composition, structure and properties of the material surface.

#### References

[7] Szymonowicz M., Pielka S., Owczarek A, Haznar D., Pluta J.: Study on influence of gelatin-alginate matrixes on the coagulation system and morphotic blood elements. Macromolecular Symposia 253, (2007),71-76.

[8] Szelest -Lewandowska A, Masiulanis M, Szymonowicz M, Pielka S, Paluch D: Modified Poly(carbonateurethane). Synthesis, properties and biological investigation in vitro. J.Biomed. Mat. Res. Part A, 82, 12, (2007), 509-520.

[9] Szymonowicz M., Pielka S., Paluch D., Żywicka B., Obłąkowska D., Błazewicz: Badania działania hemolitycznego wybranych materiałów węglowych Inż. Biomater., 77-80, (2008), 21-22.

[10]. Bomski H: Podstawowe badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 1995.

135

• • • • • • • • • • • • • • • • • • •

#### 136

# WPŁYW MATERIAŁÓW WĘGLOWYCH NA KRZEPNIĘCIE KRWI

Maria Szymonowicz<sup>1\*</sup>, Stanisław Pielka<sup>1</sup>, Danuta Paluch<sup>1</sup>, Bogusława Żywicka<sup>1</sup>, Ewa Karuga<sup>1</sup>, Dorota Obłąkowska<sup>2</sup>, Stanisław Błażewicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateria-Łów, Akademia Medyczna, ul. Poniatowskiego 2; 50-326 Wrocław, Polska <sup>2</sup>Katedra Biomateriałów, Wydział Inżynierii Materiałowej I Ceramiki, Akademia Górniczo-hutnicza, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska \*Mailto: Biochem@cheksp.am.wroc.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 136-140]

#### Wprowadzenie

Zapobieganie powstawania zakrzepów krwi na powierzchni biomateriałów i poznanie ich przyczyn jest ważnym zagadnieniem w opracowaniu materiałów przeznaczonych do wyrobu wszczepów mających bezpośredni kontakt z krwią. Doskonały materiał nie powinien wywierać żadnego wpływu na składniki krwi krążącej, jednakże praktyka wykazuje, że syntetyczne materiały zawsze w jakimś stopniu ulegają interakcji ze składnikami morfotycznymi krwi i oddziaływuja na proces krzepnięcia krwi [1]. Mechanizm wykrzepiania zależy zarówno od stanu chemicznego krwi, jak i właściwości strukturalnych i powierzchniowych implantu. Właściwości powierzchniowe materiału takie jak: zwilżalność, ładunek powierzchniowy, stan chemiczny i fizyczny powierzchni mogą w tym mechanizmie odgrywać istotną rolę. Materiały węglowe, dzięki dobrej tolerancji przez organizm, stanowią cenną grupę biomateriałów do praktycznego zastosowania w medycynie. Optymalne właściwości podłoża węglowego oraz lub zastosowanie pokrycia węglowego innego materiału o odpowiednich parametrach fizycznych, chemicznych i biologicznych w konstrukcji nowego układu, mogą stanowić interesują stanowić interesujący, perspektywiczny materiał dla wyrobów do zastosowania w układzie krążenia organizmu. W wyniku zastosowania różnych technik wytwarzania, oraz w zależności od stosowanego źródła węgla, można otrzymać węgiel o tej samej strukturze heksagonalnej, jednakże silnie zróżnicowany, zarówno pod względem parametrów strukturalnych jak i właściwości fizyko-chemicznych. Istotnym czynnikiem fizycznym, który również odgrywa ważną rolę w wartości wszczepu przeznaczonego do kontaktu z krwią jest nie tylko powierzchnia, ale również struktura elektronowa materiału węglowego [2,3].

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu materiałów węglowych na aktywację krzepnięcie krwi w badaniach in vitro.

#### Materiał

Do badań użyto cztery rodzaje materiałów węglowych. Wybrano materiały, mające strukturę grafitopodobną, różniące się parametrami d<sub>002</sub>, wielkością krystalitów, budową powierzchni w skali makroskopowej i mikroskopowej, oraz parametrami fizycznymi jak: chropowatością, właściwościami mechanicznymi i elektrycznymi.

Ocenie poddano: węgiel reaktorowy, węgiel typu HOPG (wysoko-orientowany grafit pirolityczny, anizotropowy), węgiel magnetronowy, węgiel szkłopodobny i węgiel typu

# INFLUENCE OF CARBON MATERIALS ON BLOOD COAGULATION

Maria Szymonowicz<sup>1\*</sup>, Stanisław Pielka<sup>1</sup>, Danuta Paluch<sup>1</sup>, Bogusława Żywicka<sup>1</sup>, Ewa Karuga<sup>1</sup>, Dorota Obłąkowska<sup>2</sup>, Stanisław Błażewicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Exsperimental Surgery and Biomaterials Research, Medical University 2 poniatowskiego Str, 50-326 Wroclaw, Poland <sup>2</sup>Department of Biomaterials Faculty of Materials Science and Ceramics, Agh-University of Science and Technology, 30 Mickiewicza Ave., 30-059 Cracow, Poland \*Mailto: Biochem@cheksp.am.wroc.pl

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 136-140]

#### Introduction

Prevention of blood clots formation on biomaterials surface and knowledge of their causes is an important issue in the study of materials assigned for production of implants having a direct contact with blood. The perfect material should not influence the circulating blood at all, but the practice shows that synthetic materials are always, to some extend, subjected to interaction with morphotic components of blood and they react on the process of blood coagulation [1]. The clotting mechanism depends both on the chemical condition of blood as well as the structural and surface properties of the implant. The surface properties of the material, such as: wettability, surface charge, chemical and physical condition of the surface can play an essential role in that mechanism. Carbon materials, thanks to good toleration by the organism, constitute a valuable group of biomaterials for practical use in medicine. The optimal properties of the carbon base and/or use of carbon coating of another material with correct physical, chemical and biological parameters in the construction of a new system can constitute an interesting, perspective material for products for use in the circulation system of organism. In the result of use of various production technologies and in dependence on the used carbon source, it is possible to obtain carbon with the same hexagonal structure, but strongly differentiated considering both structural parameters as well as physico-chemical properties. An essential physical factor, which also plays an important role in the value of implant assigned for contact with blood is not only the surface, but also the electronic structure of carbon material [2,3]. The aim of the work was evaluation of the influence of carbon materials on the activation of blood coagulation in tests in vitro.

#### Materials

Four kinds of pure carbon materials were used in the tests. Materials with graphite-like structure, differentiating with parameters  $d_{002}$ , cristallite size, surface structure in the macroscopic and microscopic scale and physical parameters like: roughness, mechanical and electrical properties were chosen. Nuclear carbon, HOPG graphite (highly - oriented pyrolytic graphite), magnetron carbon, glass-like carbon , LTI carbon (low-temperature isotropic carbon) and were selected. Characteristics of carbon materials, their basic physical and structural properties are presented in TABLE 1.

Materiał Material	G sto wła ciwa Mass density [g/cm³]	Porowato otwarta Open porosity [%]	Odległo mi dzypłaszczyznowa Interplanar distance d <sub>oo2</sub> , [A]	Wielko krystalitów Crystallite size [A]	Chropowato powierzchni Surface roughness Ra, [µm]
Nuclear carbon	1.75	<8	3.36	1030	)*
HOPG graphite	2.11	< 1	3.37	180	0.12±0.01
Magnetron carbon	)*	0	3.40	)*	)*
Glass-like carbon	1,42	0	3.71	10	0.004±0.0005
LTI carbon	1.89	1	3.39	18	0.06±0.008
)* - brak danych )* - lack of data					

TABELA 1. Właściwości fizyczne i strukturalne materiałów węglowych.TABLE 1. Physical and structural properties of carbon materials.

LTI (niskotemperaturowy izotropowy). Charakterystykę materiałów węglowych, podstawowe ich właściwości fizyczne i strukturalne podano w TABELI 1.

## Metody

#### Badania aktywacji układu krzepnięcia

Badania wykonano na krwi ludzkiej pobranej na 3,8% cytrynian sodu (1:10, V:V) [4,5,6].

Badanie krzepnięcia krwi na powierzchni materiału

Na próbkę materiału węglowego w postaci płytek o powierzchni 1cm<sup>2</sup> nanoszono 0,02ml krwi cytrynianowej i obserwowano jej kształt. Po 120sek. kontaktu krwi z powierzchnią materiału dodano 0,02ml 25mmol/I CaCl<sub>2</sub> (chlorek wapnia) i mierzono czas krzepnięcia krwi. Pomiar zakończono w chwili wystąpienia pierwszej nitki fibrynowej. Analogicznie wykonano pomiar krzepnięcia krwi na płytce szklanej oraz polistyrenowej, będące kontrolami [7,8].

#### Badanie krzepnięcia krwi po kontakcie z materiałem

Próbki materiału węglowego (3 szt., 0,5x0,5 cm) umieszczono w probówce polistyrenowej i inkubowano z 0,5ml krwi cytrynianowej przez 2 godz. w temp.37°C. Następnie dodano 0,5ml 25mmol/l CaCl<sub>2</sub> i mierzono czas krzepnięcia krwi. Pomiar zakończono w chwili wystąpienia pierwszej nitki fibrynowej. Analogicznie wykonano pomiar krzepnięcia krwi w probówce szklanej i polistyrenowej, będące kontrolami [8,9,10,11].

#### Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 6.02. Obliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Istotne różnice w średnich wartościach określono testem T dla prób niezależnych. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy p<0,05.

## Wyniki

Średnie wartości czasów krzepnięcia krwi cytrynianowej po uwapnieniu, odchylenie standardowe oraz poziom istotności dla materiałów węglowych podano w TABELI 2. Proces tworzenia skrzepu na powierzchni materiału węglowego porównano z procesem formowania skrzepu na materiałach będących wzorcami odniesienia, to znaczy na powierzchni płytki polistyrenowej i szklanej. Stopień zwilżalności mate-

#### Methods

#### Studies of activation of the coagulation system

The studies were performed on the human blood taken for 3,8% citrate sodium (1:10, V:V) [4,5,6].

**Study of blood coagulation on the material surface** 0,02ml of citrate blood was spread on a sample of carbon material in a form of plates with the surface of 1cm<sup>2</sup> and its shape was observed. After 120 seconds of blood contact with the material surface, 0,02ml 25 mmol/l CaCl<sub>2</sub> (calcium chloride) solution was added and blood coagulation time was measured. The measurement was finished with the appearance of the first fibrin thread. Similarly, measurement of blood coagulation was performed on a glass and polystyrene plate constituting control [7,8].

# Study of blood coagulation after contact with the material

Samples of carbon material (3 pieces, 0,5x0,5 cm) in the polystyrene tube were incubated with 0,5 ml citrate blood over 2h at temp.37°C. Next,  $0,5ml 25mmol/l CaCl_2$ was added and blood coagulation time was measured. The measurement was finished with the appearance of the first fibrin thread. Similarily, measurement of blood coagulation was performed in a glass and polystyrene tubes which were controls [8,9,10].

#### Statistical analysis

The results of the studies were subjected to statistical analysis with use of program Statistica 6.02. The arithmetical mean value and standard deviation were counted. The essential differences in mean values were determined with test T for independent tests. It was accepted that correlation coefficients are essential at p<0,05.

## Results

The mean values of the coagulation times of citrate blood after calcification measured on the surface of carbon materials are presented in TABLE 2. The process of clot formation on the surface of carbon material was compared with the process of clot formation on the materials being reference standards, that is on the surface of a polyester and glass plate.

The wettability degree of the material and coagulation time were determined with placing a blood drop on it and on the standard materials. On the surface of nuclear carbon, 138

Materiał Material	Czas krzepni cia krwi Blood coagulation time [s]	Czas Blood Wydłu e- nie Prolonga- tion w sto rela P	Skröcenie Skrócenie Shortening Shortening Sunku do ation to co S	a krwi on time Wydłu enie Prolongation kontroli ontrol Szkło/Glass [%]
Nuclear carbon	290±17,25*##	-	13	26
HOPG graphite	288±16,78*##	-	12	25
Magnetron carbon	249±6,99**#	-	24	8
Glass-like carbon	373±8,34*###	14	-	63
LTI carbon	395±10,70**###	20	-	71
Kontrola PS Szkło/Glass	329±10,38 230±9,88	-	-	-
<ul> <li>*p&lt;0,05, **p&lt;0,01, ***p&lt;0,001- w porównaniu do powierzchni polistyrenowej (PS)</li> <li>*p&lt;0,05, **p&lt;0,01, ***p&lt;0,001 - differences to the polystyrene surface (PS).</li> <li>#p&lt;0,05, ##p&lt;0,01, ###p&lt;0,001- w porównaniu do powierzchni szklanej</li> <li>#p&lt;0,05, ##p&lt;0,01, ###p&lt;0,001 - differences to the glass surface</li> </ul>				
TABELA 2. Średnie wartości czasów krzepnięcia				

TABELA 2. Srednie wartości czasów krzepnięcia krwi na powierzchni materiałów węglowych. TABLE 2. Values of blood coagulation time of carbon materials surface.

riału węglowego i czas krzepnięcia oznaczono po umieszczeniu na nim i na materiałach wzorcowych kropli krwi.

Na powierzchni węgla reaktorowego, grafitu HOPG, węgla szkłopodobnego, LTI oraz polistyrenowej kropla krwi cytrynianowej miała kształt kulisty, natomiast na powierzchni węgla magnetronowego oraz powierzchni szklanej była rozpłaszczona.

Czas krzepnięcia krwi w porównaniu do powierzchni polistyrenowej był skrócony dla: węgla reaktorowego o 13% (p<0,05), węgla HOPG o 12% (p<0,05), węgla magnetronowego o 24% (p<0,01), a wydłużony dla węgla szkłopodobnego o 14% (p<0,05) i węgla LTI o 20% (p<0,01).

Czas krzepnięcia krwi w porównaniu do powierzchni szklanej był wydłużony dla: węgla reaktorowego o 26% (p<0,01), węgla HOPG o 25% (p<0,01), węgla magnetronowego o 8% (p<0,05), a węgla szkłopodobnego o 63% (p<0,001) i węgla LTI o 71% (p<0,001).

Porównując miedzy sobą oceniane materiały węglowe stwierdzono, że powierzchnia węgla LTI wydłuża czas krzepnięcia w porównaniu do: węgla reaktorowego o 26% (p<0,01), grafitu HOPG o 27% (p<0,01), węgla magnetronowego o 37% (p<0,001), a węgla szkłopodobnego o 5% (p<0,05).

Średnie wartości czasów krzepnięcia krwi, odchylenie standardowe i poziom istotności dla materiałów węglowych podano w TABELI 3. Czas krzepnięcia krwi cytrynianowej mierzono w probówce polistyrenowej po zanurzeniu w niej materiału węglowego i dodaniu chlorku wapniowego. Otrzymane wartości pomiarowe porównano z czasem krzepnięcia krwi w probówce polistyrenowej oraz szklanej.

Czas krzepnięcia krwi w porównaniu do powierzchni polistyrenowej probówki był istotnie skrócony dla węgla reaktorowego o 55% (p<0,001), węgla HOPG o 42%

		Czas krze Blood coa	epni cia krwi gulation time		
	Czas	Skrócenie	Skrócenia		
	krzepni cia krwi	Shortening	Shortening		
Materiał	Blood	w stosunk	u do kontroli		
Material	coagulation time	relation	to control		
Widcorial	oougulation time	PS	Szkło/Glass		
	[s]	[%]	[%]		
Nuclear					
Nuclear	139±9,76***###	55	<b>F</b> 1		
carbon			51		
HOPG		10			
graphite	178±16,15 *** ##	42	38		
iviagnetron	145±18,25 *** ###	53	50		
carbon					
Glass-like	100.1400***	10	10		
carbon	100±14,00 *** ###	40	42		
1.71					
LII	239±16,39 * #	22	17		
carbon					
Kontrola	308+18.40	_			
PS	277+14.90		-		
Szkło/Glass	277±14,00	-	-		
*p<0.05, **p	<0.01, ***p<0.001-	w porównani	u do powierzchni		
1	probówki polisty	, renowei (PS			
*p<0.05, **p	<0.01. ***p<0.001 -	differences to	, o the polystyrene		
tube surface (PS)					
$\#$ n<0.05 $\#$ m<0.01 $\#$ $\#$ n<0.001 $\cdot$ w porównaniu do powierzch-					
ni probówki szklanei					
#n<0.05 ##r	$\sim 0.01 \# \# m < 0.001$	- differences	to the glass tube		
"p<0,00, ""	surfa	CD COLOR	co cho giuss cube		
	surface				

#### TABELA 3. Średnie wartości czasów krzepnięcia krwi po zanurzeniu w niej materiałów węglowych. TABLE 3. The mean values of the coagulation time of citrate blood after submerging carbon materials.

graphite HOPG, glass-like carbon, LTI and polyester surface, a drop of citrate blood had a spherical shape, but on the surface of magnetron carbon and on the glass surface, it was flattened.

The coagulation time in comparison to the polyester surface was essentially shortened for: nuclear carbon by 13% (p<0,05), carbon HOPG by 12% (p<0,05), magnetron carbon by 24% (p<0,01) and glass-like carbon by 14% (p<0,05), carbon LTI prolonged by 20% (p<0,01).

The coagulation time in comparison with the glass surface was essentialy prolonged for: nuclear carbon by 26% (p<0,01), carbon HOPG by 25% (p<0,01), magnetron carbon by 8% (p<0,05), glass-like carbon by 63% (p<0,001), and carbon LTI by 71% (p<0,001).

Comparing the evaluated materials among each other, it was observed that the surface of carbon LTI prolongs the coagulation time in comparison with: nuclear carbon by 26% (p<0,01), graphite HOPG by 27% (p<0,01), magnetron carbon by 37% (p<0,001), and glass-like carbon by 5% (p<0,05).

The mean values of the blood coagulation times with a standard deviation as well the as essentiality level are given for carbon materials in TABLE 3. The blood coagulation times were measured in the polystyrene tube after submerging the carbon material and calcium chloride in blood. The obtained values were compared to the coagulation time in the polyester and in the glass tube.

The blood coagulation time with comparison with the polyester surface was essentially shortened for: nuclear carbon by 55% (p<0,001), carbon HOPG by 42% (p<0,001), magnetron carbon by 53% (p<0,001), glass-like carbon by 46% (p<0,001), and carbon LTI by 22% (p<0,05).

(p<0,001), węgla magnetronowego o 53% (p<0,001), węgla szkłopodobnego o 46% (p<0,001), a węgla LTI o 22% (p<0,05).

Czas krzepnięcia krwi w porównaniu do powierzchni szklanej probówki był istotnie skrócony dla węgla reaktorowego o 51% (p<0,001), węgla HOPG o 38% (p<0,01), węgla magnetronowego o 50% (p<0,001), węgla szkłopodobnego o 42% (p<0,01), a dla węgla LTI o 17% p<0,05). Porównując między sobą oceniane materiały węglowe stwierdzono, że węgiel LTI wydłuża czas krzepnięcia krwi w porównaniu do: węgla reaktorowego o 42% (p<0,001), grafitu HOPG o 26% (p<0,01), węgla magnetronowego o 39% (p<0,001), a węgla szkłopodobnego o 31% (p<0,001).

Utworzone skrzepy wokół badanych materiałów węglowych, z wyjątkiem grafitu HOPG, były luźno związane z próbkami i po dotknięciu ich bagietką plastikową swobodnie oddzielały się od ich powierzchni. Skrzep wokół grafitu HOPG wnikał w jego strukturę, a tym samym jego przyczepność do powierzchni była większa. Natomiast wokół węglu reaktorowego stwierdzono delikatną "sieć", łączącą powierzchnię materiału ze skrzepem, którą razem z nim łatwo można było usunąć z materiału. Skrzepy utworzone wokół węgla magnetronowego, szkłopodobnego oraz LTI odchodziły od powierzchni nie wykazywały właściwości adhezyjnych.

#### Podsumowanie

Krew cytrynianowa zawiera wszystkie czynniki krzepnięcia z wyjątkiem wolnych jonów wapniowych. Po dodaniu chlorku wapnia następuje aktywacja krzepnięcia, co prowadzi do przekształcenia fibrynogenu w fibrynę i utworzenia skrzepu.

Celem pracy było określenia wpływu wybranych parametrów strukturalnych, fizycznych i chemicznych powierzchni materiałów węglowych,

W przeprowadzonych badaniach proces krzepnięcia krwi obserwowano na powierzchni materiałów węglowych oraz po ich czasowym pełnym zanurzeniu we krwi.

Proces formowania skrzepu na powierzchni węgla reaktorowego, węgla HOPG węgla magnetronowego, węgla szkłopodobnego, węgla LTI był wydłużony w porównaniu do powierzchni szklanej. Dla węgla LTI oraz dla szkłopodobnego stwierdzono najwyższe wartości czasu krzepnięcia.

Czas krzepnięcia krwi na powierzchni węgla LTI i szkłopodobnego był wydłużony w porównaniu do powierzchni polistyrenowej. Natomiast czas krzepnięcia na pozostałych powierzchniach materiałów węglowych był skrócony. Najmniejsze skrócenie czasu stwierdzono dla węgla HOPG.

Proces formowania skrzepu w probówce, po pełnym zanurzeniu we krwi węgla reaktorowego, węgla HOPG, węgla magnetronowego oraz węgla szkłopodobnego był skrócony w porównaniu do powierzchni polistyrenowej i szklanej. Dla węgla LTI stwierdzono najmniejsze skrócenie czasu krzepnięcia w porównaniu do powierzchni polistyrenowej oraz największe wydłużenie czasu krzepnięcia do powierzchni szklanej.

Podsumowując można stwierdzić, że zaobserwowane skrócenie wartości czasów krzepnięcia krwi, po czasowym jej kontakcie z materiałami węglowymi, świadczy o aktywacji procesu krzepnięcia krwi przez te materiały. Stopień aktywacji zależy od rodzaju materiału. Najbardziej aktywuje węgiel reaktorowy. Węgiel LTI i szkłopodobny wykazują optymalne właściwościami biologiczne. Z ocenianych materiałów , węgiel LTI i stotnie spowalnia aktywację procesu krzepnięcia krwi The coagulation time in comparison with the glass surface was essentially shortened for: :nuclear carbon by 51% (p<0,001), carbon HOPG by 38% (p<0,01), magnetron carbon by 50% (p<0,001), glass-like carbon by 42% (p<0,01), and carbon LTI by 17% (p<0,05). Comparing the evaluated carbon materials among each other, it was observed that carbon LTI prolongs the coagulation time in comparison with: nuclear carbon by 42% (p<0,001), graphite HOPG by 26% (p<0,01), magnetron carbon by 39% (p<0,001), and glass-like carbon by 31% (p<0,001).

The clots formed around the studied carbon materials were loosely connected with the tubes and freely separated from their surface after touching them with a plastic rod. The clot around graphite HOPG penetrated into its structure and at the same time its adherence to the surface was larger. Whereas a delicate "net" connecting the material surface with the clot which could be easily removed with it from the material was observed around nuclear carbon. The clots formed around magnetron, glass-like and LTI carbon were coming off the surface and did not show adhesive properties.

#### Summing

Citrate blood contains all coagulation factors except calcium ions. After adding calcium chloride, coagulation activation appears that leads to transformation of fibrinogen into fibrin and clot formation.

Determination of the influence of the chosen structural as well as physical and chemical parameters of carbon materials surfaces was the aim of the work. In the performed studies the process of blood coagulation was observed on the surface of carbon materials and after their temporal full submersion in blood.

The process of clot formation on the surface of nuclear carbon, carbon HOPG, magnetron carbon, glass-like carbon, carbon LTI was prolonged in comparison with the glass surface. The highest values of coagulation time was observed for LTI and glass-like carbon.

The coagulation time on the surface of LTI and glasslike carbon was prolonged in comparison with polystyrene surface. However, the coagulation time on the remaining surfaces of carbon materials was shortened. The smallest time shortening was observed for carbon HOPG.

The process of clot formation after its full submersion of nuclear carbon, carbon HOPG, magnetron carbon and glass-like carbon in blood was shortened in comparison with polystyrene and glass surface. The smallest shortening of coagulation time was observed for carbon LTI in comparison with polystyrene, but in comparison with the glass surface, the largest prolongation of coagulation time was observed.

Summing-up it can be stated that the observed shortening of the values of blood coagulation times after its temporal contact with carbon materials is the evidence of the activation process of blood coagulation by those materials. The activation degree depends on the kind of material. Nuclear carbon activates most. LTI and glass-like carbon show the optimal biological properties. From the evaluated carbon materials, carbon LTI essentially slows down the process of blood coagulation activation

139

#### Piśmiennictwo

[1] Paluch D., Szymonowicz M., Rutowski R. Milewski A., Pielka S., Solski L., Raczyński K.: Intraoperative studies and studies parameters of coagulation and fibrinolysis following implantation of DALLON H prostheses with greater surfach wettability. Polim Med 32, (2002), 65-79.

[2] Błażewicz S., Chłopek J., Błażewicz M.,: Biomateriały węglowe i kompozytowe. W: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna,t.4, Biomateriały, red. Błażewicz S., Stoch L., Akademicka Oficyna Wydawnicza ,Warszawa (2003), 332-423.

[3] Nawrot Z.: Biomateriały w kariochirurgii. W: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna,t.4, Biomateriały, red. Błażewicz S., Stoch L., Akademicka Oficyna Wydawnicza ,Warszawa (2003), 530-581.

[4] Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials. PN-EN ISO 10993-12, (2005), 1-15.

[5] Biological evaluation of medical devices. Part 4. Selection of tests for interactions with blood. PN-EN ISO 10993-4, (2003), 1-34.

[6] Szymonowicz M., Łowkis B: In vitro testing method of polymers candidate destined for contact with blood. Polim Med 20, 1-4, (1990) 43- 54.

[7] Szymonowicz M., Pielka S., Owczarek A, Haznar D., Pluta J.: Study on influence of gelatin-alginate matrixes on the coagulation system and morphotic blood elements. Macromolecular Symposia 253, (2007), 71-76.
[8] Szelest -Lewandowska A., Masiulanis M., Szymonowicz M., Pielka S., Paluch D.: Modified Poly(carbonateurethane). Synthesis, properties and biological investigation in vitro. J. Biomed. Mat. Res. Part A, 82, 12, (2007), 509-520.

[9] Bomski H.: Podstawowe badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 1995.

[10] Pielka S., Szymonowicz M., Paluch D., Karaś J., Librant Z., Karmelita-Buczyńska H., Jegerman Z: Investigation of sulphur composites reaction on the coagulation system and cellular elements of blood. Inż Biomater. 6, (2003), 63-66.

[11] Pielka S., Szymonowicz M., Paluch D., Librant Z., Karaś J., Karmelita-Buczyńska H., Jegerman Z: Estimation of the reaction of the state of corundum ceramics surface rougfness on the chosen blood parameters. Inż. Biomater. 6, (2003), 59-62.

# WPŁYW DODATKU GRAFITU NA STRUKTURĘ I WŁAŚCIWOŚCI SPIEKANYCH BIOMATERIAŁÓW KOMPOZYTOWYCH NA BAZIE TYTANU

PIOTR DEPTUŁA, JAN R.DĄBROWSKI\*

Politechnika Białostocka, Wydział Mechaniczny Wiejska 45C, 15-351 Białystok, Polska \*MAILTO: jrd@pb.edu.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 140-142]

#### Wprowadzenie

Tytan i jego stopy uważa się za najbardziej obiecujące metaliczne biomateriały, z powodu kombinacji ich dobrych właściwości mechanicznych i biokompatybilności w środowisku tkankowym. Tytan i jego stopy są szeroko stosowane w medycynie, w produkcji elementów rekonstrukcyjnych dla zespoleń kości i endoprotezoplastyce [1-4]. Zastosowanie stopów tytanu jako powierzchnie tarcia w endoprotezoplastyce jest ograniczone przez słabe właściwości tribologiczne i słabą odporność na zużycie. Jest to poważnym mankamentem tego typu stopów implantacyjnych, co znacznie ogranicza ich zastosowanie w węzłach tarcia układów biologicznych (stawy, układy stomatologiczne) [5]. Liczne badania skupione są na modyfikacji właściwości tribologicznych tytanu, głównie za pomocą metod inżynierii powierzchni, jak implantacja jonów, azotowanie i osadzanie cienkich odpornych na zużycie warstw. Jednakże długoterminowe obserwacje powierzchni tarcia implantów wykazały niebezpieczeństwo lokalnych zniszczeń i rozwarstwienia cienkich warstw co intensyfikuje zużycie i może powodować potrzebę reimplantacji. Dodatek grafitu do tytanu, dla zmniejszenia współczynnika tarcia i zwiększenia odporności na zużycie, może dać wieloskładnikowy materiał, który nie będzie posiadał wymienionych wad [6-8].

# THE INFLUENCE OF SINTERING TEMPERATURE ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF TITANIUM-GRAPHITE COMPOSITES

PIOTR DEPTUŁA, JAN R.DĄBROWSKI\*

BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, 45C WIEJSKA STR. 15-351 BIALYSTOK, POLAND \*MAILTO: JRD@PB.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 140-142]

#### Introduction

. . . . . . . . . . . . . . . . .

Titanium and its alloys are considered to be the most prospective metallic biomaterials due to the unique combination of good mechanical properties and biocompatibility in human tissue environment. Titanium and its alloys are widely used in medical applications, e.g. in manufacture of reconstructive elements for fixing of bone fragments, prosthetic implants, and joint endoprostheses [1-3]. The use of titanium alloys as bearing surfaces in total human replacements is limited by very poor tribological properties and wear resistance. This is a serious fault on this type of implant alloys, which significantly limit their application in biotribological systems (joints, dental system) [4]. Numerous research are focused on modification of titanium tribological properties mainly by means of surface engineering methods, like ion implantation, nitriding processes and deposition of thin wear resistance coatings. However, the long term observation of implants with surface treated friction elements showed the danger of local damage and delamination of hard layer which intensified materials wear and might cause necessity of revision surgery. The addition of graphite to lower the friction coefficient and increase wear resistance could produce a multi-component material that overcomes these disadvantages [5].

#### References

Celem prezentowanej pracy były badania materiałów kompozytowych na bazie tytanu z dodatkiem grafitu. W pracy badano wpływ modyfikatora na strukturę i właściwości użytkowe takich kompozytów.

#### Materiały i metodyka badań

Próbki wykonane były metodą metalurgii proszków. Badano materiały kompozytowe na bazie tytanu z dodatkiem 10% i 20% grafitu (Ti+C). Proszki czystego tytanu o rozmiarze ziaren poniżej 150µm oraz proszki grafitu były mieszane, prasowane na zimno pod ciśnieniem 500MPa i spiekane przez 3 godziny w próżni, w temperaturach 950, 1050, 1150 i 1230°C.

Mikrostruktura materiałów badana była przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego Hitachi S-3000N. Badania twardości wykonano metodą Brinella, pomiary mikrotwardości badane były metodą Vickersa przy pomocy optycznego mikroskopu NEOPHOT-21.

#### Wyniki i dyskusja



RYS.1. Wpływ temperatury spiekania na zagęszczalność kompozytów Ti+10%C. FIG.1. Influence of sintering temperature on Ti-10%C composites density.

Wypraski kompozytów z dodatkiem grafitu przed spiekaniem charakteryzowały się dobrą zagęszczalnością. Gęstość względna wyprasek była na poziomie 83% (RYS.1). Ten fakt można wytłumaczyć dobrymi właściwościami smarnymi grafitu podczas procesu prasowania. Gęstość materiałów po spiekaniu rosła wraz ze zwiększającą się temperatura w procesie spiekania (RYS.1).

Największą zagęszczalność posiadał materiał spiekany w temperaturze 1230°C. To wskazuje na reakcje pomiędzy

składnikami kompozytów w trakcie spiekania.

Mikrostruktura materiałów kompozytowych spiekanych w różnych temperaturach potwierdza ten fakt. W wyniku dyfuzji na granicy między fazami tytanu i grafitu pojawiła się nowa faza. RYS.2 pokazuje, że interakcje pomiędzy metaliczna osnową i modyfikatorem podczas spiekania obserwowane były we wszystkich badanych temperaturach spiekania.

llość nowej fazy – węglika tytanu rosła wraz ze wzrostem temperatury spiekania. Największą dyfuzję węgla zaobserwowano dla temperatury spiekania 1230°C.

Pomiędzy strukturą i twardością

The goal of the present investigation was to research the composite materials based on titanium powder with the addition of graphite. This study examined the influence of modifiers on the structure and functional properties of a such titanium composites.

#### Materials and method

Specimens were manufactured by means of powder metallurgy method. The composite materials based on titanium powder with 10% and 20% volume fraction of graphite (Ti+C) were investigated. Commercially pure titanium powder with the the particle size below 150 $\mu$ m with graphite were mixed, cold compacted under pressure of 500MPa, and sintered for 3 hour in vacuum at the temperature of 950, 1050, 1150 and 1230°C.

The microstructure of the composite materials was observed by means of scanning electron microscope Hitachi S-3000N. Hardness was measured by Brinnel method, micro-hardness was measured by Vickers method with the optical microscope Neophot-21.

#### **Results and discussion**

The green specimens of composites with graphite addition before sintering were characterized by good compactibility. The relative density of received molder was about 83% (FIG.1). This fact could be explained by good lubricating effect of graphite during compaction process. Subsequently, material density increased as result of increasing temperature of sintering process (FIG.1). The biggest compactibility has material before sintering in 1230°C. It indicates the possibility of thermally activated reaction between components during sintering.

The microstructures of the composite materials titanium modifiers sintered under different temperatures confirmed this fact. As result of diffusion the new phase titanium carbide appeared on the border between titanium grains and graphite. FIG.2. showed that interactions between the metallic basis and modifier during sintering were observed in the whole range of investigated temperatures. The volume of titanium carbide increased with the increase temperature of sintering. Highest diffusion of carbon to titanium was noticed during sintering under the temperature of 1230°C.

A good correlation has been found between structural analysis and hardness of investigated composites. The results of macro-hardness measured by Brinnel method as well as the average micro-hardness of material showed the significant influence of sintering temperature on composite properties. The macrohardness of titanium-graphite





142

kompozytów znaleziono zależność. Wyniki badań twardości metodą Brinella jak i średnie wyniki mikrotwardości materiałów pokazały wpływ temperatury spiekania na właściwości kompozytów. Twardość kompozytu spiekanego w temperaturze 950°C wyniosła 90HB, podczas gdy twardość czystego tytanu wynosi 83,4HB. Twardość kompozytu spiekanego w temperaturze 1230°C była zbliżona do twardości stali wysoko węglowej (RYS.3). Wpływ temperatury spiekania na średnią wartość mikrotwardości kompozytów był bardziej istotny. Uzyskane wyniki pokazują interakcje pomiędzy metaliczna osnową i modyfikatorem podczas spiekania (RYS.4).

Bardzo optymistyczne wyniki badań wstępnych otrzymanych kompozytów stanowią ważną argumentację dla kontynuacji tych badań, szczególnie właściwości mechanicznych i charakterystyk tribologicznych.

#### Podsumowanie

Ostatnie badania wskazują, że metalurgia proszków daje duże możliwości w produkcji nowych materiałów do zastosowań biomedycznych. Materiały kompozytowe na bazie tytanu z dodatkiem grafitu mają złożoną strukturę, będącą rezultatem oddziaływania pomiędzy tytanem i modyfikatorem podczas spiekania.

Zaobserwowany został znaczący wpływ temperatury spiekania na twardość kompozytów. Dodatkowo obecność cząstek węglika tytanu powinna mieć wpływ na spójność i właściwości materiałów kompozytowych na bazie tytanu. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że grafit korzystnie wpływa na właściwości kompozytów na bazie tytanu. Dodatek grafitu zmienia warunki tarcia, zmniejsza współczynniki tarcia i zużycie podczas tarcia. Badania wstępne wskazują, że wzrost zawartości grafitu (do 20%) korzystnie wpływa na obniżenie oporów ruchu i zużycia takich materiałów. Ocena właściwości mechanicznych i charakterystyk tribologicznych otrzymanych kompozytów będzie przedmiotem dalszych badań.



#### RYS.3. Wyniki pomiarów twardości kompozytów Ti+10%C.

# FIG.3. Results of hardness measurements for Ti+10%C composites.

composites sintered under the temperature of 950°C approximated about 90HB, whereas hardness of pure bulk titanium amounts to 83,4HB. The hardness value of the composites with graphite sintered under 1230°C was similar to the high-carbon normalized steel (FIG.3).

The effect of sintering temperature on average microhardness of composites was even more substantial. Obtained results showed interactions between the metallic basis and modifier during sintering (FIG.4). The Vickers impressions and microhardness values are showed on these pictures.

Very optimistic results of the preliminary researches received composites, proclaim important argumentation for continuation this researches, especially mechanical properties and tribological characteristics.

#### Conclusion

The recent research showed that powder metallurgy method offers the possibility of producing a new materials for biomedical applications. Composite materials on the basis of titanium with graphite additions have a compound structure as result of reaction between the titanium and modifier during sintering process.

The significant strengthening effect of sintering temperature on composite hardness was observed. Additionally, the

presence of graphite phase, appeaning in-situ, should have a good influence on cohesion and properties of titanium based composite materials.

On the grounds of the obtained results it can be claimed that graphite wield good influence on titanium based composite materials. The graphite addition changed the friction conditions and ensured a significant decrease of the motion resistance and wear during friction. Preliminary researches shows that increase the volume fraction of graphite (up to 20%) favorably influence on decrease motion resistance and wear this type of composites. Estimation mechanical properties and tribological characteristics received composites will be a object for further research.



RYS.4. Wpływ dyfuzji węgla na mikrotwardość (HV0,1) próbek tytanowych spiekanych w temperaturze: a) 950°C, b) 1230°C. FIG.4. Influence of carbon diffusion on microhardness (HV0,1) of titanium samples sintered under the temperature of: a) 950°C, b) 1230°C.

#### Piśmiennictwo

[1]. Katti K.: Biomaterials in total hip replacement, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 39 (2004), s. 133-142.

[2]. Kohn D.H.: Metals in medical applications. Current Opinion in Solid State and Materials Science (1998): 309-316.

[3]. Long M., Rack H.J.: Review: Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. Biomaterials 19 (1998): 1621-1639.

- [4]. Bylica A., Sieniawski J.: Tytan i jego stopy. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1985
- [5]. Liu X., Chu P.K., Ding C.: Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Enginnerind R7 (2004): 49-121.



# TROMBOGENNOŚĆ WARSTW TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) WYTWORZO-NYCH W OBSZARZE PLAZMY NA STOPIE TYTANU Ti6AI4V

M.Gonsior<sup>1\*</sup>, R.Kustosz<sup>1</sup>, M.Sanak<sup>2</sup>, B.Jakiełła<sup>2</sup>, T.Borowski<sup>3</sup>, M.Ossowski<sup>3</sup>, T.Wierzchoń<sup>3</sup>

 <sup>1</sup>Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii, Zabrze
 <sup>2</sup>II Katedra Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum, Kraków
 <sup>3</sup>Politechnika Warszawska, Warszawa
 \*MAILTO: gosiag@frk.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 143-145]

#### Wstęp

Tytan i jego stopy wykazują wiele korzystnych własności w zastosowaniach medycznych. W stosunkowo małym stopniu ulegają metalozie, wykazują bardzo dobrą biotolerancję w środowisku tkanek, wysoką odporność na korozję i stabilność termodynamiczną w warunkach fizjologicznych. Jednym z problemów w zastosowaniach tytanu i jego stopów, jako biomateriałów jest ich trombogenność. Z tego względu szuka się odpowiedniej warstwy modyfikującej powierzchnię tytanu w celu polepszenia jego własności w kontakcie z krwią. Techniki inżynierii powierzchni są dziś punktem wyjścia dla prawidłowego doboru składu chemicznego, struktury i fizykochemicznego stanu powierzchni biomateriałów w celu zapewnienia im pożądanych właściwości i funkcji biologicznych. Obróbki powierzchniowe tytanu i jego stopów wpływają na strukturę i morfologię warstwy powierzchniowej, przyczepność oraz stan naprężeń własnych w warstwach, co ma wpływ na stabilność całego implantu w środowisku żywego organizmu oraz na polepszenie biokompatybilności.

W pracy określono mikrostrukturę, chropowatość oraz trombogenność dyfuzyjnych warstw azotku tytanu wytworzonych na stopie tytanu Ti6Al4V w celu weryfikacji ich biokompatybilności z krwią.

#### Materiał i metody

Warstwy azotku tytanu zostały wytworzone w Zakładzie Inżynierii Powierzchni Politechniki Warszawskiej. Dyfuzyjne warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) wytworzono w obszarze plazmy w warunkach wyładowania jarzeniowego. Temperatura procesu wynosiła 700°C, czas obróbki 4 godz. Przed procesem azotowania próbki zostały wypolerowane przy pomocy zawiesiny koloidalnej tlenku krzemu. Wykonano badania:

1. Mikrostruktury i topografii powierzchni warstwy.Mikrostrukturę na przekroju poprzecznym warstw przeanalizowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego HITACHI S-3500N. Wartości stereometryczne uzyskano przy pomocy skanującego profilometru optycznego Wyko NT9300.

2. Badania trombogenności powierzchni, w warunkach oddziaływania sił ścinających w krwi pełnej, przeprowadzono na urządzeniu Impact-R (DiaMed, Szwajcaria), w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Badania przeprowadzono metodą Impact-R, która ocenia aktywację płytek krwi w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, w pełnej krwi cytrynianowej, przepływającej nad powierzchnią próbki badanego biomateriału, z

# THROMBOGENICITY OF TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) LAYER PRODUCED IN PLASMA SPACE ON Ti6AI4V ALLOY

M.Gonsior<sup>1\*</sup>, R.Kustosz<sup>1</sup>, M.Sanak<sup>2</sup>, B.Jakiełła<sup>2</sup>, T.Borowski<sup>3</sup>, M.Ossowski<sup>3</sup>, T.Wierzchoń<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FUNDATION FOR CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT, ZABRZE <sup>2</sup>II DEPARTMENT OF INTERNAL DISEASES, COLLEGIUM MEDICUM, CRACOW <sup>3</sup>TECHNICAL UNIVERSITY, WARSAW \*MAILTO: GOSIAG@FRK.PL

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 143-145]

#### Introduction

Titanium and its' alloys demonstrate numbers of beneficial properties in medical applications. It are subject to metallosis in low range, demonstrate very good biotolerance to tissue habitat, high resistance to corrosion, and thermodynamical stability in physiological conditions.

The thromobogenicity is one among of problems, regarding titanium and its' alloys applications as the biomaterials. For that reasons appropriate surface modifying layer of titanium is developed - to improve material properties for blood contact. Nowadays, surface engineering techniques are used as base point for creation a proper chemical composition, structure and physicochemical status of biomaterials surfaces - to obtain its required biological properties and functions. The surface modifications of titanium and its' alloys influence surface layer structure and morphology, adhesion and inside layer residual stress. That influence total implant stability in live organism habitat as well as improve biocompatibility. The microstructure, roughness and thrombogenicity of diffusive titanium nitride layers on titanium Ti6A14AI alloy are examined in the work - to verify blood biocompatibility.

#### Material and methods

. . . . . . . . . . . .

The titanium nitride layers were formed in Surface Engineering Department of Technical University Warsaw. The TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) diffusive layers were formed in plasma space within glow discharge. The process temperature amounts 700°C, the treating time – 4 hours. The samples were polished before nitriding process, utilizing colloid silicon oxide suspension. The following examinations were performed:

1. Surface topography and microstructure. The crosssection layers microstructure was analyzed utilizing electron scanning microscope HITACHI S-3500N. Stereometric values were obtained using optical scanning profilemeter Wyko NT9300

2. Surface thrombogenicity investigations, utilizing model of shear stress induced for whole blood by the biomaterial surface, were performed utilizing Impact-R device (DiaMed, Swiss). Examinations were completed by team of Molecular Biology and Clinical Genetic Lab of II Department for Internal Medicine in Collegium Medicum Jagiellonia University, Cracow. The Impact-R method determines platelets activation during experiment with simulation of citrated whole blood flowing above the biomaterial surface in physiological-like conditions. The 14,5mm discs of Ti6Al4V alloy with diffusive TiN+Ti<sub>2</sub>N+  $\alpha$ TiN (titanium nitride) layer formed on

144

określoną szybkością i w określonym czasie. Do badań przygotowano krążki o średnicy 14,5mm ze stopu tytanu Ti6Al4V z wytworzoną warstwą dyfuzyjną TiN+Ti₂N+ αTiN (azotek tytanu). Metoda sterylizacji jest ważnym czynnikiem wpływającym na własności powierzchni biomateriału. W celu porównania wpływu metod sterylizacji, testowano każdorazowo próbki sterylizowane dwoma metodami: sterylizacją gazową tlenkiem etylenu oraz sterylizacją plazmową. Celem badań było porównanie stopnia aktywacji, agregacji i adhezji płytek krwi na różnych powierzchniach biomateriału.

#### Wyniki i wnioski

#### Badania struktury warstwy

Warstwy wytworzone w procesie azotowania charakteryzowały się jednorodną strukturą na całej powierzchni próbek. Proces prowadzony w obszarze plazmy umożliwił eliminację efektu krawędziowego, dzięki czemu warstwy w środku i na krawędzi próbek posiadały jednakową grubość, twardość oraz skład fazowy i chemiczny.

Strefa azotków tytanu typu TiN+Ti2N wytworzona w procesie azotowania jarzeniowego posiadała grubość ok.

1,5µm, a ze strefą dyfuzyjną αTi(N) grubość warstwy wynosiła ok. 8µm. Twardość warstwy mierzona od powierzchni wynosiła 1180 HV0,05 (stopu Ti6Al4V - 415HV0,05), z czego wynika, że wytworzenie warstw azotowanych pozwoliło zwiększyć twardość materiału prawie trzykrotnie. Warstwy azotowane w obszarze plazmy posiadały chropowatość rzędu Ra na poziomie 0,138µm, a Rq około 0,180µm.

#### Badania trombogenności warstwy

Analizowane parametry wskazujące na poziom aktywacji trombocytów: odsetek agregatów monocytowo-płytkowych i granulocytowo-płytkowych, liczba płytek krwi, agregaty płytkowe, duże i małe agregaty płytkowe, stopień aktywacji płytek mierzony zmianą konformacji receptora integrynowego IIb/IIIa, stopień aktywacji płytek mierzony ekspresją P-selektyny.

#### Wnioski

Analiza wyników badań trombogenności wykazuje, że warstwa TiN wytworzona dyfuzyjnie na stopie tytanu Ti6Al4V w mniejszym stopniu aktywuje płytki krwi niż powierzchnia czystego stopu tytanu. Otrzymane wyniki rokuja dobre własności nowych warstw w zastosowaniach biomateriałów mających kontakt z krwią.

RL 0,398 2,26

RYS.1. Struktura warstwy azotowanej typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) na stopie tytanu Ti6Al4V oraz parametry stereometryczne powierzchni stopu tytanu bez i z wytworzoną warstwą.

FIG.1. The structure of nitriding layer like TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) on the Ti6Al4V alloy and stereometric parameters of titanium alloy surface without as well as with layer formed on it.



RYS.2. Ilość obiektów krążących we krwi zidentyfikowanych jako obiekty aktywowane markerem CD61.

bas-krew nieaktywowana; PS-polistyren; Ti6Al4Vstop tytanu; TiN-P- stop tytanu z wytworzoną warstwa dyfuzyjna TiN sterylizowany metoda plazmowa, TiN-G-stop tytanu z wytworzoną warstwą dyfuzyjną TiN sterylizowany metodą gazową, PU- poliuretan; ADP- adenozynodwufosforan.

FIG.2. Number of circulating elements identifying as CD61marked.

bas-non-activated blood; PS-polistyren; Ti6Al4V - titanium alloy; TiN-P-titanium alloy with TiN diffusive layer, plasma sterilized; TiN-G-titanium alloy with TiN diffusive layer, ETO sterilized; PU-polyurethaen; ADP-adenozinodiphosphatase.

the blood contact surface were prepared for examinations. The sterilization method is important factor, influencing the material surface properties. The samples sterilized with two methods: Ethylene Oxide and Plasma were tested simultaneously - to compare the sterilization influence. The aim of the study was to compare of platelets activation, aggregation and adhesion to the different biomaterials surfaces.

#### Results and conclusions

#### Layer structure examination

The layers formed with nitriding process were demonstrated homogenous structure on the whole surface of each sample. The glow discharge process performed in plasma space allows to eliminate shoulder effect - resulting with homogenous layer thickness, hardness, chemical and phase composition in the middle and edge of the sample.

The area of titanium TiN+Ti<sub>2</sub>N like, formed due glow discharge nitriding process demonstrated thickness about 1,5 $\mu$ m, while including the  $\alpha$ Ti(N) diffusive zone thickness achieved about 8µm. The layer hardiness measuring from the top of the sample obtained 1180 HV0,05 (alloy of Ti6Al4V

A set	Parametr Parameter [□m]	Ti6Al4V	Warstwa azotowana Nitriding layer	<ul> <li>- 415HV0,05). This demonstrated that forming nitriding layer in- creased the surface hardiness three times. The surfaces nitridng in plasma area achieved rough-</li> </ul>
	Ra	0,035	0,138	ness Ra on the level of 0,138µm,
	Rq	0,045	0,180	and Rq about 0,180µm.
and a	Rz	0,363	1,93	Layer thromobogenicity ex-
20 -	Rt	0 398	2.26	aminations

#### ver thromobogenicity exinations

The following aspects of platelet activation were examined: percentage of platelets-monocytes and platelets-granulocytes aggregates, number of platelets, number of platelets aggregates. including small and big aggregates, platelet activation ratio determining with change of Ilb/Illa integrine receptor conformation, platelet activation ratio determining with P-selectine expression.

#### Conclusions

The thrombogenicity examinations results analysis demonstrated that diffusive TiN layer produced on titanium Ti6Al4V alloy surface activates platelets less than pure titanium alloy. Results obtained in reported research promise good properties of new developed layers for application in blood contacting biomaterials.



## Piśmiennictwo

#### References

[1] Titanium in Cardiac and Cardiovascular Applications – Chrictian Olin – Tytanium in Medicine – D.M.Brunette, P.Tengvall, M.Textor, P.Thomsen, Heidelberg, 2001

[2] Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych T.Wierzchoń, E.Czarnowska, D.Krupa, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, 2004, Warszawa  [3] Titanium in Medicine D.M.Brunette, P.Tengvall, M.Textor, P.Thomsen, Springer, 2001 Metallurgy and technological properties of Titanium and Titanium Alloys H.Freese, M.Volas, J.Wood, USA
 [4] Biomedical Applications of Titanium and its Alloys C.Elias, J.Lima, R.Valiev, M.Meyers Biological Materials Science, 2008

. . . . . . . . . . . . . . . . . .

# OPRACOWANIE TECHNOLOGII WYTWARZANIA MODYFIKOWANYCH HYDROKSYAPATYTEM WŁÓKNIN WĘGLOWYCH PRZEZNACZONYCH NA PODŁOŻA DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ

Izabella Rajzer\*, Joanna Grzybowska-Pietras, Sylwia Morcinek, Jarosław Janicki

ATH Akademia Techniczno-Humanistyczna, Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych. ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała, Polska \*MAILTO: irajzer@ath.bielsko.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 143-145]

## Wstęp

Włókna węglowe są obiecującym materiałem, do regeneracji ubytków tkanki kostnej. Niestety pomimo wysokiej biozgodności nie posiadają one aktywności biologicznej prowadzącej do stymulującego działania na komórki kostne. Z wcześniejszych badań przeprowadzonych nad modyfikacją włókien węglowych hydroksyapatytem wynika, że wprowadzenie hydroksyapatytu do włókien (zarówno w dyspersji nano- jak i mikrometrycznej) pozwoliło na nadanie im cech bioaktywnych [1]. Inkubacja włókien w sztucznym osoczu wykazała, że na powierzchni włókien węglowych modyfikowanych hydroksyapatytem tworzą się cząstki fosforanu wapnia [2]. Materiały, które w warunkach in vitro pokrywają się warstwą apatytu są dobrymi kandydatami do wytworzenia implantów, które po wprowadzeniu do żywego organizmu utworzą bezpośrednie wiązanie chemiczne z tkanką kostną. Również wyniki przeprowadzonych badań komórkowych świadczą o tym, że modyfikacja włókien fosforanem wapnia sprzyja proliferacji komórek kostnych, a przeprowadzone badania in vivo potwierdziły ich biozgodność z tkankami [3-4].

Kontynuacją wcześniej przeprowadzonych badań są prace związane z zastosowaniem włókien modyfikowanych hydroksyapatytem do wytworzenia porowatych włóknistych podłoży dla potrzeb leczenia ubytków tkanek. Włókna węglowe modyfikowane hydroksyapatytem w formie trójwymiarowych układów stanowić mogą perspektywiczny materiał do wytwarzania biomimetycznych implantów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej.

# DEVELOPMENT OF FABRICATION TECHNOLOGY OF CARBON NONWOVEN FABRICS MODIFIED WITH HYDROXYAPATITE, AS SCAFFOLD FOR TISSUE ENGINEERING

Izabella Rajzer\*, Joanna Grzybowska-Pietras, Sylwia Morcinek, Jarosław Janicki

ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA, FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER SCIENCE. DEPARTMENT OF POLYMER MATERIALS. 2 WILLOWA STREET, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND, \*MAILTO: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 143-145]

## Introduction

Carbon fibers are promising material for regeneration of bone tissue defects. However even though they are biocompatible, they do not have the sufficient biological activity enabling the stimulation of bone tissue cells. Earlier research regarding modification of carbon fibers with hydroxyapatite indicated that addition of hydroxyapatite (both nano- and microsize) to precursor' fibres can enhance their bioactivity [1]. Incubation of fibers in artificial plasma, produced apatite secretions on surfac of modified carbon fibers [2]. Materials which in the in vitro conditions covers with an apatite layer are good candidates to produce implants and when implanted into living body leads to the formation of chemical bonds with bone tissue. The results of the cellular study confirmed that the modification of fibers with calcium phosphate enhanced proliferation of bone tissue cells and also results of in vivo study claimed their biocompatibility [3-4]. Continuation of earlier research is focused on application of carbon fibers (which were modified with hydroxyapatite) to produce three dimensional, porous scaffold for tissue defects treatment. Carbon fibers in the form of three dimensional fabrics may be perspective material for production of biomimetic implants for bone tissue regeneration.

## Materials and methods

Polyacrylonitrile fibers (PAN) modified with hydroxyapatite were prepared at the Technical University of Lodz (Poland) using PAN-terpolymer from Zoltek of the following composi-

#### 146 Materialy i metody

Włókna poliakrylonitrylowe (PAN) modyfikowane hydroksyapatytem wytworzono w Politechnice Łódzkiej, stosując termopolimer PAN (firmy Zoltek) o składzie: 93-94% wagowych merów akrylonitrylu, 5-6% wagowych merów akrylanu metylu i 1% wagowy merów alilosulfonianu sodowego. W badaniach wykorzystano hydroksyapatyt [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>] pochodzenia zwierzęcego wytworzony w Katedrze Ceramiki Specjalnej, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Dodatek proszku do roztworu przędzalniczego wynosił 3%. Przedmiotem badań był również niemodyfikowany prekursor z PAN.

Z odcinkowych włókien PAN zawierajacych dodatek hydroksyapatytu jak również z włókien PAN niemodyfikowanych, uformowano runo o masie powierzchniowej około 120g/m<sup>2</sup> (systemem mechanicznym) przy wykorzystaniu zgrzeblarki laboratoryjnej 3KA firmy Befama. Włókna w runach łączono techniką jednostronnego igłowania, w wyniku którego uzyskano dwa rodzaje włóknin: (1) włókninę modyfikowana hydroksyapatytem oraz (2) włókninę niemodyfikowaną. W celu uzyskania włóknin o różnych parametrach fizykochemicznych, zróżnicowanej grubości, a tym samym odmiennej przestrzennej orientacji włókien, otrzymane

włókniny po warstwowaniu poddano ponownie procesowi igłowania o zmiennej liczbie przeigłowań (lp/cm2). W rezultacie otrzymano: (3) włókninę modyfikowaną hydroksyapatytem o 90 lp/cm<sup>2</sup>, (4) włókninę modyfikowaną hydroksyapatytem o 180 lp/cm<sup>2</sup> oraz (5) włóknine niemodyfikowana PAN o 200 lp/cm<sup>2</sup>.

Wykonano badania dotyczące: wyznaczenia masy powierzchniowej (PN-EN 29073-1:1994), grubości (PN-EN 29073-2:1994), przepuszczalności powietrza (PN-EN ISO 9237:1998), rozkładu

frakcyjnego porów w materiale. Przeprowa dzono badania mikroskopowe przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (Jeol. JSM-5500).

Włókniny PAN oraz włókniny zbudowane z włókien modyfikowanych hydroksyapaty tem poddano badaniom DSC (aparat 5100 firmy TA Instruments) w celu określenia wpływu wzrostu temperatury na proces utleniania włóknin. Badania przeprowadzono przy szybkości ogrzewania 10°C/min w atmosferze gazu obojetnego (azot, przy przepływie gazu 40ml/min). Włókniny poddano następnie procesom utleniania karbonizacji.

## Wyniki i dyskusja

Mikrostrukturę otrzymanych włóknin poliakrylonitrylowych wytworzonych z włókier modyfikowanych hydroksyapatytem przedstawiono na RYSUNKU 1. Podstawowe parametry charakteryzujące wytworzone włókniny zebrano w TABELI 1. Analiza uzyskanych wyników badań powala stwierdzić,

RYS.1. Mikrostruktura włóknin poliakrylonitrylowych modyfikowanych hydroksyapatytem

FIG.1. Microstructure of nonwoven PAN fabrics modified with hydroxyapatite.

	Włóknina / Fabrics 1 (PAN/HAp)	Włóknina / Fabrics 2 (PAN)	Włóknina / Fabrics 3 (PAN/HAp)	Włóknina / Fabrics 4 (PAN/HAp)	Włóknina / Fabrics 5 (PAN)
A Masa powierzchniow Basis weight [g/m²]	<sup>/a</sup> 126,0	81,5	123,4	165,0	215,2
Grubo Thickness [mn	ו] 2,2	3,38	3,7	4,35	4,35
G sto pozorr Apparent densi [kg/m³]	na ty 57,3	24,1	33,4	37,9	49,5
Przepuszczalno powierza/ Air permeabilit [dm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /s]	y 1317,3	1333,8	832,5	425,3	500,1

TABELA 1. Zestawienie parametrów charakteryzujących otrzymane włókniny.

TABLE 1. Listed parameters of obtained nonwoven fabrics.

tion: 93-94% of weight meres of acrylonitrile, 5-6% of weight meres of methyl acrylate and about 1% of weight meres of alilosulphoniane. Hydroxyapatite [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>], produced by the Department of Advanced Ceramics at the University of Science and Technology in Cracow (Poland) was used in the study. Addition of HAp powder to the spinning solution was 3%. As reference, unmodified PAN fibers was used. Fibrous web (of basis weight approx. 120g/m<sup>2</sup>) was prepared from PAN cut fibers (modified with HAp and not modified) by mechanical processing using laboratory carding machine 3KA of Befama company. Fibers were bonded using needle punching, as a result two types of nonwoven fabrics were obtained: (1) HAp modified fabrics and (2) unmodified fabrics. To obtain fibers with determine physico-chemical properties, different thicknesses and three dimensional structures, nonwoven fabrics after bedding were subjected again to mechanical needling, with different needle punching density (lp/cm<sup>2</sup>). As a result three types of nonwoven fabrics were obtained: (3) HAp modified nonwoven fabrics (90 lp/cm<sup>2</sup>), (4) HAp modified nonwoven fabrics (180 lp/cm<sup>2</sup>) and (5) unmodified nonwoven fabric (200 lp/cm<sup>2</sup>).

Following parameters were measured: basis weight (PN-EN 29073-1:1994), thickness (PN-EN 29073-2:1994), air

> permeability (PN-EN ISO 9237:1998), pore size distribution. Microscopic study were done using scanning electron microscopy (Jeol, JSM-5500).

PAN nonwoven fabrics as well as fabrics composed of fibers modified with hydroxyapatite were subjected to DSC analysis (5100 TA Instruments), to determine the influence of the temperature on stabilization process. Analysis was done at following conditions: heating rate 10°C/min, nitrogen gas flow (40ml/min). Nonwoven fabrics were then stabilized and carbonized.

#### Results and discussions

Microstructure of obtained nonwoven fabrics composed of fibers modified with hydroxyapatite is presented in FIGURE 1. Basic parameters which characterize obtained nonwoven fabrics are listed in TABLE 1. Analysis of obtained results indicated that decrease of pore size diameter strongly depend on basis weight





# RYS.2. Zestawienie rozkładów frakcyjnych porów dla włóknin modyfikowanych hydroksyapatytem. FIG.2. Pore size distribution for modified nonwoven fabrics.

iż na spadek średnicy włókien wpływ ma zarówno masa powierzchniowa jak i liczba przeigłowań na cm<sup>2</sup> (RYS.2). Potwierdzają to wyniki oznaczenia przepuszczalności powietrza.

Na podstawie badań DSC (RYS.3) dobrano parametry procesu stabilizacji włóknin. Dla wszystkich rodzajów włóknin zastosowano identyczny tok utleniania, w sposób wieloetapowy w zakresie temperatur 150-300°C. Karbonizację prowadzono do temperatury 1000°C przy szybkości ogrzewania 5°C/min, w atmosferze ochronnej (argon). Włókniny przetrzymywano w maksymalnej temperaturze przez 15 minut.

#### Wnioski

Opracowano technologię wytwarzania włóknin wę glowych na bazie włókien poliakrylonitrylowych modyfikowanych hydroksyapatytem. Otrzymano włókniny PAN różniące się mikrostrukturą, grubością, ułożeniem włókien a tym samym właściwościami. Przeznaczeniem włóknin węglowych zbudowanych z włókien zawierających hydroksyapatyt jest zastosowanie ich jako materiału do wypełniania ubytków kostnych oraz jako podłoży dla potrzeb inżynierii tkankowej.

#### Podziękowania

Autorzy chcieliby złożyć najserdeczniejsze podziękowania Panu Dr M. Boguniowi (Politechnika Łódzka) za wytworzenie włókien prekursora.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007 - 2010 jako projekt badawczy POL-POSTDOK III NrPBZ/MNiSW/07/2006/53.

#### Piśmiennictwo

[1] Rajzer I. Badania nad włóknistymi materiałami węglowymi przeznaczonymi na podłoża dla inżynierii tkankowej. Praca Doktorska, AGH 2006.

[2] Rajzer I, Błażewicz M. Carbon Fibers Modified with Hydroxyapatite. Engineering of Biomaterials 2005; 47-53: 63-65.

[3] Rajzer I, Błażewicz M, Menaszek E. In vitro and in vivo study of composites materials. Ceramics, Cells and Tissues eds. by A. Ravaglioli, A. Krajewski; ISTEC-CNR Institute of Science and Technology for Ceramics. Italian National Research Council, 2006 p. 215–221.



RYS.3. Zestawienie krzywych DSC dla włóknin PAN niemodyfikowanych i modyfikowanych hydroksyapatytem.

FIG.3. DSC curves of unmodified PAN fabrics and PAN fabrics modified with HAp respectively.

as well as of needle punching density (FIG.2).

This results were confirmed by results obtained from air permeability measurement.

Parameters of stabilization process were evaluated on the basis of DSC results (FIG.3). All types of fabrics were stabilized in oxidizing atmosphere by multistage process (150-280°C). Carbonization took place at 1000°C, at a heating rate of 5°C/min, in neutral atmosphere (argon). Fabric were held in maximum temperature for 15 minutes.

#### Conclusions

A method of nonwoven fabrics production technology on the basis of fibers modified with hydroxyapatite was develop in this work. The fabrics which differ in microstructure, thickness, fiber orientation and thereby properties were obtained. Nonwoven fabrics made from fibers which contained hydroxyapatite are destine as materials for bone defects regeneration as well as for tissue engineering scaffolds.

#### Acknowledgments

. . . . . . . . . .

The authors would like to thank dr M. Boguń (Technical University of Lodz) for supporting the precursor fibers. This work was supported by the Minister of Science and Higher Education; project POL-POSTDOK III no. PBZ/ MNISW/07/2006/53 (2007-2010).

#### References

[4] M.Błażewicz, I.Rajzer, E.Menaszek, K.Haberko. Polymer and carbon fibers with HAp nanopowder, properties and biocompatibility of degradation products. European Cells and Materials 2004; 7 (1): 47.

[5] Mikolajczyk T, Bogun M, Blazewicz M, Piekarczyk I (Rajzer). Effect of spinning conditions on the structure and properties of PAN fibers containing nano-hydroxyapatite. Journal Applied Polymer Science 2006; 100: 2881-2888.

[6] Haberko K, at all. Natural hydroxyapatite – its behaviour during heat treatment. Journal of the European Ceramic Society 2006; 26: 537-542

147

# ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII UV-VIS W ANALIZIE OPTYCZNEJ KREMÓW FOTOPROTEKCYJNYCH

#### Jakub Adamczyk\*, Anna Deda, Sławomir Wilczyński, Magdalena Zdybel

Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, \*MAILTO: jadamczyk@slam.katowce.pl

#### Streszczenie

Analizie poddano kremy do opalania dostępne w Polsce. Badano widmo źródła światła po przejściu przez warstwę każdego kremu. Wykazano różnice w krzywych spektralnych dla różnych kremów.

**Słowa kluczowe:** analiza spektralna, widmo, kremy

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 148-149]

#### Wstęp

Na polskim rynku jest znacząca ilość kremów do opalania chroniących przed promieniowaniem słonecznym. W pracy podjęto próbę sprawdzenia parametrów fizycznych różnych kremów poddając analizie spektralnej promieniowanie po przejściu przez cienką warstwę kremu.

Filtry fizyczne są substancjami, które całkowicie odbijają promieniowanie słoneczne [1,2]. Powszechnie stosowanymi filtrami fizycznymi są tlenek cynku oraz tlenek tytanu. Działanie filtrów chemicznych opiera się na pochłanianiu energii promieniowania ultrafioletowego przez aromatyczną grupę karbonylową w ich cząsteczkach [3,4].

## Materiały i metodyka

Źródło światła generowało wiązkę o charakterystyce spektralnej pokrywającej się z widmem słońca. Spektroskop detektował widmo po przejściu przez próbkę. Czas pomiaru był taki sam dla wszystkich próbek.

Pomiary widma wykonano spektroskopem optycznym OceanOptics USB4000 w zakresie 384 nm - 1020 nm. Pomiarów dokonywano na szkiełku z jednorodnie nałożoną warstwa badanego kremu.

Analizie poddano dostępne w aptekach kremy wiodących producentów, zawierające filtry fizyczne i chemiczne, chroniące przed nadmierną ekspozycją na promieniowanie słoneczne.

## Wyniki

Wykazano znaczące różnice w analizowanych widmach charakteryzujące się znacznym obniżeniem ilości przechodzącego światła oraz znaczącym wycięciem długości fal w przedziale 380-550nm.

Preparaty A, B i C są tak zwanymi brokerami słonecznymi, ich współczynnik ochrony przeciwsłonecznej SPF (sun protection factor) wynosi 50+. Preparaty A i B zawierają wyłącznie filtry fizyczne - tlenek cynku oraz tlenek tytanu. Preparat C obok tlenku tytanu zawiera dodatkowo filtry chemiczne.

Preparat D zawiera zarówno filtr fizyczny - tlenek tytanu,

# APPLICATION OF UV-VIS SPECTROSCOPE IN OPTICAL ANALYSIS OF PHOTOPROTECTION CREAMS

Jakub Adamczyk<sup>\*</sup>, Anna Deda, Sławomir Wilczyński, Magdalena Zdybel

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE, SCHOOL OF PHAR-MACY AND LABORATORY MEDICINE, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND MAILTO: JADAMCZYK@SLAM.KATOWCE.PL

## Abstract

The different sun cream available on polish cosmetic market were studied. The spectra of light source of every cream were investigated. The significant divergence for the different creams spectra curves were observed.

Keywords: spectral analysis, spectrum, creams. [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 148-149]

## Introduction

There are many kinds of sunscreens on polish cosmetic market. The purpose of this research was to verificate sunscreen physical parameters by spectral imaging of UV-VIS radiation after thin layer of cream passing. Physical photoprotectants protect skin by reflecting of the sun rays. The most popular physical photoprotectors are titanium dioxide and zinc oxide. Action mechanism these physical photoprotection is based on sunlight absorption using carbonyl group.

## Material and methods

Light source generated a steam of particles with spectral descriptions like sunlight spectrum. Spectroscope detected light spectrum after beam passed through the sample. Detection time was the same for all studies samples. Spectra measurements were accomplished by using Ocean Optics USB 400 spectrometer at 384-1020nm band. All measurements were performed after evently spreading the suncream on the lamelle. Leading manufactures suncreams containing physical and chemical photoprotection protecting against excessive sun radiation were analyzed.

## Conclusion

Significant distrinction between analyzed samples were demonstrated characterized by considerable reduction of crossing light and disappearing waves from 380 to 550 nm.

Preparations (cosmetics) A,B and C belong to sun blockers and its sun protection factor are more than 50. Preparations A and B contain only physical photoprotectants – titanium dioxide and zinc oxide. Preparation C besides titanium dioxide contains also chemical photoprotectants. Preparation D contains physical photoprotectant as well as chemical one. Its sun protect factor amount to 30. An active components of E preparation are physical and chemical photoprotectans . SPF of E preparation is 45. Preparation F contains only chemical photoprotectants. Its SPF is 10. Preparation G belongs to cosmetic emulsion

jak i filtry chemiczne. Jego współczynnik ochrony przeciwsłonecznej wynosi 30. Aktywnymi składnikami fotoochronnymi preparatu E są filtry chemiczne i fizyczne. Współczynnik SPF produktu wynosi 45. Preparat F zawiera wyłącznie filtry chemiczne. Jego współczynnik ochrony przeciwsłonecznej to 10. Preparat G to emulsja nawilżająca, która nie zawiera filtrów przeciwsłonecznych. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach.



149 without photoprotectants. Obtained results are present on the diagrams.

12(20) s. 79-80,

[4]. Olek-Hrab K., Hawrylak A., Czarnecka-Operacz M.: Wybrane zagadnienia z zakresu starzenia się skóry. Post. Dermatol. Alergol. 2008: 25 (5) s.226-234



150

# KOMPOZYTOWE WŁÓKNA POLILAKTYD/HYDROKSYAPATYT OTRZYMYWANE METODĄ PRZĘDZENIA ZE STOPU

Izabella Rajzer<sup>1\*</sup>, Monika Rom<sup>1</sup>, Janusz Fabia<sup>1</sup>, Sylwia Morcinek<sup>1</sup>, Aneta Zima<sup>2</sup>, Anna Ślósarczyk<sup>2</sup>, Jarosław Janicki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ATH Akademia Techniczno-Humanistyczna, Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała, Polska, <sup>2</sup>AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej I Ceramiki, Katedra Technologii Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska

\*MAILTO: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

#### Streszczenie

W pracy zaproponowano metodę produkcji nanokompoztowych włókien na bazie polilaktydu (PLA) i nano-hydroksyapatytu (n-HAp).

**Słowa kluczowe:** polilaktyd, hydroksyapatyt, włókna, podłoża

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 150-151]

#### Wprowadzenie

Polilaktyd (PLA) został wybrany jako polimerowa matryca, ze względu na jego biozgodność i biodegradowalność: produkt degradacji: kwas mlekowy jest metabolicznie nieszkodliwy [1]. PLA w wyniku przędzenia może być przekształcone w włókna, a następnie produkowane w postaci trójwymiarowych włóknin z przeznaczeniem dla zastosowań w inżynierii tkankowej [2-3]. Wprowadzenie syntetycznego nano-hydroksyapatytu do włóknistej polimerowej matrycy może polepszyć własności biologiczne wytworzonego z takiego materiału podłoża.

#### Materiał i metody

Hydroksyapatyt wytworzono w Katedrze Technologii Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych, AGH, Kraków, Polska. Syntezę proszku hydroksyapatytowego przeprowadzono metodą mokrą (patent PI nr 154957). Powierzchnia właściwa proszku n-HAp wynosiła 79,9m²/g. Jako polimerową matrycę użyto PLA (NatureWorks Ingeo 3051D). Dodatek hydroksyapatytu stanowił 3%wag.

Włókna otrzymano w wyniku przędzenia ze stopu używając prototypowej wytłaczarki laboratoryjnej. Stopiony polimer (temp. 215°C) był wytłaczany przez filierę (φ=0,2mm) za pomocą sprężonego ciśnienia azotu (0.4 MPa). Prędkość przędzenia wynosiła od 25 do 1200m/min. Wytworzono dwa rodzaje włókien: PLA/n-HAp oraz PLA (jako referencja). Ocenę morfologii włókien przeprowadzono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, Jeol JSM 5400) wyposażonego w mikroanalizator dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego EDX Link ISIS 300 z mikroanalizą rentgenowską (Oxford Instrument). Kompozytowe włókna badano przy użyciu uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Instron. Obecność n-HAp w matrycy polimerowej, jak również jego wpływ na właściwości chemiczne PLA badano przy użyciu spektroskopii w podczerwieni (spektrofotometr Nicolet 6700) oraz metodą szerokokątowej

# POLY(LACTIC ACID) / HYDROXYAPATITE MELT SPUN COMPOSITE FIBERS

Izabella Rajzer<sup>1\*</sup>, Monika Rom<sup>1</sup>, Janusz Fabia<sup>1</sup>, Sylwia Morcinek<sup>1</sup>, Aneta Zima<sup>2</sup>, Anna Ślósarczyk<sup>2</sup>, Jarosław Janicki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ATH University of Bielsko-Biala, Faculty of Materials and Environmental Sciences, Institute of Textile Engineering and Polymer Science. Department of Polymer Materials, 2 Willowa street, 43-309 Bielsko-Biała, Poland <sup>2</sup>AGH University of Science and Technology, Faculty of Material Science and Ceramics, Department of Technology of Ceramics and Refractories, 30 Mickiewicza Ave., 30-059 Cracow, Poland

\*MAILTO: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

#### Abstract

In the present work, the method of production of nanocomposite fibers based on polylactide acid (PLA) and nano-hydroxyapatite (n-HAp) is proposed. **Keywords:** polylactide acid, hydroxyapatite, fibers, scaffold

[Engineering of Biomaterials, 89-91,(2009), 150-151]

## Introduction

Polylactide acid (PLA), has been selected as polymer matrix because of it's good biocompatibility and biodegradability: the degradation product, lactic acid, is metabolically innocuous [1]. PLA can be transformed by spinning into fibers for subsequent fabrication of desirable three dimensional fabrics which may be used as scaffolds for tissue engineering applications [2-3]. Incorporation of synthetic nano-hydroxyapatite into the fibrous polymer matrix can enhance biological properties of the scaffold.

#### Materials and methods

The hydroxyapatite was produced in Department of Technology of Ceramics and Refractories, AGH-UST, Cracow, Poland. Wet method was used to prepare hydroxyapatite powder (patent PI nr 154957). The specific surface area of the n-HAp was 79,9m<sup>2</sup>/g. As a polymer matrix a PLA (NatureWorks Ingeo 3051D) was used. 3% of hydroxyapatite was added. Fibers were obtained by melt spinning process, using the prototype laboratory extruder. Polymer melt (temp. 215°C) was extruded through the monofilament die ( $\phi$ =0,2mm) using the compressed nitrogen pressure (0.4MPa). The spinning speed was at the range from 25 to 1200m/min. Two types of fibers were obtained using this method: PLA/n-HAp and PLA fibers (as reference). Morphology of fibers were estimated using scanning electron microscopy (SEM, Jeol JSM 5400) - equipped with EDX Link ISIS 300 X-ray micro analyzer (Oxford Instrument). The composite fibers were tested using an Instron universal mechanical testing machine. The presence of the n-HAp in the polymer matrix, and its influence on the chemical properties of the PLA was verified using FTIR (spectrophotometer Nicolet 6700) and Wide Angle X-Ray Scattering WAXS (URD-6, Seifert).



RYS.1. Mikrostruktura i analiza EDX włókna PLA/n-HAp. FIG.1. Microstructure and EDX analysis of PLA/n-HAp fiber.

dyfraktometrii rentgenowskiej WAXS (URD-6 Seifert).

#### Wyniki i dyskusja

Włókna przędzono bez problemu w szerokim zakresie szybkości formowania, w wyniku procesu otrzymano kompozytowe włókna o różnych średnicach (od 12µm do 75µm). Parametry mechaniczne otrzymanych włókien są odpowiednie do ich przetwarzania, w trójwymiarowe podłoża, przy użyciu technologii włókienniczych. Badania w podczerwieni potwierdziły obecność apatytu w matrycy PLA. Również przy wykorzystaniu metod SEM/EDX zaobserwowano, że cząsteczki apatytu były rozproszone na powierzchni włókien PLA (RYS.1). Ze względu na stosunkowo mały udział masowy dodatku badania metodą WAXS nie potwierdziły obecności hydroksyapatytu w strukturze włókien.

#### Wnioski

Zaproponowana metoda produkcji włókien PLA modyfikowanych n-HAp opisana powyżej pozwala na otrzymanie włókien kompozytowych, które mogą stymulować wzrost apatytu na ich powierzchni, w trakcie inkubacji w sztucznym osoczu (SBF). Otrzymane włókna można w łatwy sposób przekształcić w trójwymiarową porowatą strukturę w wyniku procesu mechanicznego igłowania. Wstępne badania wskazują, że włókna kompozytowe mogą być przydatne dla zastosowań w inżynierii tkankowej, zwłaszcza jako trójwymiarowe podłoża sprzyjające wzrostowi tkanki kostnej.

## Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007 - 2010 jako projekt badawczy POL-POSTDOC III NrPBZ/MNiSW/07/2006/53

## Piśmiennictwo

Gupta B, Revagade N, Hiborn J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. Progress in Polymer Science 2007; 32: 455-482.
 Jose MV et al. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Acta Biomaterialia 2009; 5: 305-315.

#### **Results and discussions**

Fibers were spun without problems in wide range of spinning speeds, so that as the result composite fibers of various diameters (12µm up to 75µm) were obtained. The mechanical properties of obtained fibers enables further processing to scaffolds by nonwoven technologies. FTIR analysis confirmed apatite presence in the PLA matrix. It was also observed by SEM/EDX method that apatite particles were dispersed on the surface of PLA fibers (FIG.1), however WAXS results did not confirmed the presence of HAp in the structure, as the quantity of additive was low.

#### Conclusions

The proposed method of production of PLA fibres modified with n-HAp described above allowed to obtain composite fibres which may stimulated the grow of apatite on their surface when immersed in Simulated Body Fluid. This fibers can be easily transformed into three dimensional porous structure by mechanical needle punching. The preliminary study suggest that the nanocomposite fibers may be potentially useful in tissue engineering applications, particularly as three- dimensional substrates for bone growth.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Minister of Science and Higher Education; project POL–POSTDOC III no. PBZ/ MNISW/07/2006/53 (2007-2010).

#### References

[3] Yuan X et al. Characterization of poly (L-lactic acid) fibers produced by melt spinning. Journal of Applied Polymer Science 2001; 81, 251-60

• • • • • • • • • • • • • • • • •

151

152

# ZACHOWANIE ELEKTROCHE-MICZNE STOPU Ti-6AI-4V I Ti-6AI-7NB PO RÓŻNYM OKRESIE EKSPOZYCJI W SBF

Magdalena Pochrząst<sup>1</sup>, Witold Walke<sup>1</sup>, Jan Marciniak<sup>1</sup>, Dorota Kaczmarska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18a 44-100 Gliwice <sup>2</sup>Studenckie Koło Naukowe "HYBRYDA", Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18a, 44-100 Gliwice, Polska

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 152-154]

#### Wprowadzenie

Wieloletnie doświadczenia kliniczne umożliwiły już określenie cech geometrycznych gwoździ śródszpikowych, a także wykorzystywanych do ich produkcji własności biomateriałów. Głównymi materiałami metalowymi stosowanymi w osteosyntezie śródszpikowej są stale austenityczne Cr-Ni-Mo oraz stopy na osnowie tytanu. Materiały te charakteryzują się dobrą biotolerancją i odpornością na korozje w środowisku płynów ustrojowych człowieka, a także dobrymi własnościami wytrzymałościowymi i zmęczeniowymi [2]. Podstawowym kryterium przydatności biomateriału metalowego na implanty jest jego biokompatybilność. Jest ona w głównej mierze związana z własnościami fizykochemicznymi powierzchni implantu, która powinna być dostosowana do cech środowiska tkanek układu człowieka. Dlatego też, uwzględniając wymienione uwarunkowania związane ze zastosowaniem biomateriałów

metalowych na implanty krótkotrwałe w niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań zachowania się elektrochemicznego stopów Ti-6AI-4V ELI i Ti-6AI-7Nb po różnym okresie ekspozycji w SBF [1÷3].

## Materiał i metodyka badań

Do badań wytypowano stopy Ti-6Al-4V ELI oraz Ti-6AI-7Nb, dostarczone w powatości powierzchni R<sub>a</sub>=0,12±0,2µm. W celu oceny stopnia bioaktywności wytypowane stopy zanurzono w środowisku SBF na okres 30 dni. Temperatura roztworu była stała i wynosiła T=37±0,5°C. Odpowiednio po 10, 20, 30 dniach próbki wyjmowano z roztworu i poddawano badaniom potencjodynamicznym w celu wyznaczenia krzywych polaryzacji anodowej. Wyznaczone krzywe polaryzacji anodowej dostarczyły informacji o zachowaniu elektrochemicznym stopów. Badania potencjodynamiczne były prowadzone w roztworze Tyrode'a w stałej temperaturze T=37±0,5°C i pH=6,8±0,2. Obserwacje powierzchni przeprowadzono w elektronowym mikroskopie skaningowym SUPRA 35 firmy ZEISS.

# ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF Ti-6AI-4V AND Ti-6AI-7NB ALLOY AFTER DIFFERENT TIME OF EXPOSURE TO SBF

Magdalena Pochrząst<sup>1</sup>, Witold Walke<sup>1</sup>, Jan Marciniak<sup>1</sup>, Dorota Kaczmarska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Engineering Materials and Biomaterials, Silesian University of Technology, 18A Konarskiego str., 44-100 Gliwice, Poland <sup>2</sup>Students' Scientific Society "HYBRYDA", Silesian University of Technology, 18A Konarskiego str., 44-100 Gliwice, Poland

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 152-154]

#### Introduction

Long-term clinical experience allowed to specify both geometry of intramedullary nails and applied biomaterials. The main metallic materials applied in intramedullar osteosynthesis are stainless steels and titanium alloys. These materials are characterized by good biocompatibility and corrosion resistance in body fluids as well as good strength and fatigue properties [2]. The most important criterion determining usefulness of metallic biomaterial on implants is biocompatibility. It is mostly connected with physiochemical properties of surface which should be adjusted to tissue environment. Hence, taking into consideration conditions of application metallic biomaterials on short-term implants, results of electrochemical tests of Ti-6AI-4V ELI and Ti-6AI-7Nb alloys after different time of explosion to SBF were presented it the work [1+3].

Czas [dni] Time [days]	Potencjał otwarcia Open circut potential E <sub>oep</sub> , [mV]	Potencjał korozyjny Corrosion potential E <sub>corr</sub> [mV]	Opór polaryzacyjny Polarisation resistance R <sub>p</sub> , [k cm²]	G sto pr du korozyjnego Corrosion current density İ <sub>corr</sub> [µA/cm²]	Pr d pasywacji Current passivation i <sub>p</sub> mA/cm² (E=+400mV)		
	075	Ti-6	AI-4V ELI	0.100	0.01		
0	-275	-211	237,24	0,109	0,21		
10	-24	-61	748,09	0,035	0,07		
20	+69	+15	1 670,00	0,015	0,90		
30	+98	+64	915,20	0,028	0,34		
		Ti-	6Al-7Nb				
0	-452	-107	8,34	3,118	0,92		
10	-138	-183	864,50	0,030	0,36		
20	-168	-240	1 910,00	0,014	0,01		
30 -92 -143 1 620,00 0,016 0,13							
TAB	TABELA 1. Wyniki badań odporności korozyjnej stopów Ti-6AI-4V FI I oraz Ti-6AI-7Nb						

# TABLE 1. Pitting corrosion resistance test results (Ti-6AI-4V ELI and Ti-6AI-7Nb).

Material and methods

Two types of Ti alloys were applied (Ti-6AI-4V ELI and Ti-6AI-7Nb). The alloys were in the form of rod of diameter equal to R<sub>3</sub>=0,12±0,2µm. In order to evaluate the degree of bioactivity the selected alloys were immersed in SBF for 30 days. The temperature was constant and was equal to T=37±0,5°C. The samples were taken out after 10, 20 and 30 days and were electrochemically tested in order to determine anodic polarization curves. The potentiodynamic tests were carried out in the Tyrode's solution at the temperature equal to T=37±0,5°C and pH=6,8±0,2. Surface observations were carried out by means of scanning electron microscope SU-

#### Wyniki badań

Charakterystyczne wielkości opisujące odporność na korozję wżerową uzyskane na podstawie krzywych polaryzacji anodowej przedstawiono w TAB.1 i na RYS.1+2. Wartości potencjału otwarcia Eocp wyznaczone dla stopu Ti-6AI-4V ELI i Ti-6AI-7Nb, wykazały tendencje wzrostowa proporcjonalnie do czasu ekspozycji - im dłuższy czas przebywania w roztworze, tym wyższa wartość potencjału. Identyczną zależność stwierdzono dla oporu polaryzacyjnego, którego wartość również wzrastała wraz z czasem przebywania próbek w środowisku SBF. Stwierdzono także obniżenie wartości gęstości prądu korozyjnego, co jest zjawiskiem korzystnym - TAB.1. Dla wszystkich badanych próbek nie stwierdzono występowania petli histerezy w całym zakresie pomiarowym (E=+4000mV) bez względu na czas ekspozycji w środowisku SBF.

Obserwacje w elektronowym mikroskopie skaningowym przed i po 10. 20. i 30. czasie ekspozycji w SBF nie wykazały zmian w topografii powierzchni próbek. Po ekspozycji 30 dni w SBF stwierdzono jedynie obecność drobnych kryształów NaCl o regularnych kształtach i różnej wielkości, na powierzchni stopu Ti-6AI-4V ELI i Ti-6AI-7Nb, które w łatwy sposób ulegały usunięciu z powierzchni stopów w płuczce ultradźwiękowej - RYS.4.

#### Podsumowanie

Przeprowadzone badania elektrochemiczne wykazały odporność na korozję wżerową stopów Ti-6Al-4V ELI oraz Ti-6Al-7Nb poddanych oddziaływaniu środowiska SBF przez okres 10. 20. i 30. dni. Uzyskane wartości oporu polaryzacyjnego wskazują na korzystny wpływ oddziaływania środowiska SBF na









RYS.2. Krzywe polaryzacji anodowej wyznaczone dla stopu Ti-6AI-7Nb w stanie wyjściowym i po czasie ekspozycji w SBF-10, 20, 30 dni.

FIG.2. Anodic polarization curves of Ti-6AI-7Nb samples of initial state and after SBF exposition time (10, 20, 30 days).



RYS.3. Powierzchnia stopów tytanu w stanie wyjściowym: a) stop Ti-6AI-4V ELI, b) stop Ti-6AI-7Nb.

FIG.3. Surface of titanium alloys (initial state): a) Ti-6AI-4V ELI alloy, b) Ti-6AI-7Nb alloy.



RYS.4. Powierzchnia stopów tytanu po 30. czasie ekspozycji w SBF: a) stop Ti-6AI-4V ELI, b) stop Ti-6AI-7Nb. FIG.4. Surface of titanium alloys (exposed to SBF for 30 days): a) Ti-6AI-4V ELI alloy, b) Ti-6AI-7Nb alloy.

kształtowanie warstwy tlenkowej na powierzchni stopów. W celu pełniejszej oceny własności i struktury oraz charakteru powierzchni stopów tytanowych poddanych oddziaływaniu środowiska SBF wydaje się być koniecznym przeprowadzenie badań impedancyjnych.

#### Results

Characteristic values describing corrosion resistance, obtained from the anodic polarization curves were presented in TABLE 1 and in FIGs.1+2. The opening potential EOCP for the selected Ti-6AI-4V ELI and Ti-6AI-7Nb alloys was proportional to the exposition time - the longer exposition time, the higher value of the potential. The same relation was observed for polarization resistance. Furthermore, favorable decrease of anodic current was also observed - TABLE 1. For all the samples no hysteresis loop was observed, regardless of SBF exposition time.

Observations in scanning electron microscope after 10, 20 and 30 days of SBF exposition revealed no changes in surface topography. Only after 30 days of the exposition the presence of fine shaped and different size NaCl crystals on Ti-6Al-4V ELI and Ti-6AI-7Nb alloys surfaces was observed. These crystals were easily removed in the ultrasonic washer – FIG.4.

#### Summary

The electrochemical research showed corrosion resistance of Ti-6Al-4V ELI and Ti-6Al-7Nb alloys exposed to SBF for 10, 20 and 30 days. The obtained values of the polarization resist-

ance showed favorable influence of SBF environment on formation of oxide layer on the alloys surface. In order to fully characterize structure and properties of titanium alloys exposed to SBF, further impedance research seem to be necessary.

#### Piśmiennictwo

[1]. M. C. Advincula, D. Petersen, F. Rahemtulla, R. Advincula, J. E. Lemons: Surface analysis and biocorrosion properties of nanostructured surface Sol–Gel coatings on Ti6Al4V titanium alloy implants. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomat. 80B: pp 107–120, 2007.

[2]. J. Marciniak, W. Chrzanowski, A. Kajzer: Gwoździowanie śródszpikowe w osteosyntezie. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008.

#### References

[3]. Hsin-Yi Lin: Short term observations of in-vitro biocorrosion of two commonly used implant alloys. Mississippi State, Mississippi, 2002.

. . . . . . . . . . . .

....

# BADANIA FT-IR I EPR ZMIAN STRUKTURY CHEMICZNEJ AMPICYLINY PODCZAS STERYLIZACJI TERMICZNEJ

Andrzej Krztoń<sup>1\*</sup>, Barbara Liszka<sup>1</sup>, Paweł Ramos<sup>2</sup>, Barbara Pilawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, Polska Akademia Nauk,

ul. Marii Curie Skłodowskiej 34, 41-819 Zabrze, Polska <sup>2</sup>Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biofizyki,

UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

\*MAILTO: ANDRZEJ.KRZTON@CMPIW-PAN.EDU.PL

#### Streszczenie

Zbadano zmiany struktury chemicznej oraz generowanie wolnych rodników w ampicylinie podczas sterylizacji w temperaturach 160°C, 170°C i 180°C. Jako metody badawcze zastosowano spektroskopię FT-IR i EPR.. Wykazano, że sterylizacja w temperaturach od 160°C do 180°C powadzi do zmian struktury chemicznej ampicyliny oraz powoduje powstawanie dużej ilości wolnych rodników w próbce. Widma FT-IR uwidaczniają częściową degradację grupy karboksylowej w trakcie ogrzewania leku. Zależność kształtu widm EPR od mocy mikrofalowej wskazuje na złożony charakter układu centrów paramagnetycznych sterylizowanej ampicyliny.

*Słowa kluczowe*: ampicylina, sterylizacja termiczna, FT-IR, wolne rodniki, EPR

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 154-157]

## Wstęp

Zmiany struktury chemicznej substancji leczniczej oraz generowanie wolnych rodników podczas sterylizacji mogą stanowić przyczynę nieskuteczności leku oraz wystąpienia efektów ubocznych w organizmie podczas farmakoterapii [1]. Wolne rodniki mogą dodatkowo niszczyć implanty w organizmie. Celem niniejszej pracy jest znalezienie optymalnych warunków sterylizacji termicznej ampicyliny. Zmiany struktury chemicznej analizowano metodą FT-IR. Wolne rodniki badano metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

# FT-IR AND EPR STUDIES OF CHANGES OF CHEMICAL STRUCTURE OF AMPICYLINE DURING THERMAL STERILIZATION

#### Andrzej Krztoń<sup>1\*</sup>, Barbara Liszka<sup>1</sup>, Paweł Ramos<sup>2</sup>, Barbara Pilawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCES,

34 Marii Curie Skłodowskiej str., 41-819 Zabrze, Poland <sup>2</sup>Medical University of Silesia In Katowice, School of Pharmacy and Laboratory Medicine, Department of Biophysics, 8 Jedności str., 41-200 Sosnowiec, Poland \*MAILTO: Andrzej.krzton@cmpiw-pan.edu.pl

#### Abstract

Changes of chemical structure and formation of free radicals in ampicyline during sterilization at temperatures 160°C, 170°C, and 180°C were studied. FT-IR and EPR were applied as experimental methods. It was proved that sterilization at temperatures from 160°C to 180°C lead to changes of chemical structure of the ampicyline and causes formation of high amount of free radicals. FT-IR spectra show that carboxyl groups are partly evolved during heating of this drug. Dependence of lineshape of EPR spectra on microwave power indicates complex character of paramagnetic centers system of ampicyline.

**Keywords:** ampicyline, thermal sterilization, FT-IR, free radicals, EPR

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 154-157]

#### Introduction

Changes of chemical structure of drugs and formation of free radicals during sterilization may be responsible for inefficacy of the drugs and appearance of side effects in organism during pharmacotherapy [1]. Additionally free radicals may destroy implant in organism. The aim of this work is to find optimal conditions of thermal sterilization of ampicyline. Changes of chemical structures of ampicyline were analysed by FT-IR method. Free radicals were studied by electron paramagnetic resonance (EPR) method.

#### Materiały i metody

Wykonano badania ampicyliny sterylizowanej termicznie w różnych warunkach. Zgodnie z obowiązującymi normami, ampicylinę ogrzewano w temperaturze 160°C przez 120 minut, 170°C przez 60 minut oraz 180°C przez 30 minut. Sterylizację przeprowadzono w suszarce z ciągłym obie-

giem suchego powietrza. Strukturę chemiczną ampicyliny pokazano na RYSUNKU 1 [2]. Ampicylina jest antybiotykiem stosowanym w stanach zapalnych [1-2].

Widma FTIR rejestrowano techniką DRIFT na spektrometrze firmy Bio-Rad model FTS 165, z użyciem przystawki Praying Mantis firmy Harrick, uśredniając 256 skanów w zakresie od 4000 do 400cm<sup>-1</sup> i z rozdzielczością 4cm<sup>-1</sup>. Próbki ampicyliny przed pomiarem ucierano z bromkiem potasu w stosunku masowym 5/100.

Widma EPR dla próbek sproszkowanych mierzono z wykorzystaniem spektrometru Firmy RADIOPAN (Poznań) na pasmo X (9.3GHz) z modulacją pola magnetycznego wynosząca 100kHz. Wyznaczono amplitudę (A), intensywność integralną (I) oraz szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR. Analizowano kształt linii EPR rejestrowanych w szerokim zakresie mocy mikrofalowych 2.2-70mW. Wyznaczono koncentracje wolnych rodników w leku. Wzorcem koncentracji była ultramaryna.

#### Wyniki i dyskusja

Widma FT-IR ampicyliny wyjściowej i sterylizowanej w temperaturach 160°C, 170°C i 180°C porównano na RY-SUNKU 2.

Zmiany w widmach FT-IR obserwowano dla każdej



RYS.1. Struktura chemiczna ampicyliny [2]. FIG.1. Chemical structure of ampicyline [2].

# Materials and methods

Ampicyline sterilized at different conditions was examined. Ampicyline was heated according to the known norms at temperature 160°C for 120 minutes, 170°C for 60 minutes, and

180°C for 30 minutes. Sterilization was performed in hot air oven with air circulation. Chemical structure of ampicyline is presented in figure 1 [2]. Ampicyline is the antibiotic used in inflammatory states [1-2].

FT-IR spectra were recorded with a FTS-165 Bio-Rad spectrometer, using of Harrick Praying Mantis diffuse reflectance accessory, by co-adding 256 scans in the range 4000-650cm<sup>-1</sup> at a resolution of 2cm<sup>-1</sup>. The samples were mixed with kalium bromide in the proportion 5/100 by weight.

EPR spectra of powdered samples were measured by an X-band (9.3GHz) spectrometer with magnetic modulation of 100kHz of RADIOPAN Firm (Poznań). Amplitude (A), integral intensity (I), and linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines were determined. Lineshape of EPR spectra at the wide range of microwave power of 2.2-70mW was analysed. Concentration of free radicals in the drug was determined. Ultramarine was the reference.

#### **Results and discussion**

FT-IR spectra of the original ampicyline and ampicyline sterilized at 160°C, 170°C and 180°C, were compared to in FIGURE 2.

It was observed differences between FT-IR spectra of the original ampicyline and ampicyline sterilized at tempera-



RYS.2. Widma FT-IR ampicyliny niesterylizowanej i sterylizowanej w temperaturach: 160°C, 170°C i 180°C. FIG.2. FT-IR spectra of unsterilized ampicyline and ampicyline sterilized at temperatures: 160°C, 170°C, and 180°C.

BI MATERIALS

próbki ampicyliny sterylizowanej w wymienionych temperaturach. Przejawiały się one głównie zmniejszeniem intensywności względnej pasm absorpcji z maksimum w 1765, 1319 i 1240 cm<sup>-1</sup> odpowiadającej kolejno drganiom rozciągającym w grupie C=O i drganiom rozciągającym i deformacyjnym w grupie C-O i O-H. Wskazuje to na proces dekarboksylacji ampicyliny podczas sterylizacji. Podczas ogrzewania ampicyliny w temperaturze 170°C i 180°C obserwowany zakres zmian w strukturze był mniejszy niż dla próbki ogrzewanej w temperaturze 160°C. Wskazuje to na rozstrzygający



RYS.3. Widmo EPR ampicyliny sterylizowanej w temperaturze 180°C zrejestrowane przy mocy mikrofalowej wynoszącej 2.2mW. Pokazano analizowane parametry kształtu linii: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>.

FIG.3. EPR spectrum of ampicyline sterilized at temperature 180°C recorded at microwave power of 2.2mW. The analysed lineshape parameters:  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ , and  $B_2$ , are shown.

tures mentioned above. Changes of FT-IR spectra for sterilized ampicyline samples were manifested by decreasing of relative intensity of the absorption bands at 1765cm-1 as well as at 1319 and 1240cm<sup>-1</sup> corresponding to the stretching vibrations of the C=O groups and stretching and deformation vibrations of the C-O i O-H groups, respectively. It show that decarboxylation take place during



RYS.4. Wpływ mocy mikrofalowej na parametry (a)  $A_1/A_2$ , (b)  $A_1-A_2$ , (c)  $B_1/B_2$ , (d)  $B_1-B_2$ , linii EPR ampicyliny sterylizowanej termicznie w temperaturze 180°C.  $M_0$ -całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70 mW). M-moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR. FIG.4. Influence of microwave power on lineshape parameters (a)  $A_1/A_2$ , (b)  $A_1-A_2$ , (c)  $B_1/B_2$ , (d)  $B_1-B_2$ , EPR lines of ampicyline thermally sterilized at temperature 180°C.  $M_0$ -total microwave power produced by klystron (70mW).

parametr czasu na zmiany struktury ampicyliny w trakcie sterylizacji, w badanym zakresie temperatur.

M-microwave power used during measurement of EPR spectrum

Zgodnie z oczekiwaniami widm EPR nie rejestrowano dla wyjściowej próbki ampicyliny. Widma EPR obserwowano dla ampicyliny sterylizowanej termicznie (RYS.3). Koncentracja wolnych rodników w ampicylinie sterylizowanej w temperaturach 160°C, 170°C i 180°C wynosi odpowiednio: 3.9x10<sup>17</sup>spin/g, 3.5x10<sup>17</sup>spin/g i 5.0x10<sup>17</sup>spin/g. Stwierdzono zależność kształtu widm EPR ampicyliny sterylizowanej termicznie od mocy mikrofalowej (RYS.4), co dowodzi obecności kilku grup wolnych rodników w próbce. Właściwość ta jest zgodna z danymi FT-IR, kóre wskazują na to, iż kilka różnych wiązań chemicznych ulega zerwaniu podczas ogrzewania ampicyliny sterilization. However, in heating of the ampicilyne at 170°C and 180°C, scale of observed structural changes was in a less degree then for sample heated at 160°C. It make obvious that for studied temperature range the time is a decisive parameter for structural changes of the ampicyline during sterilization.

As was expected EPR spectra were not recorded for the original sample of ampicyline. EPR spectra were observed for thermally sterilized ampicyline (FIG.3). Concentrations of free radicals in ampicyline sterilized at temperatures 160°C, 170°C, and 180°C are: 3.9x10<sup>17</sup>spin/g, 3.5x10<sup>17</sup>spin/g and 5.0x10<sup>17</sup>spin/g, respectively. It was stated that lineshape of EPR spectra of thermally sterilized ampicyline depend on microwave power (FIG.4), and it indicates existence of sev-

#### Podsumowanie

Badania FT-IR i EPR wykazały, że sterylizacja w wysokich temperaturach wynoszących od 160°C do 180°C powoduje znaczne zmiany struktury chemicznej ampicyliny. Pomimo tego iż sterylizacja ta prowadzi do skutecznego niszczenia mikroorganizmów w leku, nie jest ona wskazana w przypadku ampicyliny. Jedynie krótka sterylizacja w temperaturze 180°C nie powoduje znaczących zmian struktury. W przypadku ampicyliny można więc zalecić sterylizację termiczną w temperaturze 180°C przez 30 minut. Metody FT-IR i EPR mogą być stosowane do optymalizacji procesu sterylizacji termicznej substancji leczniczych.

#### Podziękowania

Badania te były finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach i Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu. eral groups of free radicals in the sample. It is in agreement with FT-IR data about breaking of several types of chemical bonds during heating of ampicyline.

#### Summary

FT-IR and EPR studies demonstrated that sterilization at high temperatures from 160°C to 180°C causes considerable changes of chemical structure of ampicyline. In spite of thermal sterilization effectively destroys microorganisms in drug, it is not preferable to ampicyline. Only short sterilization at temperature 180°C does not change significantly of the structure. Thus, for ampicyline thermal sterilization at temperature 180°C for 30 minutes is recommended. FT-IR and EPR methods may be used for optimalization of thermal sterilization process of drugs.

## Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

## References

## Piśmiennictwo

[1] Barteczko I. (Red.), Farmacja stosowana, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002

POWSTAWANIE WOLNYCH RODNIKÓW PODCZAS ROZKŁADU TERMICZNEGO MONOAZOTANU IZOSORBITOLU

#### PAWEŁ RAMOS, BARBARA PILAWA\*, MAŁGORZATA KAWKA

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biofizyki, ul.Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, Polska, \*MAILTO: Bpilawa@sum.edu.pl

#### Streszczenie

Wykonano badania wolnych rodników generowanych w monazotanie izosorbitolu pod wpływem wysokiej temperatury. Wyznaczono metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) koncentrację wolnych rodników w próbce. Zbadano wpływ mocy mikrofalowej na kształt widm EPR monoazotanu izosorbitolu. Analizowano procesy relaksacji spin-spin i spin-sieć. Określono wpływ czasu przechowywania próbki po rozkładzie termicznym na wolne rodniki w leku.

Słowa kluczowe: monoazotan izosorbitolu, rozkład termiczny, wolne rodniki, spektroskopia EPR [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 157-160]

#### Wstęp

Substancje lecznicze w wysokiej temperaturze mogą ulegać rozkładowi. Zmianom struktury chemicznej towarzyszy generowanie wolnych rodników, które charakteryzuje wysoka reaktywność ze względu na zawartość niesparowanych elektronów [1-2]. Celem pracy jest określenie koncentracji [2] Zejca A., Gorczyca M., Chemia leków, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004

## FORMATION OF FREE RADICALS DURING THERMAL DECOMPOSITION OF ISOSORBIDE MONONITRATE

#### PAWEŁ RAMOS, BARBARA PILAWA\*, MAŁGORZATA KAWKA

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE, SCHOOL OF PHAR-MACY AND LABORATORY MEDICINE, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND, \*MAILTO: BPILAWA@SUM.EDU.PL

#### Abstract

. . . . . . . . . . . . . . . . .

Studies of free radicals formed in isosorbide mononitrate upon high temperature were performed.. Free radical concentration in the sample was determined by electron paramagnetic resonance (EPR) method. Influence of microwave power on lineshape of EPR spectra of isisorbide mononitrate was examined. Spin-spin and spin-lattice relaxation proccesses were analysed. The effect of storage time of the sample on free radicals in the drug was determined.

Keywords: isosorbide mononitrate, thermal decomposition, free radicals, EPR spectroscopy [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 157-160]

#### Introduction

Drugs at high temperatures may be decomposed. Changes of chemical structure is accompanied by free radicals formation, which are very active because of unpaired electrons contents [1-2]. The aim of this work was to determine concentration and properties of free radicals in isosorbide mononitrate sterilized at high temperature. Knowledge about conditions at which free radicals are formed in drug is very BI MATERIALS

157

i właściwości wolnorodnikowych monoazotanu izosorbitolu sterylizowanego w wysokiej temperaturze. Znajomość warunków powodujących powstawanie wolnych rodników w leku są istotne z medycznego punktu widzenia. Wolne rodniki leku mogą zmieniać strukturę biomateriałów w tkankach.

#### Materiały i metody

Zbadano wolne rodniki powstające w monoazotanie izosorbitolu w wysokiej temperaturze wynoszącej 180°C. Lek poddano działaniu czynnika termicznego w czasie 30 minut. Sterylizacja termiczna monoazotanu izosorbitolu była przeprowadzona zgodnie z obowiązującymi normami. Sterylizację przeprowadzono w suszarce z ciągłym obiegiem suchego powietrza. Strukturę chemiczną monoazotanu izosorbitolu pokazano na RYSUNKU 1. Monoazotan izosorbitolu jest stosowany w chorobach serca [3].

Widma EPR monoazotanu izosorbitolu rejestrowano w dniu sterylizacji termicznej. Pomiary dokonano za pomocą spektrometru EPR Firmy RADIOPAN (Poznań) wykorzystującego promieniowanie mikrofalowe o częstotliwości 9.3GHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem MCM Firmy EPRAD (Poznań). Modulacja pola magnetycznego wynosiła 100 kHz. Dla widm EPR zapisanych w postaci pierwszej pochodnej absorpcji wyznaczono amplitudę (A), intensywność integralną (I) oraz szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR. Z warunku rezonansu wyznaczono współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g. Analizowano parametry opisujące kształt widm EPR:  $A_1/A_2$ ,  $A_1$ - $A_2$ ,  $B_1/B_2$  oraz  $B_1$ - $B_2$ . Widma EPR monoazotanu izosorbitolu zapisano przy mocach mikrofalowych z zakresu 2.2-70mW.

#### Wyniki i dyskusja

Monoazotan izosorbitolu nie poddany sterylizacji termicznej jest diamagnetyczny i nie daje widm EPR. Brak widm EPR testowanego leku wyjściowego dowodzi wysokiej czystości próbki stosowanej w badaniach. Zanieczyszczenia i defekty sieci molekularnej powodują pojawienie się widm EPR. Dla monoazotanu izosrbitolu nie rejestrowano widm EPR nawet przy dużych wzmocnieniach sygnału oraz pryz maksymalnej mocy promieniowania mikrofalowego wytwaimportant from medicinal point of view. Free radicals of drug may change structure of biomaterials in tissues.

#### Materials and methods

Free radicals formed in isosorbide mononitrate at high temperature of 180°C were examined. The drug was effected by thermal agent for 30 minutes. Thermal sterilization of isosorbide mononitrate was performer according to the



RYS.1. Struktura chemiczna monoazotanu izosorbitolu [3]. FIG.1. Chemical structure of isosorbide mononitrate [3]. valid norms. Sterilization was done a hot air oven with air circulation. Chemical structure of isosorbide mononitrate is show in FIGURE 1. Isosorbide mononitrate is used in heart diseases [3].

EPR spectra of isosrbide mononitrate were recorded at day of thermal sterilization. The measurements were done by the use of EPR spectrometer of RADIOPAN Firm (Poznań) with microwave frequency of 9.3GHz. Microwave frequency was measured by MCM recorder of

EPRAD Firm (Poznań). Modulation of magnetic field was 100kHz. For the first derivative EPR spectra amplitude (A), integral intensity (I), and linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines were determined. g-Factor was calculated from the resonance condition. The following parameters describing of lineshape of EPR spectra: A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>, and B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>, were analysed. EPR spectra of isosorbide mononitrate were measured at microwave powers in the range 2.2-70mW.

#### **Results and discussion**

Unsterilized isosorbide mononitrate is diamagnetic and it does not reveal EPR spectrum. The absence of EPR spectrum of the original drug indicates the high purity of the studied sample. Impurities and defects of molecular lattice cause appearance of EPR spectra. For isosrbide mononitrate EPR spectra were not recorded even at high receiver gains and at the maximum microwave power produced by klystron. Strong EPR signals were observed for isosorbide mononitrate sterilized at temperature 180°C (FIG.2).

Free radical concentration in isosorbide mononitrate

rzanego przez klistron. Silne sygnały EPR obserwowano dla monoazotanu izosorbitolu sterylizowanego w temperaturze 180°C (RYS.2).

Koncentracja wolnych rodników w monoazotanie izosorbitolu bezpośrednio po sterylizacji termicznej w temperaturze 180 oC wynosiła 3.1x1017spin/g. W monoazotanie izosorbitolu zachodzą silne oddziaływani dipolowe oraz wolne procesy relaksacji spin-sieć. Widma EPR otrzy-





directly after thermal sterilization at temperature 180°C was 3.1x10<sup>17</sup>spin/ g. Strong dipolar interactions and slow spin-lattice relaxation processes exist in isosorbide mononitrate. Two weeks after thermal treatment EPR spectra were also obtained for the tested drug. It means that isosorbide mononitrate keeps its paramagnetic properties a long time after sterilization, and its free radicals are extraordinary stable.



RYS.3. Wpływ mocy mikrofalowej na parametry (a)  $A_1/A_2$  oraz (b)  $A_1-A_2$  linii EPR monoazotanu izosorbitolu sterylizowanego termicznie.  $M_0$ -całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). M-moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG.3. Influence of microwave power on parameters (a)  $A_1/A_2$  and (b)  $A_1-A_2$  of EPR lines of thermally sterilized isosorbide mononitrate.  $M_0$  – total microwave power produced by klystron (70mW). M–microwave power used during measurement of EPR spectrum.



RYS.4. Wpływ mocy mikrofalowej na parametry (a)  $B_1/B_2 \operatorname{oraz}(b) B_1-B_2 \operatorname{linii}$  EPR monoazotanu izosorbitolu sterylizowanego termicznie.  $M_o$ -całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). M-moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG.4. Influence of microwave power on parameters (a)  $B_1/B_2$  and (b)  $B_1-B_2$  of EPR lines of thermally sterilized isosorbide mononitrate.  $M_0$ -total microwave power produced by klystron (70 mW). M-microwave power used during measurement of EPR spectrum.

mano dla testowanego leku także po dwóch tygodniach od obróbki termicznej. Oznacza to, ze monoazotan izosorbitolu zachowuje swoje właściwości paramagnetyczne długo po sterylizacji, a jego wolne rodniki są wyjątkowo stabilne. Cechę tą można uznać za negatywną, ponieważ paramagnetyczny monoazotan izosorbitolu wprowadzony do organizmu może oddziaływać negatywnie na tkanki i biomateriały.

Widma EPR monoaoztanu izosorbitolu charakteryzuje niesymetryczny kształt (RYS.2). Kształt ten silnie zależy od mocy mikrofalowej stosowanej podczas pomiaru linii EPR. Zależność poszczególnych parametrów kształtu widma EPR od mocy mikrofalowej pokazano na RYSUNKACH 3-4. Zmiana parametrów kształtu z mocą mikrofalową dowodzi złożoności układu wolnych rodników w monoazotanie izosorbitolu ogrzewanym w temperaturze 180°C.

#### Podsumowanie

Badania metodą EPR wykazały, że monoazotan izoosrbitolu sterylizowany w temperaturze 180°C przez 30 minut jest silnie paramagnetyczny. Ze względu na wpływ wolnych rodników na biomateriały w tkankach monoazotan izosorbitolu nie powinien być sterylizowany w tych warunkach. This feature is the negative one, because of paramagnetic isosorbide mononitrate in organism may negatively interact with tissues and biomaterials.

EPR spectra of isosorbide mononitrate is characterized by unsymmetrical lineshape (FIG.2). This lineshape strongly depends on microwave power used during the measurement of EPR line. The dependences of the following lineshape parameters of the EPR spectra on microwave power are presented in FIGURES 3-4. Changes of the lineshape parameters with microwave power indicate complex character of free radicals system in isosorbide mononitrate heated at temperature 180°C.

#### Summary

EPR studies indicate that isosorbide mononitrate sterylized at temperature 180°C for 30 minutes is strong paramagnetic. In consideration of effect of free radicals on biomaterials in tissues isosorbide mononitrate should not be sterilized at these conditions.

# <sup>160</sup> Podziękowania

Badania te były finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

#### Piśmiennictwo

[1] Eaton G. R., Eaton S. S., Salikhov K. M. (Eds.), Foundations of modern EPR, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong 1998

[2] G. Bartosz, Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, PWN, Warszawa 2004

#### Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

#### References

[3] Zejca A., Gorczyca M., Chemia leków, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004

. . . . . . . . . . . . . . . . . .

## BADANIA RHIZOMA CALAMI METODĄ EPR

Katarzyna Pawłowska-góral<sup>1\*</sup>, Ewa Kurzeja<sup>1</sup>, Barbara Pilawa<sup>2</sup>, Paweł Ramos<sup>2</sup>

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, <sup>1</sup>Katedra I Zakład Żywności I Żywienia, <sup>2</sup>Katedra Biofizyki, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, Polska, MAILTO: kgoral@sum.edu.pl

#### Streszczenie

Przeprowadzono badania Rhizoma calami z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) na pasmo X (9.3 GHz). Porównano koncentrację i właściwości centrów paramagnetycznych w próbkach wyjściowych oraz sterylizowanych parą wodną. Wykazano, że wolne rodniki występują w obydwu badanych próbkach roślinnych. Ciągłe nasycenie mikrofalowe linii EPR wykazało jednorodne rozmieszczenie wolnych rodników oraz wolne procesy relaksacji spin-sieć w Rhizoma calami.

Słowa kluczowe: Rhizoma calami, sterylizacja, wolne rodniki, spektroskopia EPR

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 160-162]

#### Wstęp

Surowce zielarskie oraz przyprawy mogą być zanieczyszczone przez bakterie, grzyby, wirusy i pasożyty [1]. Suche zioła zawierają głównie bakterie tlenowe Bacillus, bakterie beztlenowe Clostridium oraz grzyby pleśniowe Aspergillus, Penicillinum, Rizopus i Fusarium [1]. Celem usunięcia mikroorganizmów zioła poddawane są procesowi sterylizacji. Najczęściej stosowaną metodą jest w tym przypadku sterylizacja parowa [1]. Optymalny proces sterylizacji nie powinien generować dużej ilości wolnych rodników w próbce. Wolne rodniki stanowią przyczynę wielu niepożądanych reakcji biochemicznych w organizmie człowieka [2]. Celem prezentowanej pracy jest określenie wpływu procesu sterylizacji parowej na wolne rodniki w Rhizoma calami. Zawartość wolnych rodników w Rhizoma calami jest szczególnie ważna dla ziół stosowanych w kosmetyce.

## EPR STUDIES OF RHIZOMA CALAMI

Katarzyna Pawłowska-góral<sup>1\*</sup>, Ewa Kurzeja<sup>1</sup>, Barbara Pilawa<sup>2</sup>, Paweł Ramos<sup>2</sup>

Medical University of Silesia in Katowice, School of Pharmacy And Laboratory Medicine, <sup>1</sup>Department Of Food And Nutrition, <sup>2</sup>Department Of Biophysics, 28 Jedności Str., 41-200 Sosnowiec, Poland MAILTO: Kgoral@sum.edu.pl

#### Abstract

Rhizoma calami was examined by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy at X-band (9.3 GHz). Concentration and properties of paramagnetic centers in the original sample and sample sterilized by water vapour were compared. It was stated that free radicals exist in both the studied plant samples. Continuous microwave saturation of EPR lines proved homogeneous distribution of free radicals and slow spin-lattice relaxation processes in Rhizoma calami.

*Keywords: Rhizoma calami, sterilization, free radicals, EPR spectroscopy* 

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 160-162]

#### Introduction

Herbal materials and spices may be contaminated by bacterium, fungi, viruses, and parasites [1]. Dry herbs contain mainly oxygen bacterium Bacillus, nonoxygen bakterium Clostridium and mildew fungus Aspergillus, Penicillinum, Rizopus and Fusarium [1]. Herbs are sterilized to remove microorganisms. The most popular method in this case is sterilization by water vapour [1]. Optimal sterilization process should not produce high Mount of free radicals. Free radicals are the source of negative biochemical reactions in human organism [2]. The aim of this work was to determine effect of vapour sterilization process on free radicals in Rhizoma calami. Free radical content in Rhizoma calami is especially import ant for herb used in cosmetics.

#### Materiały i metody

Wykonano badania porównawcze wolnych rodników w próbce Rhizoma calami nie poddanej sterylizacji oraz w próbce sterylizowanej zgodnie z normami europejskimi parą wodną. Badane próbki pokazano na RYSUNKU 1. Rhizoma calami stosujemy w mieszankach ziołowych do pielęgnacji włosów i leczenia schorzeń skóry głowy [1]. Rhizoma calami zawiera olejki eteryczne stosowane zewnętrznie do

wcierania dla uśmierzania bólu, przy gośćcu i rwie kulszowej [1]. Rhizoma calami jest stosowany w szamponach, mydłach i preparatach kosmetycznych.

Dla suchych próbek w postaci proszkowej rejestrowano widma EPR w postaci pierwszej pochodnej. Widma mierzono za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego o częstotliwości promieniowania mikrofalowego wynoszącej 9.3GHz produkcji RADIOPAN (Poznań, Polska). Zastosowano modulację pola magnetycznego wynoszącą 100kHz oraz moce mikrofalowe z zakresu 2.2-70mW. Wyznaczono koncentracje wolnych rodników w próbkach wykorzystując jako wzorzec ultramarynę. Pole powierzchni pod krzywą absorpcji wyznaczono poprzez podwójne całkowanie widm EPR. Wprost z warunku rezonansu wyznaczono współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g. Wyznaczono następujące parametry widm EPR: amplitudę (A), intensywność integralną (I) oraz szerokość

а

(ΔB<sub>pp</sub>) linii. Określono zmianę amplitudy i szerokości linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej.

#### Wyniki i dyskusja

Dla obydwu badanych próbek Rhizoma calami rejestrowano widma EPR w całym zakresie mocy mikrofalowych (2.2-70mW). Przykładowe widma EPR próbki wyjściowej i sterylizowanej parą wodną pokazano na RYSUNKU 2. W Rhizoma calami występują więc stabilne wolne rodniki o koncentracji rzędu



RYS.1. Wyjściowa (a) i sterylizowana (b) sproszkowana próbka Rhizoma calami. FIG.1. Original (a) and sterilized (b) powdered samples of Rhizoma calami.

of head [1]. Rhizoma calami contains etheral oil to external application to relief from pain, in rheumatism and ischias [1]. Rhizoma calami is used in shampoo, soap, and cosmetics probes.

First-derivative EPR spectra were recorded for dried powdered samples. Spectra were measured by electron paramagnetic resonance spectrometer with microwave frequency of 9.3GHz produced by RADIOPAN (Poznań, Poland). Modulation of magnetic field was 100kHz and microwave powers were in the range of 2.2-70mW. free radical concentration in the samples was determined with ultramarine as the reference. Area under the absorption curve was calculated as double integration of EPR spectra. g-Factor was obtained from the resonance condition. The following parameters of EPR spectra were determined: amplitude (A), integral intensity (I), and linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ). Changes of amplitude and linewidth of EPR lines with in-

creasing of microwave power was analysed.

#### Results and discussion

For both the examined samples of Rhizoma calami EPR spectra were recorded at all microwave powers (2.2-70mW). Exemplary EPR spectra of the original sample and water vapour sterilized sample are show in FIGURE 2. Stable free radicals with



RYS.3. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR wyjściowej (o)(a) i sterylizowanej (•)(b) próbki Rhizoma calami. M<sub>o</sub>-całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). M-moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG.3. Influence of microwave power on amplitude (A) of EPR Line of original (o)(a) and sterilized (•)(b) samples of Rhizoma calami. M<sub>o</sub>-total microwave power produced by klystron (70mW). M-microwave power used during measurement of EPR spectrum.



RYS.2. Widma EPR wyjściowej (a) i sterylizowanej (b) próbki Rhizoma calami. Widma rejestrowano przy mocy mikrofalowej wynoszącej 2.2mW. FIG.2. EPR spectra of original (a) and sterilized (b) samples of Rhizoma calami. Spectra were recorded at microwave power of 2.2 W.

## Materials and methods

Comparative studies of free radicals in unsterilized Rhizoma calami sample and sample vapour sterilized according to the European norms, were performed. The examined samples are shown in FIGURE 1. Rhizoma calami are used in herbal mixtures for hair and diseases of skin

BI MATERIALS

161



RYS.4. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość ( $\Delta$ Bpp) linii EPR wyjściowej (o)(a) i sterylizowanej (•)(b) próbki Rhizoma calami. M<sub>o</sub>-całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). M-moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG.4. Influence of microwave power on linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR Line of original (o)(a) and sterilized ( $\bullet$ )(b) samples of Rhizoma calami. M<sub>o</sub>-total micorwave power produced by klystron (70mW). M-microwave power used during measurement of EPR spectrum.

10<sup>16</sup>spin/g. Koncentracja ta nie jest duża w porównaniu z innymi składnikami produktów kosmetycznych [3]. Sterylizacja parą wodną nie powoduje generowania dużej ilości wolnych rodników w analizowanej próbce roślinnej, a więc jej struktura nie ulega zniszczeniu w tym procesie. Badania metodą EPR potwierdziły przydatność tego rodzaju sterylizacji do usuwania mikroorganizmów z Rhizoma calami.

W obydwu próbkach Rhizoma calami zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć (RYS.3), a linie EPR są poszerzone jednorodnie (RYS.3-4). Struktura chemiczna Rhizoma calami umożliwia silne oddziaływania dipolowe pomiędzy wolnymi rodnikami, co powoduje poszerzenie ich linii EPR (RYS.4).

#### Podsumowanie

Badania Rhizoma calami metodą EPR wykazały właściwości paramagnetyczne zarówno próbki wyjściowej jak i próbki sterylizowanej. Podobne widma EPR rejestrowano dla obydwu w/w próbek. Koncentracja wolnych rodników w próbce wyjściowej i sterylizowanej jest tego samego rzędu. Sterylizacja parą wodną może być więc zalecana dla Rhizoma calami.

#### Podziękowania

Badania te były finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. concentration of 10<sup>16</sup>spin/g exist in Rhizoma calami. This concentration is not high compared to concentration in the others components of cosmetics products [4]. Water vapour sterilization does not form high Mount of free radicals in the analysed plant sample, so its structure is not destroyed in this process. The performed EPR studies confirmed usefulness of such type of sterilization to removing of microorganisms from Rhizoma calami.

Slow spin-lattice relaxation processes exist in both Rhizoma calami samples (FIG.3), and their EPR lines are homogenously broadened (FIGS.3-4). Chemical structure of Rhizoma calami renders possible strong dipolar interactions between free radicals, which broaden their EPR lines (FIG.4).

#### Summary

EPR studies of Rhizoma calami indicate paramagnetic properties of both the original and sterilized samples. Similar EPR spectra were recorded for both the mentioned above samples. Free radical concentration in the original and sterilized samples is the similar raw. The water vapour sterilization may be recommended for Rhizoma calami.

#### Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

#### References

Piśmiennictwo

 [1] A. Ożarowski, W. Jaroniewski, Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie, Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa 1989

[2] G. Bartosz, Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, PWN, Warszawa 2004

[3] E. Chodurek, D. Czyżyk, B. Pilawa, S. Wilczyński, Electron paramagnetic resonance studies of free radicals of melanin polymers in cosmetics products, Engineering of Biomaterials 2008, XI(81-84), 59-60

BI MATERIALS

## WOLNE RODNIKI W STERYLIZOWANYM TERMICZNIE VERAPAMILU

PAWEŁ RAMOS, PIOTR PEPLIŃSKI, BARBARA PILAWA\*

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biofizyki, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, Polska \*MAILTO: bpilawa@sum.edu.pl

#### Streszczenie

Zbadano generowanie wolnych rodników w werapamilu podczas sterylizacji termiczne w temperaturze 180°C. Koncentrację i właściwości wolnych rodników analizowano z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) na pasmo X (9.3 GHz). Wykazano, że w procesie sterylizacji termicznej powstają w werapamilu stabilne wolne rodniki. Wolne procesy relaksacji spin-sieć oraz silne oddziaływania dipolowe występują w werapamilu. Badania metodą EPR wykazały, że sterylizacja wysokotemperaturowa nie jest zalecana dla werapamilu. **Słowa kluczowe:** werapamil, sterylizacja termicz-

na, wolne rodniki, spektroskopia EPR [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 163-165]

#### Wstęp

Sterylizacja powinna niszczyć mikroorganizmy w substancji leczniczej [1], ale nie powinna generować w niej wolnych rodników. Wolne rodniki inicjują toksyczne reakcje biochemiczne w organizmie [2-3]. Wolne rodniki werapamilu mogą również negatywnie wpływać na biomateriały i implanty. Celem pracy jest określenie koncentracji i właściwości wolnorodnikowych werapamilu sterylizowanego w wysokiej temperaturze. Sprawdzono, czy sterylizacja termiczna może być wykonywana w przypadku tego leku.

#### Materiały i metody

Zbadano wolne rodniki w werapamilu sterylizowanym zgodnie z normami w temperaturze 180°C przez 30 minut. Sterylizację przeprowadzono w suszarce z ciągłym obiegiem suchego powietrza. Strukturę chemiczną werapamilu pokazano na RYSUNKU 1. Werapamil jest stosowany w





PAWEŁ RAMOS, PIOTR PEPLIŃSKI, BARBARA PILAWA\*

\*MAILTO: BPILAWA@SUM.EDU.PL

#### Abstract

Free radical formation in verapamil during thermal sterilization at temperature 180°C was studied. Concentration and properties of free radicals were examined by the use of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy at X-band (9.3GHz). It was stated that stable free radicals are formed during thermal sterilization of verapamil. Slow spin-lattice relaxation processes and strong dipolar interactions exist in verapamil.EPR studies showed that sterilization at high temperature is not recommended for verapamil.

**Keywords:** vearapmil, thermal sterilization, free radicals, EPR spectroscopy

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 163-165]

#### Introduction

Sterilization should destroy microorganisms in drug [1], but it should not form free radicals in it. Free radicals initiate biochemical reactions in organism [2-3]. Free radicals of verapamil may negatively effect on biomaterials and implants. The aim of this work was to determine concentration and properties of free radicals in verapamil sterilized at high temperature. It was checked usefulness thermal sterilization for this drug.

#### Materials and methods

Free radicals in verapamil sterilized according to norms at temperature 180°C during 30 minutes were examined. Sterilization was performed in hot air oven with air circulation. Chemical structure of verapamil is presented in



temperaturze 180°C zrejestrowane przy mocy mikrofalowej wynoszącej 2.2mW. Pokazano analizowane parametry kształtu linii:  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  i  $B_2$ .

FIG.2. EPR spectrum of verapamil sterilized at temperature 180°C recorded at microwave Power of 2.2mW. The analysed lineshape parameters:  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ , and  $B_2$ , are shown.

...........

chorobach serca [4]. Wolne rodniki są szczególnie niebezpieczne przy podaniu dożylnym tego leku.

Próbkę leku w postaci proszku umieszczono w rurkach szklanych i rejestrowano widma EPR w dniu sterylizacji. Wyznaczono koncentrację wolnych rodników w próbce oraz parametry widm EPR.

#### Wyniki i dyskusja

Dla próbki leku wyjściowego nie rejestrowano widm EPR. Silne sygnały EPR obserwowano dla werapamilu sterylizowanego w temperaturze 180°C.

Koncentracja wolnych rodników w werapamilu bezpośrednio po sterylizacji termicznej wynosiła 7.3x10<sup>17</sup> spin/g. Silne sygnały EPR dla werapamilu rejestrowano nawet po kilku tygodniach od sterylizacji. Zależność amplitudy i szerokości linii od mocy mikrofalowej (RYS.3) wskazuje na jendnorodne poszerzenie widm EPR werapamilu. W werapamilu zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć, linie EPR nasycają się dla niskich wartości mocy mikrofalowych (RYS.3a). Szerokie linie EPR (RYS.3b) wskazują na silne oddziaływania dipolowe w werapamilu. Zależność parametrów kształtu widm EPR od mocy mikrofalowej (RYS.4-5) dowodzi występowania kilku rodzajów wolnych rodników w sterylizowanym werapamilu. FIGURE 1. Verapamil is applied in heart diseases [4]. Free radical is especially danger after intravenous application of this drug.

The powdered drug sample was put into a glass tube and EPR spectra were measured at day of sterilization. Free radicals concentration in the sample and parameters of EPR spectra were determined.

#### **Results and discussion**

For the original sample of the examined drug EPR spectra were not obtained. Strong EPR signals were observed for verapamil sterilized at temperature 180°C.

Free radical concentration in verapamil after thermal sterilization was 7.3x10<sup>17</sup>spin/g. Strong EPR signals were recorded for verapamil even after several weeks after sterilization. Dependence of amplitude and linewidth on microwave power (FIG.3) indicates homogeneous broadening of EPR spectra of verapamil. Slow spin-lattice relaxation processes exist in verapamil, its EPR lines saturate at low microwave power (FIG.3a). Broad EPR lines (FIG. 3b) point out that strong dipolar interactions are characteristic for verapamil. Dependences of lineshape parameters of EPR spectra on microwave power (FIGs.4-5) prove the existence of several types of free radicals in sterilized verapamil.



RYS. 3. Wpływ mocy mikrofalowej na (a) amplitudę (A) i (b) szerokość (ΔB<sub>pp</sub>) linii EPR werapamilu sterylizowanego termicznie. M<sub>o</sub>–całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). M–moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG.3. Influence of microwave power on (a) amplitude (A) and (b) linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR Line of thermally sterilized verapamil.  $M_o$ -total microwave power produced by klystron (70mW). M-microwave power used during measurement of EPR spectrum.



RYS.4. Wpływ mocy mikrofalowej na parametry (a)  $A_1/A_2$  oraz (b)  $A_1-A_2$  linii EPR werapamilu sterylizowanego termicznie.  $M_0$ -całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). M-moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG.4. Influence of microwave power on parameters (a)  $A_1/A_2$  and (b)  $A_1-A_2$  of EPR lines of thermally sterilized verapamil.  $M_0$ -total microwave power produced by klystron (70mW). M-microwave power used during measurement of EPR spectrum.



FIG.5. Influence of microwave power on parameters (a)  $B_1/B_2$  and (b)  $B_1-B_2$  of EPR lines of thermally sterilized verapamil.  $M_o$ -total microwave power produced by klystron (70mW). M-microwave power used during measurement of EPR spectrum.

RYS.5. Wpływ mocy mikrofalowej na parametry (a)  $B_1/B_2$  oraz (b)  $B_1-B_2$  linii EPR werapamilu sterylizowanego termicznie.  $M_o$ -całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). M-moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

#### Podsumowanie

Badania werapamilu metodą EPR wykazały, że lek niesterylizowany jest diamagnetyczny, a sterylizacja termiczna odpowiada za wystąpienie paramagnetyzmu próbki. Układ wolnych rodników w werapamilu sterylizowanym termicznie ma charakter złożony. Ze względu na generowanie dużej ilości wolnych rodników (~10<sup>17</sup>spin/g) sterylizacja w temperaturze 180°C nie jest zalecana dla werapamilu. Wolne rodniki leku mogą uszkadzać tkanki, biomateriały i implanty.

#### Podziękowania

Badania te były finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

#### Summary

EPR studies of verapamil show that the unsterilized drug is diamagnetic, and that the thermal sterilization is responsible for paramagnetism of the sample. Free radical system of thermally sterilized verapamil reveal complex character. Taking to account formation of high amount of free radicals (~10<sup>17</sup>spin/g) it can be conclude that sterilization at temperature 180°C is not recommended for verapamil. Free radicals of this drug may destroy tissues, biomaterials and implants.

#### Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

#### Piśmiennictwo

 Barteczko I. (Red.), Farmacja stosowana, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002
 G. Bartosz, Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie,

PWN, Warszawa 2004

#### References

[3] Eaton G. R., Eaton S. S., Salikhov K. M. (Eds.), Foundations of modern EPR, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong 1998

[4] Zejca A., Gorczyca M., Chemia leków, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004

. . . . . . . . . . . . . . . .

165

# <sup>166</sup> WŁAŚCIWOŚCI PARAMAGNETYCZNE BIOMATERIAŁÓW

BARBARA PILAWA, JAKUB ADAMCZYK\*, MAGDALENA ZDYBEL, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, PAWEŁ RAMOS, DARIA CZYŻYK, Magdalena Kościelniak

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATO-RYJNEJ, KATEDRA BIOFIZYKI, UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA \*MAILTO: JADAMCZYK@SUM.EDU.PL

#### Streszczenie

Paramagnetyczne biomateriały mogą być wysoce reaktywne oraz mogą ulegać destrukcji w wyniku reakcji wolnorodnikowych. W pracy przedstawiono znane z literatury naukowej badania właściwości paramagnetycznych biomateriałów z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Wskazano także paramagnetyczne biomateriały, które nie były dotąd analizowane metodą EPR.

Słowa kluczowe: biomateriały, paramagnetyzm, centra paramagnetyczne, wolne rodniki, EPR [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 166-168]

## Wstęp

Wiele biomateriałów zawiera centra paramagnetyczne, a więc niesparowane elektrony [1-14]. Paramagnetyczne biomateriały mogą wywoływać toksyczne efekty w tkankach w wyniku reakcji inicjowanych przez ich wolne rodniki. Należy spodziewać się również, że paramagnetyczne biomateriały ulegaja łatwiej niż próbki diamagnetyczne zniszczeniu w wyniku oddziaływań centrów paramagnetycznych w nich zawartych z molekułami środowiska, a w szczególności z paramagnetycznymi molekułami tlenu. Problem oddziaływań paramagnetycznych biomateriałów z tkanką oraz otoczeniem nie jest szeroko omówiony w literaturze naukowej. Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu znanych publikacji dotyczących właściwości paramagnetycznych biomateriałów oraz zastosowań spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego w ich badaniach. W opracowaniu niniejszym dokonano także przeglądu biomateriałów, których paramagnetyzm nie był do tej pory szczegółowo analizowany.

## Materiały i metody

MATERIALS

Paramagnetyczne biomateriały, to biomateriały zawierające wolne rodniki, birodniki, paramagnetyczne jony metali lub elektrony przewodnictwa [1-14]. Powszechnie znanym paramagnetycznymi biomateriałami są biopolimery melaninowe [4-9]. Biopolimery melaninowe są stosowane coraz częściej w substancjach kosmetycznych [9]. Paramagnetyczne moga być leki poddane sterylizacji radiacyjnej [10-11] i termicznej [12], a ich centra paramagnetyczne mogą oddziaływać z implantami. Metalowe implanty są paramagnetyczne ze względu na elektrony przewodnictwa. Materiały węglowe również zawierają centra paramagnetyczne [13-15].

Paramagnetyczne biomateriały mogą być badane metodą EPR. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego dostarcza informacji o rodzaju centrów

# PARAMAGNETIC PROPERTIES OF BIOMATERIALS

BARBARA PILAWA, JAKUB ADAMCZYK\*, MAGDALENA ZDYBEL, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, PAWEŁ RAMOS, DARIA CZYŻYK, MAGDALENA KOŚCIELNIAK

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE, SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

## Abstract

Paramagnetic biomaterials may be very reactive and they may be destroyed by free radical reactions. In this work the known from scientific publications electron paramagnetic resonance (EPR) studies of paramagnetic properties of biomaterials are presented. Unexamined by EPR paramagnetic biomaterials were also described.

Keywords: biomaterials, paramagnetism, paramagnetic centers, free radicals, EPR

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 166-168]

## Introduction

High amount of biomaterials contain paramagnetic centers, so they contain unpaired electrons [1-14]. Paramagnetic biomaterials may cause toxic effects in tissues as result of reactions initiated by free radicals. It is also expected that paramagnetic biomaterials are easier destructed than diamagnetic samples, because of interactions of their paramagnetic centers with molecules in the environment, especially with paramagnetic oxygen molecules. The question of interactions of paramagnetic biomaterials with tissues and with the environment is not wide discussed in scientific literature. The aim of this work is to review the known publications about properties of paramagnetic biomaterials and about application of electron paramagnetic resonance spectroscopy to their examination. In this paper we also described biomaterials with unanalysed paramagentism.

## Materials and methods

Paramagnetic biomaterials are biomaterials containing free radicals, biradicals, paramagnetic metal ions, and conductive electrons [1-14]. Generally known paramagnetic biomaterials are the melanin biopolymers [4-9]. Melanin biopolymers are used in cosmetic substances [9]. Paramagnetic May be radiosterilized [10-11] and thermally sterylized [12] drugs, and their paramagnetic center May interact with implants. Metal implants are paramagnetic, because of their conductive elctrons. Coal materials also contain paramagnetic centers [13-15].

Paramagnetic biomaterials may be examined by EPR method. Electron paramagnetic resonance spectroscopy gives information about type of paramagnetic centers in the sample, about their concentration, spin-spin and spin-lattice interactions, and about interactions of paramagnetic centers of the sample with oxygen [16-18].

paramagnetycznych występujących w próbce, o ich koncentracji, oddziaływaniach spin-spin i spin-sieć oraz o oddziaływaniach centrów paramagnetycznych próbki z tlenem [16-18].

#### Wyniki i dyskusja

Znane z literatury badania biopolimerów melaninowych metodą EPR [4-9] wykazały ich silny paramagnetyzm wynikający z obecności wich strukturze o-semichinonowych wolnych rodników [4-9] i birodników [4]. Paramagnetyczne jony metali obniżają amplitudę linii EPR, a diamagnetyczne jony metali zwiększają amplitudę linii EPR melaniny [6-8]. W metodzie EPR (RYS.1a) paramagnetyczna próbka biomateriału umieszczona jest w polu magnetycznym między biegunami elektromagnesu (RYS.1b) spektrometru [18]. W polu magnetycznym



RYS.1. Spektrometr EPR na pasmo X (9.3GHz) z modulacją pola magnetycznego 100kHz (a) oraz wnęka rezonansowa znajdująca się między biegunami elektromagnesu (b). Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

FIG.1. An X-band (9.3GHz) EPR spectrometer with magnetic modulation of 100kHz (a) and resonance cavity between poles of electromagnet (b). Department of Biophysics, School of Pharmacy and Laboratory Medicine in Sosnowiec, Medical University of Silesia in Katowice.

dochodzi do zeemanowskiego rozszczepienia poziomów energetycznych. Niesparowane elektrony wzbudzane są promieniowaniem mikrofalowym i przechodzą na wyższe poziomy energetyczne. Musi wtedy być spełniony warunek rezonansu:  $hv=g\mu_BB_r$  (h–stała Plancka, v–częstotliwość promieniowania mikrofalowego, g–współczynnik rozszczepienia spektroskopowego,  $\mu_B$ –magneton Bohra,  $B_r$ -rezonansowa indukcja magnetyczna) [18]. Dla paramagnetycznego biomateriału rejestrujemy widmo EPR. Eu- i feomelanina różnią się kształtem widm EPR [4-6].

Leki poddane działaniu promieniowania gamma [10-11] oraz wysokiej temperatury [12] wykazują złożone widma EPR. Układ paramagnetyczny sterylizowanych substancji leczniczych tworzy kilka grup centrów paramagnetycznych.

Badania materiałów węglowych i węgli metodą EPR [13-15] wykazały ich paramagnetyzm. Można spodziewać się więc, że stosowane w medycynie kompozyty węglowe i kompozyty węglowo-polimerowe [1-2] będą oddziaływały magnetycznie na tkanki. Podobnie biomateriały metaliczne [1-3] mogą oddziaływać na tkanki.

#### Podsumowanie

Silny paramagnetyzm stanowi najczęściej negatywną cechę biomateriałów. Biomateriały powinny zawierać jak najmniejsze ilości centrów paramagnetycznych. Właściwości paramagnetyczne biomateriałów mogą być analizowane metodą EPR. Spektroskopia EPR powinna być standardowo stosowana do oceny praktycznej przydatności biomateriałów.

#### Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

#### **Results and discussion**

The known EPR studies of melanin biopolymers [4-9] pointed out their strong paramagnetism resulted from existance of o-semiguinone free radicals [4-9] and biradicals [4] in their structure. Paramagnetic metal ions decrease amplitude of EPR lines of melanin, and diamagnetic metal ions increase the amplitude [6-8]. In the EPR method (Fig. 1a) paramagnetic sample of biomaterials is located at magnetic field between poles of electromagnet in the spectrometer (Fig. 1b) [18]. Zeeman splitting of energy levels occurs in magnetic field. Unpaired elctrons are excited to the higher levels by microwave radiation. Resonance condition: hv= gµ<sub>B</sub>B<sub>r</sub> (h–Planck constant, v–microwave frequency, g–factor,  $\mu_{B}$ -Bohr magneton, B<sub>r</sub>-magnetic resonance induction, is fullfield [18]. For paramagnetic biomaterials EPR spectra are recorded. Eu- and pheomelanins differ in lineshape of EPR spectra [4-6].

Drugs after gamma irradiation [10-11] and action of high temperature [12] reveal complex EPR spectra. Paramagnetic system of sterilized drugs are formed by several groups of paramagnetic centers.

EPR studies of coal materials and coals [13-15] proved their paramagnetism. It is expected that coal composites and coal-polymer composites [1-2] magnetically interact with tissues. Similarly, metalic biomaterials [1-3] may interact with tissues.

#### Summary

Strong paramagnetism is the negative property of biomaterials. Biomaterials shoul contain the lowest amount of paramagnetic centers. Paramagnetic properties of biomaterials may be analysed by the use of EPR method. EPR spectroscopy is proposed as the standard method of estimation of practical usefulness of biomaterials.

#### Acknowledgements

This work was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

167

#### ••••• Piśmiennictwo

#### References

[1] J. Marciniak, Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002

[2] S. Błażewicz, L. Stoch (Red.), Biomateriały, tom 4: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000, M. Nałęcz (Red.), Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003

[3] A. Szymański, Biomineralizacja i biomateriały, PWN, Warszawa 1991

[4] B. Pilawa, M. Zdybel, M. Latocha, R. Krzyminiewski, Z. Kruczyński, Analysis of lineshape of black Drosophila melanogaster EPR spectra, Current Topics in Biophysics 2008, 31, 5-9

[5] B. Pilawa, E. Buszman, A. Gondzik, S. Wilczyński, M. Zdybel, T. Witoszyńska, T. Wilczok, Effect of pH on paramagnetic centers in Cladosporium cladosporioides, Acta Physica Polonica A 2005, 108(1), 147-150

[6] M. Matuszczyk, E. Buszman, B. Pilawa, T. Witoszyńska, T. Wilczok, Cd2+ effect on free radicals in Cladosporium cladosporioides-melanin tested by EPR spectroscopy, Chemical Physics Letters 2004, 394(4-6), 366-371

[7] B. Bilińska, B. Pilawa, Z. Zawada, E. Wylęgała, T. Wilczok, A. E. Dontsov, N. L. Sakina, M. A. Ostrovsky, V. B. Ilyasova, Electron spin resonance investigations of human retinal pigment epithelium melanosomes from young and old donors, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2002, 58(10), 2257-2264

[8] B. Pilawa, E. Buszman, D. Wrześniok, M. Latocha, T. Wilczok, Application of EPR spectroscopy to examination of gentamicin and kanamycin binding to DOPA-melanin, Applied Magnetic Resonance 2002, 23, 181-192

[9] E. Chodurek, D. Czyżyk, B. Pilawa, S. Wilczyński, EPR studies of paramagnetic centers in melanin from Sepia officinalis/Badania centrów paramagnetycznych melaniny z Sepia officinalis metodą EPR, Engineering of Biomaterials/Inżynieria Biomateriałów 2009, 86, 28-32 [10] S. Wilczyński, M. Ptaszkiewicz, E. Pierzchała, B. Pilawa, J. Swakoń, P. Olko, Application of EPR spectroscopy to examination of gamma-irradiated azithromycin, Current Topics in Biophysics 2008, 31, 1-4

[11] S. Wilczyński, J. Lekki, W. Kwiatek, E. Chodurek, B. Pilawa, Formation of paramagnetic center in sterilized gentaminin and neomycin irradiated by protons, Polish Journal of Environmental Studies 2006, 15(4A), 216-218

[12] B. Pilawa, P. Ramos, S. Wilczyński, K. Czyż, Free radicals system analysis for thermally sterilized diclofenac/Analiza układu centrów paramagnetycznych w termicznie sterylizowanym diklofenaku, Engineering of Biomaterials/Inżynieria Biomateriałów 2008, XI(81-84), 57-58

[13] M. Krzesińska, B. Pilawa, S. Pusz, J. Ng, Biologiczne prekursory dla tzw. "drewnianych" ceramik (woodceramics) – otrzymywanie i właściwości, Inżynieria Materiałowa 2006, 27(1), 32-36

[14] B. Pilawa, R. Pietrzak, H. Wachowska, K. Babeł, EPR studies of carbonized cellulose – oxygen interactions, Acta Physica Polonica A 2005, 108(2), 151-154

[15] B. Pilawa, A.B. Więckowski, Groups of paramagnetic centers in coal samples with different carbon contents, Research on Chemical Intermediates 2007, 33(8-9), 825-839

[16] G. R. Eaton, S. S. Eaton, K. M. Salikhov (Eds.), Foundations of modern EPR, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong 1998

[17] W. Pryor (Ed.), Free radicals in biology, Academic Press, New York, San Francisco, London 1976

[18] J. Stankowski, W. Hilczer, Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2005

#### 

# WPŁYW FLUCYTOZYNY NA WŁAŚCIWOŚCI PARAMAGNETYCZNE CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES

Barbara Pilawa<sup>1</sup>, Magdalena Zdybel<sup>1\*</sup>, Ewa Buszman<sup>2</sup>, Teresa Witoszyńska<sup>2</sup>, Honorata Cieśla<sup>1</sup>

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny Z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej: <sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofizyki.

\*KATEDRA T ZAKŁAD DIOFIZYKI,
UL.JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA
\*KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII I ANALIZY LEKÓW,
UL. JAGIELLOŃSKA 4, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA
\*MAILTO: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

#### Streszczenie

Zbadano właściwości paramagnetyczne upigmentowanych grzybów glebowych Cladosporium cladosporioides oraz ich kompleksów z flucytozyną z zastosowaniem spektroskopii EPR. Eumelanina występująca w Cladosporium cladosporioides odpowiada głównie za ich silne sygnały EPR. Flucytozyna zwiększa koncentrację o-semichinonowych wolnych rodników w melaninie Cl. cladosporioides. Wolne

# EFFECT OF FLUCYTOSINE ON PARAMAGNETIC PROPERTIES OF CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES

Barbara Pilawa<sup>1</sup>, Magdalena Zdybel<sup>1\*</sup>, Ewa Buszman<sup>2</sup>, Teresa Witoszyńska<sup>2</sup>, Honorata Cieśla<sup>1</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE: SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE, <sup>1</sup>DPARTMENT OF BIOPHYSICS, 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND <sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, 4 JAGIELLOŃSKA STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

\*MAILTO: mzdybel@sum.edu.pl

#### Abstract

Paramagnetic properties of pigmented soil fungi Cladosporium cladosporioides and their complexes with flucytosine were studied by EPR spectroscopy. Eumelanin of Cladosporium cladosporioides is mainly responsible for their strong EPR signals. Flucytosine increases o-semiquinone free radicals concentration in melanin of Cl. cladosporioides. Slow spin-lattice relaxation processes exist in Cladosporium cladosporioides. procesy relaksacji spin-sieć zachodzą w Cladosporium cladosporioides.

Słowa kluczowe: wolne rodniki, flucytozyna, melanina, Cladosporium cladosporioides, EPR [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 168-170]

#### Wstęp

Biopolimery melaninowe wykazują właściwości paramagnetyczne [1-2]. Grzyby glebowe Cladosporium cladosporioides zawierają eu- i feomelaninę [3]. Główną składową widma EPR Cl. cladosporioides jest lina eumelaniny [3]. Nasze wcześniejsze prace dotyczyły wpływu pH oraz jonów metali (Cu(II), Zn(II), Cd(II)) na właściwości centrów paramagnetycznych melaniny Cl. cladosporioides [4-6]. Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu flucytozyny na koncentrację i właściwości centrów paramagnetycznych Cladosporium cladosporioides. W pracy oceniono możliwość przyszłych zastosowań melaniny Cladosporium cladosporioides w kosmetologii.

#### Materiały i metody



RYS.1. Upigmentowane grzyby glebowe Cladosporium cladosporioides. FIG.1. Cladosporium cladosporioides pigmented

soil fungi.

W pracy przeprowadzono badania właściwości wolnych rodników występujących w grzybni Cladosporium cladosporioides (RYS.1). Po zakończeniu hodowli grzybnię Cladosporium cladosporioides kompleksowano z flucytozyną uzyskując kompleks 50µg flucytozyny/mg grzybni.

Flucytozyna to syntetyczny lek przewiwgrzybiczy (RYS.2). Jest to pochodna pirymidyny. Prowadzi ona do zablokowania syntezy białek w komórce grzyba. Flucytozyna zaburza także syntezę DNA. Działa hamująco na Candida, Cryptococcus, Aspergillus, Phialophora i Cladosporium.

Pomiary EPR wykonano za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X produkcji RADIOPAN (Poznań). Wyznaczono koncentrację centrów paramagnetycznych (N) oraz następujące parametry widm EPR: współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g, amplitudę (A) i szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR.

#### Wyniki i dyskusja

Dla grzybów glebowych Cladosporium cladosporioides oraz ich kompleksów z flucytozyną rejestrowano szerokie linie EPR o wartościach współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g charakterystycznych dla o-semichinonowych wolnych rodników. Parametry widm EPR oraz koncentracje wolnych rodników w badanych próbkach zamieszczono w TABELI 1. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) i szerokość (ΔB<sub>pp</sub>) linii EPR Cladosporium cladosporioides i ich kompleksów z flucytozyna porównano na RYSUNKACH 3-4. Flucytozyna powoduje wzrost koncentracji wolnych rodników w melaninie Cladosporium cladosporioides (TABELA 1). Wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g 2.0037 wskazują na obecność głównie o-semichinonowych wolnych rodników w testowanych próbkach. Wolne procesy relaksacji spin-sieć zachodzą w obydwu badanych próbkach (RYS.3). Flucyto-

#### Introduction

Melanin biopolymers reveal paramagnetic properties [1-2]. Soil fungi Cladosporium cladosporioides contain eui pheomelanin [3]. The main component of EPR spectrum of Cl. cladosporioides is the line of eumelanin [3]. Our earlier works described influence of pH and metal ions (Cu(II), Zn(II), Cd(II)) on properties of paramagnetic centers of Cl. cladosporioides melanin [4-6]. The aim of this work is to determine effect of flucytosine on concentration and properties of paramagnetic centers of Cladosporium cladosporioides. In this work the potential applications of melanin from Cladosporium cladosporioides in cosmetology were estimated.

#### Materials and methods



RYS.2. Struktura chemiczna flucytozyny [7]. FIG.2. Chemical structure of flucytosine [7].

In his work properties of free radicals existing in mycelium Cladosporium cladosporioides (FIG.1) were examined. Mycelium of Cladosporium cladosporioides was complexed with flucytosine and the complex of  $50\mu g$  flucytosine/mg mycelium was obtained. EPR spectra of dry samples were measured.

Flucytosine is a synthetic antifungal drug (FIG.2). It is the derivative of pyrimidine. This drug inhibits fungal protein synthesis. Flucytosine also inhibits fungal DNA synthesis. Flucytosine is active against Candida, Cryptococcus, Aspergillus, Phialophora and Cladosporium.

EPR measurements were done by the use of an X-band electron paramagnetic resonance spectrometer produced by RADIOPAN (Poznań). Free radicals concentration (N) and the following parameters of EPR spectra: g-factor, amplitude (A), and linewidth ( $\Delta B_{oo}$ ) of EPR lines, were determined.

#### Results and discussion

Broad EPR lines with g-factor characteristic for osemiquinone free radicals were measured for soil fungi Cladosporium cladosporioides and their complexes with

Próbka Sample	Nx10 <sup>18</sup> [spin/g]	ΔB <sub>pp</sub> [±0.02 mT]	g [±0.0002]
Cladosporium cladosporioides	0.6	0.37	2.0033
Cladosporium cladosporioides+ flucytozyna Cladosporium cladosporioides+ flucytosine	1.2	0.38	2.0035

TABELA 1. Koncentracja centrów paramagnetycznych (N), szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR oraz współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g badanych próbek.

TABLE 1. Free radicals concentration (N), linewidths  $(\Delta B_{pp})$  and g-factor of analysed samples.


RYS.3. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR Cladosporium cladosporioides oraz kompleksu Cladosporium cladosporioides z flucytozyną. M–moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.  $M_o$ -całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW).

FIG.3. Influence of microwave power (M/Mo) on amplitudes (A) of EPR lines of Cladosporium cladosporioides and Cladosporium cladosporioides complex with flucytosine. M-microwave power used during measurement of EPR spectra. M<sub>o</sub>-the highest microwave power produced by klystron (70mW).

zyna nie wpływa na oddziaływania magnetyczne spin-sieć (RYS.3) oraz spin-spin ( $\Delta B_{pp}$ : 0.37mT i 0.38mT, TABELA 1) w Cladosporium cladosporioides.

#### Podsumowanie

Rezultaty badań Cladosporium cladosporioides metodą EPR wskazują na udział centrów paramagnetycznych ich melaniny w wiązaniu flucytozyny. W wyniku oddziaływania melaniny z flucytozyną rośnie ilość wolnych rodników w próbce. Sugerowana jest możliwość zastosowania biopolimeru melaninowego zawartego w upigmentowanych grzybach Cladosporium cladosporioides w kosmetykach. Melanina ta może kumulować wybrane substancje czynne leczniczo.

# Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.



RYS.4. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość  $(\Delta B_{pp})$ linii EPR Cladosporium cladosporioides oraz kompleksu Cladosporium cladosporioides z flucytozyną. FIG.4. Influence of microwave power (M/M<sub>o</sub>) on linewidths ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines of Cladosporium cladosporioides and Cladosporium cladosporioides complex with flucytosine.

flucytosine. Parameters of EPR spectra and concentrations of free radicals in the studied samples are presented in TABLE 1. Influence of microwave power on amplitude (A) and linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines of Cladosporium cladosporioides and their complexes with flucytosine are compared in FIGURES 3-4.

Flucytosine causes increase of free radicals concentration in melanin of Cladosporium cladosporioides (TABLE 1). g-Values of 2.0037 indicate that o-semiquinone free radicals mainly exist in the tested samples. Slow spin-lattice relaxation processes appear in both the examined samples (FIG.3). Flucytosine does not effect magnetic spin-lattice (FIG.3) and spin-spin ( $\Delta B_{pp}$ : 0.37mT and 0.38mT, TABLE 1) interactions in Cladosporium cladosporioides.

# Conclusions

Results of EPR studies of Cladosporium cladosporioides indicate that paramagnetic centers of their melanin play an important role in bindning of flucytosine. The interaction of melanin with flucytosine increases the amount of free radicals in the sample. It is suggested that melanin contained in pigmented soil fungi Cladosporium cladosporioides can be applicated in cosmetics. This melanin may cumulate the pharmacologically active substances.

# Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

# Piśmiennictwo

[1] Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. Zagad Biof Współ 1981; 6: 201-219.

[2] Krzywda A, Petelenz E, Michalczyk D, Płonka PM. Sclerotia of the acellular (true) slime mould Fuligo septica as a model to study melanization and anabiosis. Cell Mol Biol Let 2008; 13: 130-143.
[3] Pilawa B, Buszman E, Latocha M, Wilczok T. EPR studies of melanin from Cladosporium cladosporioides. Pol J Med Phys Eng 1996; 2: 59-65.

[4] Pilawa B, Buszman E, Gondzik A, et al. Effect of pH on paramagnetic centers in Cladosporium cladopsorioides melanin. Acta Physica Pol A 2005, 108: 147-150. References

[5] Matuszczyk M, Buszman E, Pilawa B, Witoszyńska T, Wilczok T. Cd<sup>2+</sup> effect on free radicals in Cladosporium cladosporioides–melanin tested by EPR spectroscopy. Chem Phys Letters 2004; 394: 366-371.

[6] Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, et al. EPR examination of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> binding by pigmented soil fungi Cladosporium cladosporioides. Sci Total Environ 2006; 363: 195-205.

[7] Zejca A, Gorczyca M. Chemia leków. Warszawa: PZWL; 2004

• • • • • • • • • • • • • • • •

# PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI WOLNYCH RODNIKÓW W STREPTOMYCYNIE STERYLIZOWANEJ RADIACYJNIE I TERMICZNIE

Sławomir Wilczyński<sup>1\*</sup>, Paweł Ramos<sup>1</sup>, Barbara Pilawa<sup>1</sup>, Marta Ptaszkiewicz<sup>2</sup>, Jan Swakoń<sup>2</sup>, Paweł Olko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny, Śląski Uniwersytet Medyczny, Jedności 8, 41-200 Sosnowiec
<sup>2</sup>Zakład Fizyki Radiacyjnej i Dozymetrii, Instytut Fizyki Jądrowej PAN, Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków
\*MAILTO: swilczynski@sum.edu.pl

#### Streszczenie

Sterylność substancji leczniczej jest niezwykle istotna z punktu widzenia bezpieczeństwa farmakoterapii. Sterylizacja leków może powodować powstawanie wolnych rodników. Porównano właściwości wolnych rodników powstających pod wpływem promieniowania termicznego (180°C/30 minut) i promieniowania gamma (25kGy) w streptomycynie. Badania przeprowadzono przy użyciu techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR na pasmo X. Zarówno dla próbek sterylizowanych termicznie jak i radiacyjnie zarejestrowano szerokie linie EPR. Obydwie metody sterylizacji prowadza do powstania wysokich koncentracji wolnych rodników (1016-1018 spin/g). Porównanie parametrów linii EPR dla sterylizacji termicznej i radiacyjnej wskazuje na podobne właściwości wolnych rodników w sterylizowanej próbce – niesparowane elektrony zlokalizowane na atomie tlenu. Więcej wolnych rodników, w przypadku zastosowanych parametrów sterylizacji, powstaje w próbkach sterylizowanych radiacyjnie.

Słowa kluczowe: wolne rodniki, sterylizacja termiczna, sterylizacja radiacyjna, streptomycyna, EPR [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 171-173]

# Wstęp

W nowoczesnej medycynie opracowano i rozwinięto szereg metod sterylizacji substancji leczniczych, między innymi: wyżarzanie, spalanie, sterylizacja suchym gorącym powietrzem, sterylizacja nasyconą parą wodną, sterylizacja przez sączenie, sterylizacja promieniowaniem (m.in. jonizującym, UV), sterylizacja gazami (m.in. tlenkiem etylenu, formaldehydem) oraz sterylizacja roztworami środków chemicznych [1-5]. Wszystkie te metody mogą prowadzić do powstawania wolnych rodników w sterylizowanym materiale. Powstające wolne rodniki mogą powodować efekty toksyczne w organizmie pacjenta podczas farmakoterapii. W związku z powyższym idealnym warunkom sterylizacji powinna towarzyszyć jak najmniejsza koncentracja wolnych rodników w sterylizowanej substancji.

# Materiały i metody

Porównano właściwości wolnych rodników powstających w streptomycynie pod wpływem sterylizacji termicznej i radiacyjnej. Streptomycyna jest antybiotykiem aminoglikozy-

# COMPARISON OF FREE RADICALS PROPERTIES IN RADIOSTERILISED AND THERMAL STERILIZED STREPTOMYCIN

Sławomir Wilczyński<sup>1\*</sup>, Paweł Ramos<sup>1</sup>, Barbara Pilawa<sup>1</sup>, Marta Ptaszkiewicz<sup>2</sup>, Jan Swakoń<sup>2</sup>, Paweł Olko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, SCHOOL OF PHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND <sup>2</sup>DEPARTMENT OF RADIATION PHYSICS AND DOSIMETRY, INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS, 152 RADZIKOWSKIEGO STR., 31-342 CRACOV, POLAND \*MAILTO: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

# Abstract

Sterility of medical substances plays significant role from the point of view of pharmacotherapy safety. Drugs sterilization can cause free radicals forming. It was compared free radicals properties forming in streptomycin under the influence thermal radiation (180°C/30 minutes) and gamma radiation (25kGy). Presented studies were performed by use of X band electron paramagnetic spectrometer. Both for thermal sterilized samples as well as for radiosterilized broad EPR lines were recorded. Both methods of sterilization lead to forming of high concentrations of free radicals (10<sup>16</sup>–10<sup>18</sup>spin/g). Comparing of EPR lines parameters for thermal sterilization and radiosterilization point at similar free radicals properties in the studied samples - unpaired electrons located on oxygen atoms. More free radicals, in case of used sterilization parameters, create in radiosterilized samples.

Key words: free radicals, thermal sterilization, radiosterilization, streptomycin, EPR

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 171-173]

# Introduction

In modern medicine a lot sterilization methods of medicines were devised and developed inter alia: annealing, burning, dry hot air sterilization, saturated steam sterilization, sterile filtration, radiation sterilization (i.a. ionizing radiation, UV), gas sterilization (i.a. ethylene oxide, formaldehyde) and chemical sterilization [1-5]. All this methods can lead to free radicals appearing in sterilized material. These appearing free radicals can cause toxic effects in patients organism during pharmacotherapy. In connection with above mentioned facts, ideal sterilization conditions should be associated with minimal free radicals concentration in sterilized substance.

# Materials and methods

Free radicals creating in streptomycin under the influence of thermal and radiosterilisation were compared. Streptomycin the natural origin aminoglicoside antibiotic. In treatment its sulphate is the most common used. It acts bactericidal and its activity increase with its concentration. The most important application of streptomycin is tuberculosis healing. Chemical structure of streptomycin is presented on FIG.1.

Radiosterilisation was performer by gamma irradiation.

171



streptomycyny [8]. FIG.1. Chemical structure of streptomycin [8]. dowym pochodzenia naturalnego. W lecznictwie stosuje się najczęściej siarczan streptomycyny. Działa bakteriobójczo, a jej aktywność rośnie wraz ze stężeniem. Najważniejszym zastosowaniem streptomycyny jest leczenie gruźlicy [6,7]. Strukturę chemiczną streptomycyny przedstawiono na RYS.1.

Sterylizację radiacyjną próbki przeprowadzono przez gamma napromie-

niowanie. Próbki zostały napromieniowane przy użyciu aparatu kobaltowego THERATRON 780E zawierającego izotop kobaltu <sup>60</sup>Co. Zgodnie z normą PN-EN 552 [9] dawka promieniowania pochłonięta przez wszystkie badane antybiotyki wynosiła 25kGy. Przed napromieniowaniem próbki poddano tabletkowaniu.

W niniejszej pracy sterylizacja wysokotemperaturowa antybiotyków wykonywana została w temperaturze 180°C oraz w czasie ogrzewania leku wynoszącym 30 minut [10]. Sterylizację sproszkowanej próbki przeprowadzono w suszarce z wymuszoną cyrkulacją suchego powietrza.

Widma EPR rejestrowano w temperaturze pokojowej. Pomiary widm EPR badanych antybiotyków wykonano za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego typu SE/X z modulacją pola magnetycznego 100kHz (RADIOPAN, Poznań). Zastosowano promieniowanie mikrofalowe z zakresu pasma X o częstotliwości 9.3GHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem typu MCM 101 (EPRAD, Poznań)

Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji. Zastosowano promieniowanie mikrofalowe o mocy wynoszącej 2mW. Całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron wynosiła 70mW.

W pracy wyznaczono i analizowano następujące parametry widm EPR (TABELA 1):

koncentrację wolnych rodników (N),

szerokość linii (ΔB<sub>pp</sub>),

· współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g.

#### Wyniki

Zarówno promieniowanie jonizujące w zastosowanej dawce jak i energia termiczna powoduje powstawanie wolnych rodników w streptomycynie. W TABELI 1 przedstawiono parametry widm EPR i koncentracje wolnych rodników dla badanych próbek.

W streptomycynie zarówno sterylizowanej termicznie jak i radiacyjnie występuje duża ilość wolnych rodników (~10<sup>16</sup>-10<sup>18</sup>spin/g). Większe koncentracje centrów paramagnetycznych stwierdzono dla próbek sterylizowanych metodą radiacyjną. Duże wartości szerokości linii EPR ( $\Delta B_{pp}$ : 1.00 i 1.86 mT) wskazują na niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami w próbkach. Wyznaczone średnie wartości współczynnika g dla zarejestrowanych widm EPR pozwoliły na dokonanie oceny rodzaju wolnych rodników głównie występujących w badanych próbkach. Współczynnik g wskazuje na lokalizację niesparowanych elektronów (g: 2.0044 i 2.0053) na atomach tlenu.

Próbka	Ν	$\Delta B_{pp}$	g
Sample	[spin/g]	[mT]	[±0.0002]
Streptomycynasterylizowa- na radiacyjnie Gamma irradiated strep- tomycin	5.1 · 10 <sup>18</sup>	1.00	2.0053
Streptomycyna sterylizowa- na termicznie Thermal sterilized strepto- mycin	4.0 · 10 <sup>16</sup>	1.86	2.0044

TABELA 1. Koncentracja (N) wolnych rodników w sterylizowanym antybiotyku oraz parametry widm EPR: szerokość linii ( $\Delta B_{pp}$ ) i współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g. Dane dotyczą widm EPR rejestrowanych przy mocy mikrofalowej 2mW w dniu napromieniowania próbki.

TABLE 1. Free radicals concentration (N) in the sterilized antibiotic and EPR spectra parameters: linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) and g factor. Presented data are applied for 2mW microwave power in the day of sample irradiation.

Samples were irradiated in THERATRON 780E containing isotope <sup>60</sup>Co. According to the norm of PN-EN 552 [2] dose of gamma irradiation of 25kGy was used. Before irradiation samples were tableted.

The EPR spectra were recorded at room temperature. The EPR spectra of investigated samples were recorded by electron paramagnetic spectrometer SE/X type with field modulation of 100kHz (RADIOPAN, Poznań). Microwave radiation from X band (9.3GHz) were applied. Frequency of microwave radiation were recorded by use of MCM 101 measurer (EPRAD, Poznań).

EPR spectra were recorded as the second derivative of absorption. Microwave radiation with power attenuation of 2mW were used. The total microwave power produced by klistron was 70mW.

The following parameters of EPR spectra were determined and analyzed (TABLE 1):

free radicals concentration (N),

- linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ),
- g factor.

#### Results

Both ionizing radiation at the used dose as well as thermal energy cause free radicals appearing in streptomycin. In the table 1 it was presented EPR spectra parameters and free radicals concentrations.

Both in thermal sterilized streptomycin as well as in radiosterilized streptomycin high amount of free radicals (10<sup>16</sup>–10<sup>18</sup>spin/g) are found. Higher paramagnetic centers concentrations were stated for radiosterilized samples. Broad EPR lines ( $\Delta B_{pp}$ : 1.00 i 1.86 mT) point at short distance between free radicals. Average values of g factors for recorded EPR spectra allow to estimate type of free radicals existing in the studied samples. g factor (g=2.0044 and 2.0053) indicates that unpaired electrons are located on oxygen atoms.

172

# Wnioski

• Zarówno promieniowanie gamma jak i promieniowanie termiczne powodują powstawanie wolnych rodników (~10<sup>16</sup> -10<sup>18</sup>spin/g) w streptomycynie.

• Silne oddziaływania dipolowe spin-spin poszerzające rejestrowane linie EPR wskazują na niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami w badanych próbkach

 Zarówno sterylizacja termiczna jak i radiacyjna powodują powstawanie podobnych wolnych rodników – z niesparowanym elektronem zlokalizowanym na atomie tlenu o czym świadczy porównywalna wartość współczynnika g.

# Piśmiennictwo

[1] Basly JP, Longy I, Bernard M. ESR identification of radiosterilized pharmaceuticals: latamoxef and ceftriaxone. Int J Pharm1997; 158: 241 – 245.

[2] Basly JP, Basly I, Bernard M. ESR spectroscopy applied to the study of pharmaceuticals radiosterylization: cefoperazone. J Pharm Biomed Anal 1998; 17: 871 – 875.

[3] Basly JP, Basly I, Bernard M. Influence of radiation treatment on doubutamine. Int J Pharm 1998; 170: 265 – 269.

[4] Gibella M, Crucq AS, Tilquin B, Stocker P, Lesgards G, Raffi J. Electron spin resonance of some irradiated pharmaceuticals. Radiat Phys Chem 2000; 58: 69 – 76.

[5] Varshney L, Dodke PB. Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization. Radiat Phys Chem 2004; 71: 1103 – 1111.

. . . . . . . .

# Conclusions

• Both gamma radiation as well as thermal radiation cause formation of free radicals (10<sup>16</sup>–10<sup>18</sup>spin/g) in streptomycin.

• Strong dipole spin-spin interactions broadening the EPR lines point at short distance between free radicals in the studied sample.

• Both thermal sterilization as well as radiation sterilization cause formation of similar free radicals – with unpaired electron localized on oxygen atoms what testify to comparable g factor values.

# References

[6] Janiec W, red. Kompendium farmakologii. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2001.

[7] Dzierżanowska D. Antybiotykoterapia praktyczna. Warszawa: Wydawnictwo  $\alpha$ -press; 2000.

[8] Zejc A, Gorczyca M, red. Chemia leków. Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2002

[9] PN-EN 552. Sterylizacja wyrobów medycznych. Walidacja i rutynowa kontrola sterylizacji metodą napromieniowania. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny; 1999.

[10] Farmakopea polska, wydanie VII. Warszawa 2006.

# PARAMAGNETYZM UPIGMENTOWANYCH GRZYBÓW GLEBOWYCH CLADOSPORIUM HERBARUM

Magdalena Zdybel<sup>1\*</sup>, Barbara Pilawa<sup>1</sup>, Ewa Buszman<sup>2</sup>, Teresa Witoszyńska<sup>2</sup>, Beata Brotoń<sup>1</sup>

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny Z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej:

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofizyki, ul.Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, Polska <sup>2</sup>Katedra i Zakład Chemii i Analizy Leków, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, Polska \*MAILTO: mzdybel@sum.edu.pl

# Streszczenie

Zbadano właściwości centrów paramagnetycznych upigmentowanych grzybów glebowych Cladosporium herbarum metodą EPR. Stwierdzono stabilny paramagnetyzm Cladosporium herbarum wynikający z obecności w próbce głównie eumelaniny. W widmach EPR obserwowano dominującą linię eumelaniny oraz dodatkowo linię feomelaniny o niewielkiej amplitudzie. o-Semichinonowe wolne rodniki (~10<sup>17</sup>spin/g) odpowiadają za paramagnetyzm Cladosporium herbarum.

Słowa kluczowe: paramagnetyzm, wolne rodniki, melanina, Cladosporium herbarum, EPR [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 173-175]

# PARAMAGNETISM OF PIGMENTED SOIL FUNGI CLADOSPORIUM HERBARUM

Magdalena Zdybel<sup>1\*</sup>, Barbara Pilawa<sup>1</sup>, Ewa Buszman<sup>2</sup>, Teresa Witoszyńska<sup>2</sup>, Beata Brotoń<sup>1</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE: SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE, <sup>1</sup>DPARTMENT OF BIOPHYSICS, 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND <sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, 4 JAGIELLOŃSKA STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND \*MAILTO: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

# Abstract

Properties of paramagnetic centers in pigmented soil fungi Cladosporium herbarum were studied by EPR method. Stable parmagnetism of Cladosporium herbarum, mainly resulted from existence of eumelanin in the sample, was stated. Dominant line of eumelanin and additionally line of pheomelanin with the low amplitude were observed in EPR spectra. o-Semiquinone free radicals (~10<sup>17</sup>spin/g) are mainly responsible for paramgnetism of Cladosporium herbarum.

Keywords: paramagnetism, free radicals, melanin, Cladosporium herbarum, EPR

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 173-175]



Cladosporium herbarum to grzyby glebowe zawierające biopolimery melaninowe [1]. Melaniny wykorzystywane są w produktach kosmetycznych [2]. Cladosporium herbarum może więc stanowić źródło melaniny dla przemysłu kosmetycznego. Jednakże ze względu na dużą zawartość wolnych rodników [3-7] melaniny mogą powodować efekty toksyczne w tkankach [7]. Z literatury naukowej znane są właściwości paramagnetyczne melaniny pozyskiwanej z Sepia officinalis, wykorzystywanej w kosmetykach [8]. Celem niniejszej pracy jest określenie koncentracji i właściwości centrów paramagnetycznych występujących w Cladosporium herbarum.

# Materiały i metody

W pracy badaniom poddano upigmentowane grzyby glebowe Cladosporium herbarum oraz modelową eumelaninę – DOPA-melaninę. Syntetyczną DOPA-melaninę otrzymano metodą opisaną przez Binnsa i wsp. [9]. Suche próbki w postaci proszkowej umieszczono w szklanych rurkach pomiarowych. Pomiary widm wykonano z wykorzystaniem spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3GHz) Firmy RADIOPAN (Poznań, Polska). Widma EPR rejestrowano w zakresie mocy mikrofalowych 0.7-70 mW. Analizowano współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g, intensywność integralną (I) oraz szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR. Wyznaczono koncentrację wolnych rodników w próbkach. Jako wzorzec koncentracji wolnych rodników zastosowano ultramarynę.

# Wyniki i dyskusja

Dla Cladosporium herbarum rejestrowano silne sygnały EPR (RYS.1). Widma EPR Cladosporium herbarum stanowiły superpozycję linii eumelaniny oraz linii feomelaniny. Główną składową widma EPR Cladosporium herbarum jest linia eumelaniny. Widmo modelowej eumelaniny – DOPAmelaniny pokazano na RYSUNKU 2. Widmo EPR feomelaniny jest złożone i wykazuje nierozdzieloną strukturę nadsubtelną [6]. Występowanie linii feomelaniny w widmie EPR

10dB i 5dB.

Introduction

Cladosporium herbarum are soil fungi, which contain melanin biopolymers [1]. Melanins are used in cosmetics [2]. Cladosporium cladosporioides may be the source of melanin for cosmetic industry. However taking in to account high free radicals content [3-7], melanin may be responsible for toxic effects in tissues [7]. Paramagnetic properties of melanin from Sepia officinalis, which is added to cosmetics, are known from the literature [8]. The aim of this work is to determine of concentration and properties of paramagnetic centers of Cladosporium herbarum.

# Materials and methods

In the present work pigmented soil fungi Cladosporium herbarum and model eumelanin – DOPA-melanin were studied. DOPA-melanin was synthetized according to the Binn's method [9]. Dry powdered samples were put into the glass tubes and EPR spectra were recorded. Measurements of spectra were performed by the use of electron paramagnetic resonance spectrometer at X-band (9.3GHz) produced by RADIOPAN (Poznań, Poland). EPR spectra were measured with microwave in the range of 0.7-70mW. g-Factor, integral intensity (I), and linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines were analysed. Concentrations of free radicals in the samples were determined. Ultramarine was the reference for concentration.

# **Results and discussion**

Strong EPR signals were observed in spectra of Cladosporium herbarum (FIG.1). EPR spectra of Cladosporium herbarum were superposition of eumelanin and pheomelanin. EPR line of eumelanin dominates in spectra of Cladosporium herbarum. EPR spectrum of DOPA-melanin is presented in FIGURE 2. EPR spectrum of pheomelanin has complex line with unresolved hyperfine structure [6]. Pheomelanin component became more visible in EPR spectrum recorded at lower attenuation (FIG.1).

o-Semiquinone free radicals with characteristic g-factor of 2.0037 exist in

Cladosporium herbarum jest wyraźniej widoczne dla krzywych rejestrowanych przy mniejszym tłumieniu (RYS.1).

W Cladosporium herbarum występują o-semichinonowe wolne rodniki o charakterystyczpym współczymi

charakterystycznym współczynniku rozszczepiania

spektroskopowego g wynoszącym 2.0037. Koncentracja wolnych rodników w Cladosporium herbarum wynosi 4.7x10<sup>17</sup>spin/g. Szerokość linii EPR badanej próbki dla mocy mikrofalowej 0.7mW wynosi 0.37mT. Poszerzenie linii EPR może wynikać z oddziaływań dipolowych pomiędzy niesparowanymi elektronami wolnych rodników.

Wpływ mocy mikrofalowej na intensywność integralną i szerokość linii EPR Cladosporium herbarum przedstawiono



RYS.2. Widmo EPR DOPA-melaniny zarejestrowane przy tłumieniu wynoszącym 10dB.

FIG.2. EPR spectrum of DOPA-melanin recorded at attenuation of 10dB. barum. Concentration of free radicals in Cladosporium herbarum is 4.7x10<sup>17</sup>spin/g. Linewidth of EPR lines of the studied sample for microwave power of 0.7mW is equal to 0.37mT. Broadening of EPR line may result from

Cladosporium her-

dipolar interactions between unpaired electrons of free radicals.

Influences of microwave power on integral intensity and linewidth of EPR lines of Cladosporium herbarum are presented in FIGURES 3 and 5, and corresponding correlations for DOPAmelanin show FIGURES 4, 5. EPR lines of Cladosporium herbarum saturate at low microwave power (FIG.3), similar to EPR lines of DOPA-melanin (FIG.4). It indicates that slow spin-lattice relaxation





RYS.3. Wpływ mocy mikrofalowej na intensywność integralną (I) linii EPR Cladosporium herbarum. FIG.3. Influence of microwave power on integral intensity (I) of EPR lines of Cladosporium herbarum.

na RYSUNKACH 3 i 5, a odpowiednie zależności dla DOPA-melaniny pokazuja rysunki 4, 5. Linie EPR Cladosporium herbarum nasycają się dla niskich mocy mikrofalowych (RYS.3), podobnie jak linie EPR DOPA-melaniny (RYS. 4). Wskazuje to na wolne procesy relaksacji spin-sieć w melaninie występującej w Cladosporium herbarum oraz w DOPAmelaninie. Zmiany intensywności integralnej i szerokości widm EPR Cladosporium herbarum i DOPAmelaniny (Rys. 3-5) wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej wskazują na jednorodne poszerzenie ich linii rezonansowych.

#### Podsumowanie

Badania Cladosporium herbarum z zastosowaniem spektroskopii EPR wykazały silny para-

magnetyzm oraz dużą zawartość eumelaniny w grzybach glebowych. Cladosporium herbarum można więc zaproponować jako źródło melaniny wykorzystywane w produkcji substancji kosmetycznych.

# Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

## Piśmiennictwo

[1] Martini H, Weidenbörner M, Adams S, Kunz B. Increased antifungal activity of 3- and 7-hydroxyflavone against Cladosporium herbarum and Penicillium glabrum through ester formation. Mycoll Res 1997; 101: 920-922

[2] Gibka J. Wykorzystanie melaniny i procesu melanogenezy w kosmetyce. Pol J Cosmetol 2000; 3: 164-176.

[3] Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. Zagad Biof Współ 1981; 6: 201-219.

[4] Pilawa B, Buszman E, Latocha M, Wilczok T. EPR studies of melanin from Cladosporium cladosporioides. Pol J Med Phys Eng 1996; 2: 59-65.

[5] Matuszczyk M, Buszman E, Pilawa B, Witoszyńska T, Wilczok T. Cd<sup>2+</sup> effect on free radicals in Cladosporium cladosporioides–melanin tested by EPR spectroscopy. Chem Phys Letters 2004; 394: 366-371. RYS.4. Wpływ mocy mikrofalowej na intensywność integralną (I) linii EPR DOPA-melaniny. FIG. 4. Influence of microwave power on integral intensity (I) of EPR lines of DOPA-melanin



RYS.5. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokosc (ΔB<sub>pp</sub>) linii EPR DOPA-melaniny oraz Cladosporium herbarum. M–moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR. M<sub>o</sub>–całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW). FIG.5. Influence of microwave power on linewidths (ΔB<sub>pp</sub>) of EPR lines of DOPA-melanin and Cladosporium herbarum. M–microwave power used during measurement of EPR spectra. M<sub>o</sub>–the highest microwave power produced by klystron (70mW).

processes exist in Cladosporium herbarum and DOPAmelanin. Changes of integral intensity and linewidth of EPR spectra of Cladosporium herbarum and DOPA-melanin (FIG.3-5) with increasing of microwave power point out that these resonance lines are homogeneously broadened.

## Conclusions

EPR spectroscopic studies of Cladosporium herbarum pointed

out strong paramagnetism and high content of eumelanin in these soil fungi. Cladosporium herbarum may be proposed as source of melanin for cosmetic substances.

# Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

#### References

[6] Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, et al. EPR examination of Zn2+ and Cu2+ binding by pigmented soil fungi Cladosporium cladosporioides. Sci Total Environ 2006; 363: 195-205.
[7] Hegedus ZL. The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. Toxicology 2000; 145: 85-101.

[8] Chodurek E, Czyżyk D, Pilawa B, Wilczyński S. EPR studies of paramagnetic centers in melanin from Sepia officinalis. Engineering of Biomaterials 2009; 86:28-32.

[9] Binns F, Chapman RF, Robson NC, Swan GA, Waggot A. Studies related to the chemistry of melanins. Part VIII. The pyrrolecarboxylic acids formed by oxidation or hydrolysis of melanin derived from 3,4-dihydroxyphenethylamine or 3,4-dihydroxyphenylalanine. J Chem Soc C 1970: 1128-1134.

• • • • • • • • • • • • • • • • • •

# 175

176

# ANALIZA WYTRZYMAŁOŚCIOWA I ODKSZTAŁCENIOWA BIOMA-TERIAŁÓW GRADIENTOWYCH PRZEZNACZONYCH NA IMPLANTY

KATARZYNA MIGACZ\*, JAN CHŁOPEK

Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów \*MAILTO: katarzynamigacz@tlen.pl

## Streszczenie

W pracy autorzy przedstawiają analizę wytrzymałościową i odkształceniową kompozytów gradientowych z kontrolowaną zmianą modułu Younga w warunkach symulowanego środowiska biologicznego.

Zaprojektowane przy pomocy MES pięciowarstwowe kompozyty z PSU/CF 1D z gradientem otrzymanym poprzez zmianę udziału procentowego włókien (10, 15, 20, 30, 40%) po wstępnych testach wytrzymałościowych i odkształceniowych zostały umieszczone w płynie Ringera pod działaniem stałego obciążenia siłą P=1200N przez okres 56 dni. Co 14 dni wykonywano pomiary ultradźwiękowe, po okresie inkubacji próbki poddano badaniom wytrzymałościowym do 5000 N.

Wyniki pomiarów wykazują przydatność materiału gradientowego PSU/CF 1D jako implantów dokręgosłupowych ze względu na ich dobrze dopasowany moduł Younga i odkształcalność do naturalnego krążka międzykręgowego człowieka.

W kolejnym etapie badań zostanie wykonana analiza zmęczeniowa materiałów w celu określenia ich trwałości.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 176-179]

# Wstęp

Projektując materiały przeznaczone do celów implantacyjnych jest konieczne, aby uwzględnić ich przebywanie pod działaniem podwyższonych naprężeń w agresywnym środowisku płynów ustrojowych, a także ich biozgodność. Materiałami takimi mogą być polisulfon (PSU) i włókna węglowe niskomodułowe (CF), dla których dotychczasowe badania potwierdzają inertność PSU w środowisku biologicznym i wysoką biozgodność CF [1,2], dlatego też zastosowano je w niniejszej pracy.

Gradient w budowie materiałów, w szczególności do zastosowań medycznych, ma na celu dostosowanie właściwości materiału (moduł Younga, odkształcenie, wytrzymałość) do właściwości naturalnej tkanki kostnej. Wytrzymałość odcinka szyjnego na obciążenie osiowe - rozumiana jako zdolność do przenoszenia obciążeń bez zniszczenia [3], występuje przy sile 113kG [4], co wynosi ok. 1110N.

W pracy przedstawiono wyniki badań ultradźwiękowych i wytrzymałościowych w funkcji czasu inkubacji dla materiału z gradientem otrzymanym poprzez zmianę udziału objętościowego włókien.

Ponieważ krążki międzykręgowe są cały czas poddawane głównie obciążeniu ściskającemu w otoczeniu płynów ustrojowych, autorzy zasymulowali naturalne warunki stałego obciążenia siłą P=1200N.

# STRENGTH AND STRAIN ANALYSIS OF GRADIENT BIOMATERIALS ASSIGNED FOR MEDICAL IMPLANTS

KATARZYNA MIGACZ\*, JAN CHŁOPEK

University of Science and Technology, Faculty of Materials Engineering and Ceramics, Department of Biomaterials,

\*MAILTO: KATARZYNAMIGACZ@TLEN.PL

# Abstract

In this article strength and strain analysis of gradient composites with controlled change of Young's modulus in simulated biological environment was presented.

Polysulfon/carbon fibers (PSU/CF) 1D composites with gradient of the content of PSU to CF (10, 15, 20, 30, 40 wt% of CF), built up of 5 layers were designed by using FEM. After preliminary strength and strain tests they were incubated in Ringer's under the static load P=1200 N solution for 56 days.

Ultrasonic measurements were made every 14 days. After incubation samples mechanical strength was tested with the load up to 5000 N.

The obtained results show suitability of PSU/CF 1D gradient material for spine implants because of well – matched Young's modulus and deformability to natural human intervertebral disc. As a next step of the research fatigue testing analysis will be done, in order to obtain materials' durability.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 176-179]

# Introduction

Designing materials for implant applications is necessary to take into account their staying in increased stresses and aggressive environment of body fluids, and their biocompatibility. The proper material for spine implants can be PSU modified with low-modulus carbon fibers. Recent investigations proved inertness of PSU in biological environment as well as high biocompatibility of carbon fibers [1,2].

Gradient in materials' structure, especially those for medical use, helps to make material's properties (Young's modulus, strain, strength) similar to natural bone tissue. Mechanical strength of cervical spine upon axial load – understanded as ability to hold out loads without destruction [3] - is 113kG load [4], or 1110N.

In this work the results of ultrasonic and mechanical tests for PSU/CF gradient composites in function of incubation time were presented. The gradient composites were obtained by change of volume fraction of fibers in PSU matrix.

Because intervertebral discs are subjected mainly to compression in the surroundings of body liquids, the authors made a simulation of the biological conditions putting the load of P=1200N on the material immersed in Ringer's solution.

# Materials and methods

Designing of biomaterials was carried out by use of Nei-Nastran modeling program for Windows, which made used

## Materialy i metody

Do zaprojektowania biomateriałów wykorzystano program NeiNastran for Windows, wykorzystujący metodę elementów skończonych (MES) [5].

Wykonano próbki materiałów z gradientem modułu Younga, o kształcie sześcianów o boku 10mm. Gradient został uzyskany poprzez zmianę udziału objętościowego włókien w kompozycie: 10, 15, 20, 30, 40%.

Materiały do badań zostały wykonane metodą preimpregnatu z PSU o masie cząsteczkowej M=22000 wzmocnionego włóknem węglowym długim (CF 1D) firmy Torayca T-300, o właściwościach: E=230GPa, σ<sub>r</sub>=3,53 GPa, d=1,76 /cm<sup>3</sup>.

Próbki po wstępnych testach wytrzymałościowych poddano działaniu stałego obciążenia siłą P=1200N w warunkach in vitro przez okres 56 dni. Do symulacji środowiska naturalnego użyto płynu Ringera. Na badanych materiałach wykonywano pomiary ultradźwiękowe w Pracowni Badań Ultradźwiękowych i Mikroskopowych WIMiC AGH co 14 dni w trzech kierunkach, dla każdej z warstw (WYKRESY 1–3). Po okresie przetrzymywania próbek w płynie Ringera wykonano próbę ściskania osiowego do 5000N przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Zwick 1435 o zakresie pomiarowym do 5000N.

#### Wyniki i dyskusja

Wstępne testy wytrzymałościowe wykazały, że granica plastyczności dla badanych materiałów jest osiągana przy działaniu siły P=9500±1414,21N. Dla porównania, pęknięcie elementu kostnego w badanym segmencie preparatu sekcyjnego występuje przy najwyższej sile P=8300N [3] Stąd widać, że materiał gradientowy wykonany z PSU/CF 1D przenosi wyższe wartości obciążeń, niż obciążenia niszczące segmenty ruchowe kręgosłupa przebadane przez różnych autorów, a cytowane w pracy prof. Będzińskiego [3].

Odkształcenie badanych próbek przed i po inkubacji nie uległo zmianie i wyniosło odpowiednio:  $\varepsilon_w$ =8,1±0,8%,  $\epsilon_i{=}7,1{\pm}0,6\%,~gdzie~\epsilon_{w}{\text{-}}$  odkształcenie wyjściowe próbek,  $\epsilon_{i^{-}}$  odkształcenie próbek po 56 dniach inkubacji. Różnice pomiędzy wynikami odkształceń mieszczą się w granicach błędu pomiaru. Otrzymane wartości odkształceń mieszof finite element method FEM. [5] Samples with gradient of Young's modulus having the shape of cube with 10 mm side dimensions were made. Gradient was obtained by change of volume fraction of fibers in the composite: 10, 15, 20, 30, 40%.

Materials to investigation were made by prepreg's method from PSU (mol wt M=22000) reinforced with one dimensional carbon fibers (CF 1D) manufactured by Torayca T - 300, CF properties: E=230GPa, or=3,53GPa, d=1,76 g/cm3.

After preliminary mechanical tests samples were immersed in Ringer's solution and exposed on static loads of P=1200 for 56 days. To simulate natural environment Ringer's fluid was used. Ultrasonic measurements were made in Laboratory of Ultrasonic and Microscopy Measurements in AGH, Faculty of Materials Science and Ceramics, every 14 days for each layer and in three directions, (FIG.1-3). When the incubation in Ringer's fluid was finished, axial compression test was done with the loads up to 5000N.

#### Results and discussion

Preliminary mechanical tests show that the yield point of investigated materials is reached at loads of P=9500±1414,21N. To compare, cracking of bone in investigated spine segment occurred at the highest force P=8300 N [3]. Therefore, it can be seen that gradient material made from PSU/CF 1D carry higher loads than spine segment (quoted in prof. Będziński's work [3]).

The deformation of the investigated samples before and after incubation was similar, namely:  $\varepsilon_{w}$ =8,1±0,8%,  $\epsilon_i$ =7,1±0,6%, where  $\epsilon_{ii}$ - the deformation before incubation,  $\epsilon_{i-}$  the deformation after 56 incubation days. Variations between strain's results are in the limits of error. Obtained values of strains are in the range of values which limit unit elongation obtained for fresh intervertebral disc [3], which is 7,1±3,6%.

Maximal displacements of intervertebral disc at maximum compressive force are in range 1-2mm [3], and the displacement for investigated material is 0,81±0,08mm. It allows us to conclude that PSU/CF 1D is the material, which deformation characteristic is well-matched to this of intervertebral disc.

Ultrasonic measurements were made for investigated

czą się w przedziale własności granicznego wydłużenia względnego otrzymanych dla świeżego krążka międzykręgowego [3], tj. 7,1±3,6%.

Przemieszczenia maksymalne krążka przy maksymalnej sile ściskającej wynoszą 1-2mm [4], dla badanego materiału wartość przemieszczenia wynosi 0,81±0,08mm. Pozwala to na wnioskowanie, że PSU/CF 1D jest materiałem, którego charakterystyka odkształceniowa jest dopasowana do charakterystyki odkształceniowej krążka międzykregowego.

Dla badanych materiałów wykonywano pomiary ultradźwiękowe, z których widać wyraźnie, że prędkości przechodzenia fali ultradźwiękowej nie uległy zmianom - różnice pomiędzy nimi mieszczą się w



WYKRES 1. Prędkości przejścia fali ultradźwiękowej w próbkach dla każdej z warstw w kierunku "c" (kierunek ułożenia włókien).

FIG.1. Ultrasonic waves velocity in samples for every layer in "c" direction (direction parallel to fibers).



177

178



materials. They show, that wave velocities do not change much – variations in the results are in the limits of error, (see FIG.1–3).

Samples' density is not changed, before incubation density was  $dw=1,26\pm0,02$ g/cm<sup>3</sup>, after 56 days of incubation i=1,25±0,01g/cm<sup>3</sup>. There from derive that material's microstructure after 56 days of incubation was not changed (FIG.4).

For investigated samples by axial compression output E was E=0,53±0,03 GPa. Measured quantity of Young's modulus during axial compression after 56 days incubated in in vitro conditions during static load was E=0,50±0,04 GPa (FIG.5). Decreased value of Young's modulus by 5,7%

is contained in

modulus for fi-

broform ring of

intervertebral

disc are in yield

0,25-0,9GPa,

for limit plate

0,5-1GPa, for

neural arch

0,5-1,5GPa

[4]. For the

comparison

this values

with obtained

Young's mod-

ulus values

of measured

materials, it is

observing, that

Young's

limit of error.

WYKRES 2. Prędkości przejścia fali ultradźwiękowej w próbkach dla każdej z warstw w kierunku "b" (kierunek prostopadły do ułożenia włókien).

FIG.2. Ultrasonic waves velocity in samples for every layer in "b" direction (perpendicular to fibers).

granicach błędu pomiaru, co widać na WYKRESACH 1–3.

Brak istotnych zmian wykazano także przy określaniu gęstości próbek, przed inkubacją gęstość wyniosła dw=1,26±0,02 g/cm3, po 56 dniach inkubacji di=1,25±0,01 g/cm<sup>3</sup>. Z tego wynika, że mikrostruktura materiału po 56 – dniowej inkubacji nie uległa zmianie (WYKRES 4).

Dla badanych próbek przy ściskaniu osiowym wyjściowa wartość E wyniosła E=0,53±0,03 GPa. Mierzona wartość modułu Younga podczas

ściskania osiowego po 56 dniach przetrzymywania próbek w warunkach in vitro pod stałym obciążeniem, wyniosła: E=0,50±0,04

GPa (WYKRES 5). Spadek wartości modułu o 5,7% mieści się w granicach błędu pomiaru.

Wartości modułu Younga dla pierścienia włóknistego krążka międzykręgowego wynoszą od 0,25–0,9GPa, dla płytki granicznej 0,5–1GPa, dla łuku kręgowego 0,5–1,5GPa [3]. Zatem porównując te wartości z otrzymanymi wartościami modułu Younga badanych materiałów obserwuje się, że materiały badane spełniają kryterium dopasowania modu-



WYKRES 3. Prędkości przejścia fali ultradźwiękowej w próbkach w kierunku "a" (kierunek prasowania).

FIG.3. Ultrasonic waves velocity in samples in "a" direction (direction of pressing).

materials fulfill a condition of matching





ш

łu Younga do pierścienia włóknistego krażka miedzykręgowego.

#### Wnioski

Zaprojektowa ny i wykonany z PSU/CF 1D materiał gradientowy przenosi wyższe wartości obciążeń, niż maksymalne obciążenie niszczące segmenty ruchowe kręgosłupa zbadane przez kilku różnych autorów, a cytowane w pracy prof. Będzińskiego [3].



WYKRES 5. Charakterystyka odkształceniowa badanych próbek. FIG.5. Strain's characteristic of investigated samples.

Przedział własności granicznego wydłużenia względnego uzyskany dla świeżego krążka międzykręgowego wynosi 7,1±3,6% [3], dla zbadanego materiału wartości odkształcenia mieszczą się w tym przedziale.

Przemieszczenie otrzymane dla kompozytu gradientowego wynosi 0,81±0,08mm, co stanowi wartość porównywalną do przemieszczeń naturalnego krążka międzykręgowego (przy P=max przemieszczenie krążka zawiera się w granicach 1-2mm [4]).

Wyniki pomiarów ultradźwiękowych i określenie gęstości po 56 dniach inkubacji w symulowanym środowisku biologicznym pod działaniem stałego obciążenia nie wykazują zmian mikrostrukturalnych materiału, co świadczy o jego podwyższonej wytrzymałości i odporności na działanie agresywnego środowiska płynów ustrojowych.

Niezbedne jest w dalszej kolejności określenie granicy wytrzymałości zmęczeniowej materiału, w celu dokładnego określenia jego czasu życia.

#### Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Nr 0408/R/2/T02/06/01, ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

tained for fresh intervertebral disc is 7,1±3,6% [3]. Values obtained for the investigated material are in the same range.

Deformation obtained in gradient composite is 0,81±0,08 mm, which is comparable with displacements in natural intervertebral disc (1-2mm at P=max [4]).

The results of ultrasonic measurements, and density after 56 days of incubation in simulated biological environment under static load do not cause changes in the microstructure. It is the result of increase of strength and resistance to aggressive environment of body fluids.

It is necessary to define limit of fatigue strength of the

#### Acknowledgements

This research was financially supported by the by the Ministry of Science and Higher Education (research project No 0408/R/2/T02/06/01).

## Piśmiennictwo

[1] J. Chłopek, K. Migacz, P. Rosół, Wytrzymałość długotrwała kompozytów polimerowych stosowanych na implanty, Przegląd Lekarski nr 61, Wydanie specjalne s. 18 - 20; Inżynieria medyczna, 2004 (18-20).

[2] J. Chłopek, P. Rosół, A. Morawska, Durability of polymers - ceramic composite implants determined in creep tests, Composites Science and Technology. 2006 vol. 66 s. 1615–1622.

#### References

[3] R. Będziński, Biomechanika inżynierska, zagadnienia wybrane, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997. [4] Tylman D. Patomechanika bocznych skrzywień kręgosłupa, Warszawa 1972r

[5] K. Migacz, J. Chłopek, Projektowanie biomateriałów gradientowych o założonych modułach Younga i ich analiza eksperymentalna, Inż. Biomat. 2008, 12-15.

179

Young's modulus with fibroform ring of intervertebral disc.

#### Conclusions

Designed 1D gradient composites were made from PSU/CF. They carry higher loads than maximum loads braking spine segment observed by other authors, quoted in prof. Będziński's work [3].

The range of values of relative elongation ob-

material, in order to estimate its lifetime.

180

# OCENA WYBRANYCH CECH WŁÓKNINOWYCH OBŁOŻEŃ CHIRURGICZNYCH

Joanna Grzybowska-Pietras\*, Jadwiga Malkiewicz, Iwona Gruszka

Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych , ul.Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała \*MAILTO: jpietras@ath.bielsko.pl

# Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań oceny wybranych właściwości włókninowych obłożen chirurgicznych. Wytypowano włókniny zbudowane z rożnego surowca i otrzymane metodą; igłowania wodnego (spun lace), spun – bonded oraz obłożenie otrzymane w wyniku połączenia włókniny spun - bonded z folia polietylenowa. Badania przeprowadzono w oparciu o normę PN-EN 13795. Wykonano badania masy powierzchniowej, grubości, wytrzymałości na rozciąganie na sucho i na mokro oraz przepuszczalności powietrza. Wyznaczono również rozkład frakcyjny porów. Uzyskane wyniki badań włókninowych obłożen chirurgicznych pozwalają stwierdzić, iż w przypadku oceny cech mechanicznych wyrobów spełniają one przede wszystkim wymagania podstawowe. We wszystkich badanych obłożeniach wielkość porów jest mniejsza niż 80 um, tak więc zgodnie z normą PN-EN 13795-1 w znacznym stopniu zapobiegają rozprzestrzenianiu się cząstek złuszczonego naskórka.

Słowa kluczowe: obłożenie chirurgiczne, włóknina, komfort fizjologiczny, właściwości

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 180-182]

# Wprowadzenie

Głównym przeznaczeniem odłożeń chirurgicznych jest ochrona pacjentów przed zakażeniami pooperacyjnymi i personelu medycznego przed krwiopochodnymi czynnikami infekcyjnymi. Wyroby te stosowane są w celu zminimalizowania wnikania czynników infekcyjnych do ran operacyjnych pacjenta oraz zapobiegają zakażeniom podoperacyjnym. Podczas operacji czystych, tj. operacji na sterylnej tkance bez otwierania jamy otrzewnej, najważniejszymi źródłami drobnoustrojów są skóra osób personelu sali operacyjnej oraz skóra pacjenta. [1-3]

Ze względu na właściwościowości włóknin, niski koszt produkcji oraz duże możliwości technologiczne, coraz większe znaczenie w walce z zakażeniami i profilaktyce szpitalnej mają jednorazowe obłożenia chirurgiczne. Wyroby te zapobiegają między innymi bezpośredniemu kontaktowemu przenoszeniu czynników infekcyjnych z zespołu chirurgicznego do rany operacyjnej i odwrotnie (ludzki naskórek, bakterie, wirusy).[4]

Wraz ze wzrostem zainteresowania dotyczącego problemom infekcji przenoszonych przez krew lub płyny ustrojowe, wzrosła świadomość znaczenia obłożeń i fartuchów chirurgicznych jako ochrony dla zespołu operującego i pacjenta. W oparciu o obecny poziom wiedzy, wprowadzono nową normę PN-EN 13795, regulującą niezbędne wymagania określone przez 93/42/EEC. Podstawowe wymagania zawarte w normie PN-EN 13795 dotyczą projektowania i konstrukcji wyrobów medycznych oraz wyjaśniają kluczowe parametry

• • • • • • • • • • • • • • • • • • •

# ESTIMATION OF SELECTED PROPERTIES OF NONWOVENS SURGICAL DRAPES

Joanna Grzybowska-Pietras\*, Jadwiga Malkiewicz, Iwona Gruszka

ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA, FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, INSTITUTE OF ENGINEERING AND POLYMER SCIENCE, 2 WILLOWA STREET, 43-309 BIELSKO-BIALA, PPLAND \*MAILTO: JPIETRAS@ATH.BIELSKO.PL

# Abstract

In his work were presented the results of testing of selected properties of nonwovens surgical drapes. One selected nonwoven fabrics of various raw material and manufactured by spun lace and spun-bonded methods and cover produced as a result of spun-bonded nonwoven fabric connection with polyethylene film. The tests were carried out in accordance with PN-EN 13795 Standard. The surface mass, thickness, tensile strength dry and wet and air permeability were tested. The fractional distribution of pores was also estimated. Obtained results of nonwovens surgical drapes testing allow to state that in the case of estimation of mechanical characteristics of products they fulfill first of all the basic requirements. In all tested drapes the pores size is below 80 µm, so they considerably prevent spreading of particles of exfoliated cuticle in accordance with the PN-EN 13795 - 1 Standard.

*Key words:* surgical drapes, nonwoven fabric, pores, strength dry and wet.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 180-182]

# Introduction

Protection of patients against postoperative infections and of medical staff against infectious factors derivatives of blood is the main purpose of surgical drapes. These products are used to minimize infectious factors getting in operating wounds of patient and prevent postoperative infections. During the clean surgeries, that means surgeries on the sterile tissue without opening of peritoneal cavity, the skin of medical staff and the skin of patient are the most important source of micro-organisms. [1-3]

The disposable surgical drapes are of growing importance in the battle against infections and in hospital prophylaxis for the reason of nonwoven fabrics properties, low production costs and large technologic possibilities. These products prevent among others the direct contact transmission of infectious factors from the surgical team to the operating wound and vice versa (human cuticle, bacteria, viruses). [4]

Along with the growth of an interest in problems of infections transported by blood or bodily fluids, rose the consciousness of surgical drapes and gowns importance as the protection of the surgical team and the patient.

On the basis of present level of knowledge was introduced the new PN-EN 13795 Standard regulating the necessary requirements determined by 93/42/EEC. The main requirements comprised in PN-EN 13795 Standard concern designing and construction of medical products and define the key parameters ensuring the safety of use for patients as well as for medical staff. These parameters zapewniające bezpieczeństwo użytkowania zarówno dla pacjentów jak i dla personelu medycznego. Parametry te dotyczą m inn. cech użytkowych, przechowywania i transportu wyrobów medycznych, do których zalicza się włókninowe obłożenia chirurgiczne.[1-3]

## Materiały i metody

Włókninowe wyroby medyczne, powinny charakteryzować się, zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 13795-3:2006 odpowiednimi wymaganiami użytkowymi. W normie PN-EN 13795-1:2006 zostały sformułowane wymagania odnośnie braku cząstek zanieczyszczających materiał, które mogą być uwolnione w wyniku działania mechanicznego, odporności na przenikanie mikroorganizmów na sucho i na mokro, czystości mikrobiologicznej oraz wytrzymałości na wypychanie i na rozciąganie na sucho i na mokro. Duże znaczenie ma informacja na temat braku cząstek zanieconcern among others the functional characteristics, storage and transport of medical products including the nonwovens surgical drapes. [1-3]

# Materials and methods

The nonwoven medical products should be characterized



RYS.1. Mikrostruktura włókninowych obłożeń chirurgicznych [6].

FIG.1. Microstructure of nonwovens surgical drapes.

Włókniny Nonwovens	Skład surowcowy Raw material composition	Masa powierzchniowa Basis weight of nonwoven [g/m²]	Grubo Thickness [mm]	G sto Density [kg/m³]
Spun-lace (SL)	50% PET / 50% wiskoza	70	0,4	169
Spun-bonded (SB)	100% PP	20	0,3	74
Spun-bonded+folia (SBF)	70 % PET 30% PE	37	0,5	153

TABELA 1. Parametry włókninowych obłożeń chirurgicznych . TABLE 1. Parameters of nonwovens surgical drapes.

czyszczających materiał i pylenia materiałów stosowanych na sali operacyjnej z uwagi na fakt, że cząstki te mogą stanowić nośnik dla czynników infekcyjnych. [1]

Materiał badawczy stanowiły włókninowe obłożenia chirurgiczne stosowane w szpitalach a otrzymane techniką (metodą): spun – lace (SL), spun – bonded (SB) oraz spun – bonded +folia(SBF).[4] Na RYSUNKU 1 przedstawiono mikrostrukturę włókninowych obłożeń chirurgicznych.

Wykonano badania dotyczące: wyznaczenia masy powierzchniowej (PN-EN 29073-1:1994), grubości (PN-EN 29073-2:1994), wytrzymałości na rozciąganie na sucho i na mokro(PN-EN 29073-1:1994), przepuszczalności powietrza (PN-EN ISO 9237:1998). Wyznaczono również rozkład frakcyjny porów korzystając z porometru kapilarnego firmy PMI.[6] Otrzymane wyniki badań zamieszczono w TABELI 1.

# Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki badań wpływu techniki wytwarzania na wybrane właściwości obłożeń chirurgicznych otrzymanych z włóknin zamieszczono w TABELI 2 oraz zilustrowano na RYSUNKACH 2-4.





by suitable usage requirements according to PN-EN 13795-3:2006 Standard. In the PN-EN 13795-1:2006 Standard were formulated requirements concerning a lack of material contaminating particles which could be released mechanically, resistance to dry and wet penetration of microbes, microbiologic purity and pushing out and tensile strength dry and wet. The information concerning the lack of material contaminating particles and dusting of materials used in operating room is of great importance because these particles could be an infectious factors carrier. [1]

The nonwoven surgical drapes used in hospitals and produced by spun-lace (SL), spun-bonded (SB) and Spun-bonded+film methods (SBF) were examined. [4] The microstructure of nonwovens surgical drapes was presented on FIG.1.

One carried out the investigations concerning: evaluation of basis weight of nonwoven (PN-EN 29073-1:1994), thickness (PN-EN 29073-2:1994), tensile strength dry and wet (PN-EN 29073-1:1994), air permeability (PN-EN ISO 9237:1998). One evaluated also the fractional distribution of pores using the PMI capillary porometer. Obtained results were put in TABLE 1.

# **Results an discussion**

The obtained results of examination of production technology influence on selected properties of surgical drapes manufactured of nonwoven fabrics were put in Table 2 and illustrated on FIGURES 2-4.

182					
	Parametr		Spun-lace	Spun- Bonded	Spun bonded
	Oarameter		(SL)	(SB)	+folia (SBF)
	Wytrzymałość na rozciąganie na sucho / Tensile strength dr	у			
	– wzdłuż / along	[N]	63	10	18
	– w poprzek / across	[N]	53	8,5	13
	Wytrzymałość na rozciąganie na morko / Tensile strength w	et			
	– wzdłuż / along	[N]	95	15	15
	– w poprzek / across	[N]	48	8,5	11
	Przepuszczalno powietrza / Air permeability [dm³/m²*s	] p=500Pa	1875	12207	2,6
	rednica porów / Average pore diameter	[µm]	58	59	Poni ej 2

#### TABELA 2. Wyniki badań. TABLE 2. The results of measurements.



RYS.3. Wpływ techniki wytwarzania fartuchów chirurgicznych na wytrzymałość chirurgicznych na przepuszczalność powietrza

FIG.3. Influence of surgical drapes production technology on the strength technology on the air permeability.

# Wnioski

.

Badania przeprowadzone na włókninowych obłożeniach chirurgicznych dowiodły, że technika wytwarzania włóknin ma decydujący wpływ na właściwości wyrobu i jego przeznaczenie. Wg normy PN-EN 13795-1:2002 wyroby włókiennicze o porach większych niż 80µm w niewielkim stopniu zapobiegają rozprzestrzenianiu się cząstek złuszczonego naskórka. [3] Wszystkie omawiane obłożenia chirurgiczne posiadają pory o średnicy poniżej 80µm. Najlepiej chroniąca przed przenoszeniem czynników infekcyjnych jest włóknina SBF, która posiada pory o wielkości poniżej 2µm. Materiał ten jednak posiada niską przepuszczalność powietrza, co obniża jego komfort fizjologiczny w trakcie podtrzymania właściwego stanu fizycznego pacjenta. Obłożenia chirurgiczne otrzymane techniką spun-lace oraz spun-bonded +folia posiadają siłę zrywającą powyżej 15 N (wg PN-EN 13795-3), tak więc spełniają wymagania podstawowe stawiane obłożeniom chirurgicznym. Natomiast najmniejsze właściwości mechaniczne oraz największą średnicę porów wykazuje włóknina otrzymana techniką spun- bonded.

# Piśmiennictwo

 [1] PN-EN 13795-1:2002 Obłożenia chirurgiczne, fartuchy chirurgiczne i odzież dla bloków operacyjnych, stosowane jako wyroby medyczne dla pacjentów

[2] PN-EN 13795-2. Obłożenia chirurgiczne, fartuchy chirurgiczne i odzież dla bloków operacyjnych, stosowane jako wyroby medyczne dla pacjentów- Część 2- Metody badania

[3] PN-EN 13795-3. Obłożenia chirurgiczne, fartuchy chirurgiczne i odzież dla bloków operacyjnych, stosowane jako wyroby medyczne dla pacjentów-Część 3; Wymagania użytkowe i poziomy ochrony



RYS.4. Rozkład porów w odłożeniach chirurgicznych.

FIG.4 Distribution of average pores in surgical drapes.

# Conclusions

Investigations conducted for nonwovens surgical drapes proved that production technology of nonwoven fabrics has the decisive effect on properties of product and its purpose. In accordance with PN-EN 13795-1:2002 Standard the textile products of pores size larger than 80 m prevent spreading of particles of exfoliated cuticle to a small extent.[3] All discussed surgical drapes have pores of diameter below 80 µm. The nonwoven fabric SBF, which has pores of sizes under 2µm, protects in the best way against spreading of infectious factors. However this material has low air permeability which decreases its physiological comfort during sustaining of right physical condition of patient. The surgical drapes manufactured by spun - lace and spun - bonded + film technology are characterized by tensile force above 15N (according to PN-EN 13795-3), so they meet the basic requirements put to the surgical drapes while the poorest mechanical properties and the largest diameter of pores shows the nonwoven fabric manufactured by spun-bonded technology.

# References

[4] Albrecht W., Fuchs H., Kittelmann W. Nonwoven fabrics, ISBN 3-527-30406-1, Wiley-VCH, Veinheim 2003

[5] Sordyl M., Wpływ techniki wytwarzania na wybrane właściwości użytkowe włóknin stosowanych jako obłożenia pola operacyjnego, Bielsko-Biała, 2008, praca dyplomowa

[6] Jena A., Gupta K., Characterization of Pore Structure of Filtration Media, Fluid Particle Separation Journal, Vol. 14, No. 3, 2002, p.227-241, Available from: www.pmiapp.com

# WPŁYW BUDOWY DWUWAR-STWOWYCH BIODEGRADOWAL-NYCH SYSTEMÓW POLIMERO-WYCH NA PROCES UWALNIANIA CYKLOSPORYNY A

Katarzyna Jelonek<sup>1</sup>, Janusz Kasperczyk<sup>1,2</sup>, Piotr Dobrzyński<sup>1</sup>, Bożena Jarząbek<sup>1</sup>, Barbara Klenczar<sup>2</sup>, Michał Sobota<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN, ul. M. Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze <sup>2</sup>Katedra i Zakład Biofarmacji, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Narcyzów 1, 41-200 Sosnowiec

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 183-186]

W ostatnich latach stosowanie biodegradowalnych polimerów do otrzymywania produktów farmaceutycznych nabiera coraz większego znaczenia. Stanowią one atrakcyjną alternatywę podania środków terapeutycznych w przypadku, gdy konieczna jest długotrwała terapia [1,2]. Wysoka zmienność farmakokinetyki cyklosporyny A (CyA), niska absorpcja, niska biodostępność, szereg działań niepożądanych (zwłaszcza nefrotoksyczność) sprawiają, iż konieczne staje się poszukiwanie nowych postaci leku. Chociaż w literaturze opisano próby otrzymania wielu nośników wykonanych z poliestrów alifatycznych, głównie poli(laktydu), poli(ɛ-kaprolaktonu), poli(glikolidu) oraz ich kopolimerów, w celu kontrolowanego uwalniania cyklosporyny A, jednakże żaden z nich nie zapewnia optymalnego i wydłużonego uwalniania, istotnego w przypadku leczenia immunosupresyjnego [3-5]. Tworzenie warstwowych nośników uwalniania leku służyć może zarówno wprowadzeniu kilku substancji leczniczych, jak i modyfikacji profilu uwalniania. Warstwowe systemy poprzez dobór liczby warstw, ich grubości, rodzaju materiału z którego zostały wykonane, pozwalają na większą w porównaniu z układami jednowarstwowymi kontrolę kinetyki uwalniania leku. Modyfikacje takie uwzględniać mogą sposób rozmieszczenia leku w poszczególnych warstwach nośnika (warstwy wykonane z tego samego rodzaju polimeru, ale zawierające różną ilość leku) oraz zastosowanie nośników, w których wewnętrzna warstwa rdzeniowa, zawierająca lek otoczona jest jedną lub kilkoma warstwami zewnętrznymi, opóźniającymi proces uwalniania [6-8].

W pracy oceniano zastosowanie polimerowych systemów dwuwarstwowych jako metody modyfikacji właściwości fizykochemicznych, zapewniających optymalny profil uwalniania leku immunosupresyjnego oraz wpływu rodzaju warstw polimerowego nośnika na kinetykę uwalniania cyklosporyny A.

#### Materiały i metody

Do otrzymania matryc z 10% zawartością cyklosporyny A (LC laboratories) zastosowano poli(L-laktydo-ko-TMC) 70:30 (Mn=86,7kDa; D=2,2) zsyntezowany w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu, przy zastosowaniu Zr(acac)<sub>4</sub> jako nietoksycznego inicjatora. Mikrostrukturę łańcuchów kopolimerowych podczas procesu degradacji określano przy użyciu spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego o wysokiej rozdzielczości (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600MHz) [9]. Jako rozpuszczalnik zastosowano osuszony DMSO-d<sub>6</sub>. Masy cząsteczkowe kopolimerów (Mn) oraz polidyspersyjność (D), wyznaczono przy użyciu chromatografu żelowego Phi-

# THE INFLUENCE OF COMPOSITION BILAYERED BIODEGRADABLE SYSTEM ON CYCLOSPORINE A RELEASE

Katarzyna Jelonek<sup>1</sup>, Janusz Kasperczyk<sup>1,2</sup>, Piotr Dobrzyński<sup>1</sup>, Bożena Jarząbek<sup>1</sup>, Barbara Klenczar<sup>2</sup>, Michał Sobota<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre of Polymer and Carbon Materials PASci, 34 M. Curie-Skłodowskiej str., 41-819 Zabrze <sup>2</sup>Department of Biopharmacy, Medical University of Silesia, 1 Narcyzów str., 41-200 Sosnowiec

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 183-186]

Application of biodegradable polymers in pharmaceutical field gains a lot of interest nowadays. They can be interesting, alternative form of drug administration, especially in case of long-term therapy [1,2]. High pharmacokinetics variation of cyclosporine A (CyA), low absorption and bioavailability as well as many side effects (as nephrotoxicity) cause necessity of developing new dosage form. In studies on controlled release of cyclosporine A from aliphatic polyesters, mainly poly(lactide), poly(ɛ-caprolactone), poly(glycolide) have been described, however none of drug delivery system provide optimal, prolonged drug release, that is crucial in immunosuppressive therapy [3-5]. Developing of multilayered drug delivery systems may be a method of several drugs administration, but also of release profile optimization. Compared to non-layered systems, they enable better control of drug release kinetics by layers modification (number, thickness and kind of polymer). Changes may include drug dispersion in particular layer (layers obtained from the same kind of polymer, but containing different drug amount) or composition of carrier (e.g. internal core with drug and coating layers that delay drug release process) [6-8].

In the presented study, using of bilayered biodegradable systems as a method of physicochemical features modification, that provide optimal immunosuppressive drug release profile was analyzed. The influence of drug carrier composition (kind of layers) on cyclosporine A release was studied, too.

# Materials and methods

Poly(L-lactide-co-TMC) 70:30 (Mn=86,7kDa; D=2,2) was used to prepare matrices with 10 weight-% of cyclosporine A (LC laboratories), synthesized in Centre of Polymeric and Carbon Materials PASci in Zabrze, with using of Zr(acac)<sub>4</sub> as non toxic initiator of copolymerization reaction. The characteristic of copolymers microstructure during degradation process was conducted by means of high resolution NMR spectroscopy (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600MHz) [9]. DMSO-d<sub>6</sub> was used as a solvent. The molecular weight (Mn) and polydispersity (D) were determined by GPC (Physics SP 8800 chromatograph), with chloroform as eluent. The 1,2cm diameter films were prepared from solution of copolymer in methylene chloride, solution of the appropriate amount CyA (10 weight-% of used copolymeric material) and mixing the two solutions. The solution was cast by means of a standard casting device on a glass plate, evaporated at ambient temperature and dried under reduced pressure. Bilayered drug delivery systems were obtained by laminatsics SP 8800, stosując chloroform jako eluent. Polimerowe filmy o średnicy 1,2 cm przygotowane zostały poprzez rozpuszczenie kopolimeru w chlorku metylenu, rozpuszczeniu odpowiedniej ilości CyA (10% ilości użytego polimeru), a następnie zmieszanie obu roztworów. Roztwór wylewano na płytę szklaną i pozostawiono w temperaturze pokojowej do czasu odparowania rozpuszczalnika. Warstwowe matryce polimerowe wykonano poprzez prasowanie dwóch folii o średnicy 1,2cm w stanie elastycznym (powyżej Tg) za pomocą prasy hydraulicznej. Matryce umieszczano pomiędzy blokami wykonanymi ze stali nierdzewnej o powierzchni 12cm x 12cm, które termostatowano w temp. 50°C i prasowano z siłą nacisku 3,4 tony przez 60s. Prasowaniu poddawano matryce polimerowe, wykonane z tego samego rodzaju polimeru w następujących kombinacjach: a) 2 matryce polimerowe z lekiem (AA); b) 2 matryce polimerowe bez leku (BB); c) 1 matryca polimerowa z lekiem i 1 matryca polimerowa bez leku (AB). Zważone próbki polimerowych filmów umieszczono w szczelnie zamykanych butelkach, zawierających PBS, które inkubowano w 37°C stale mieszając. W regularnych odstępach czasu wymieniano roztwór PBS, a w zebranych próbach oznaczano stężenie leku przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS (Spektrofotometr V-570, UV-VIS - NIR - JASCO).

## Wyniki i dyskusja

Charakterystykę mikrostruktury poli(L-laktydo-ko-TMC) zastosowanego do otrzymania matryc polimerowych przedstawiono w TABELI 1. Kopolimer posiadał wysoką masą cząsteczkową, odpowiednią dla długotrwałego kontrolowanego uwalniania leku oraz strukturę bezładną (R=0,82). Na widmie węglowym zidentyfikowano również sekwencję TLT świadczącą o występowaniu transestryfikacji drugiego stopnia (T<sub>II</sub>=1,56).

Z uzyskanych matryc polimerowych (oznaczonych jako A – matryca PLATMC z 10% zawartością CyA oraz B – matryca PLATMC bez leku) wykonano 2 rodzaje dwuwarstwowych polimerowych nośników CyA: typu AA (powstały w wyniku połączenia dwóch matryc z lekiem) oraz typu AB (kombinacja 1 matrycy z lekiem i jednej bez leku). Wykonano również dwuwarstwowy system typu BB, uzyskany z połączenia dwóch matryc bez leku, w celu porównania przebiegu degradacji hydrolitycznej.

Stwierdzono, iż CyA nie uwalniała się w takim samym

poli(L-laktydo-ko-trimetylenow glan) 70:30									
$M_n$ (Da) D $F_{LL}$ $F_T$ $I_{LL}$ $I_T$ R $T_{II}$									
86700	2,2	70	30	3,46	1,48	0,82	1,56		

TABELA 1. Mikrostruktura poli(L-laktydo-ko-TMC), służącego do otrzymania dwuwarstwowych nośników kontrolowanego uwalniania cyklosporyny A (Mn-liczbowo średni ciężar cząsteczkowy; D - polidyspersja; ILL, IT - średnia długość jednostek laktydylowych i węglanowych; R – współczynnik bezładności; TII – współczynnik transestryfikacji drugiego stopnia).

TABLE 1. Microstructure of poly(L-lactide-co-TMC) used to produce bi-layered controlled systems of cyclosporine A release (Mn- number-average molecular weight; D – polydispersity; ILL, IT - the average length of lactidyl and carbonate units; R – randomization ratio; TII – transesterification of the second mode ratio).

ing of two 1,2cm diameter films in elastic state (above Tg) between heated (50°C) stainless steel blocks of a hydraulic press at pressure 3,4 tons for 60 seconds. Laminated drug release systems were obtained from the same kind of polymer, but they had different composition dependently of the used matrices (layers): a) obtained from 2 matrices with drug (AA); b) obtained from 2 matrices without drug (BB); c) obtained from 1 matrice with drug and 1 matrice without drug (AB). The weighted polymeric matrices were immersed in PBS. The vials were incubated at 37°C and constantly shaked. Systematically, the PBS was changed and drug concentration was determined in collected samples by means of UV-vis spectroscopy (Spectrophotometer V-570, UV-VIS-NIR-JASCO).

#### **Results and discussion**

Microstructure characteristic of poly(L-lactide-co-TMC) used to obtain polymeric matrices is presented in TABLE 1. High molecular weight copolymer was used for long-term controlled drug release system with random structure of polymer chains (R=0,82). TLT sequence was identified in carbon spectrum, that is evidence of transestrification of the second mode ( $T_{II}$ =1,56).

The obtained polymer matrices (A – stands for PLATMC

matrice with 10% of CyA and B – stands for PLATMC matrice without drug) were used to form two kind of bilayered CyA release systems: AA (obtained by immersion of two matrices with drug) and AB (immersion of 1 matrice with drug and 1 without). Bilayered system of BB type was obtained from 2 matrices without drug and was used to compare its hydrolytic degradation process with AA and AB systems.

It was determined that CyA was not released in the same way from PLATMC 70:30 AA and PLATMC 70:30 AB systems (FIG.1). During 63 days 3,83% of CyA was released from PLATMC 70:30 AA and 10,75% from PLATMC 70:30 AB. The release profile of CyA from AA systems characterized burst effect (at 1-7 day) and inhibition of drug release at 36-42 day. These effects were not observed in case of AB





stopniu z systemów PLATMC 70:30 typu AA i AB (RYS. 1). W ciągu 63 dni z PLATMC 70:30 AA ubyło 3,83% leku, z PLATMC 70:30 AB aż 10,75%. Profil uwalniania CyA z systemów typu AA charakteryzował się wystąpieniem tzw. "burst effect" (w dniach 1-7) oraz zahamowaniem uwalniania leku w dniach 36-42. Efektów takich nie zaobserwowano w systemach typu AB. Analiza zmian mikrostruktury matryc poli(L-laktydo-ko-trimetylenowęglanowych), zachodzących podczas degradacji materiału polimerowego wykazała większy wzrost współczynnika transestryfikacji drugiego stopnia w systemach PLATMC 70:30 AA, świadczący o występowaniu dłuższych sekwencji typu TLT, które mogą być mniej podatne na hydrolizę i w związku z tym skuteczniej zatrzymywać lek w matrycy w porównaniu z systemami PLATMC 70:30 AB (TABELA 2). Odmienny przebieg degradacji systemów otrzymanych z dwóch matryc pozbawionych leku (BB) stanowi potwierdzenie znaczenia budowy poszczególnych warstw

Kind of bilayered system	Days	$F_{LL}$	F <sub>τ</sub>	ILL	Ι <sub>τ</sub>	R	Τ <sub>ιι</sub>	Mn (kDa)	systems. Anal- ysis of chain microstructure of poly(L-lac-
PLATMC 70:30	0	70	30	3,46	1,48	0,82	1,56	73,1	tide-co-trimeth-
<u>AA</u>	15	70	30	3,46	1,48	0,82	1,56	67,8	ylene carbon- ate) matrices
	42	71	29	3,25	1,33	0,91	1,73	55,9	during degra-
PLATMC 70:30	0	70	30	3,46	1,48	0,82	1,56	65,6	dation process
AB	15	70	30	3,31	1,42	0,85	1,62	67,3	showed higher
	42	71	29	3,12	1,27	0,94	1,79	55,1	transesterifi-
	0	70	30	3,46	1,48	0,82	1,56	64,1	cation ratio in
BB	14	70	30	3,47	1,48	0,82	1,56	61,1	AA systems, in comparison
<u></u>	42	70	30	3,53	1,51	0,80	1,52	66,9	to AB systems

TABELA 2. Zmiany mikrostruktury poli(L-laktydo-ko-TMC) w systemach dwuwarstwowych typu AA, AB i BB (Mn-liczbowo średni ciężar cząsteczkowy; D - polidyspersja; ILL, IT - średnia długość jednostek laktydylowych i węglanowych; R - współczynnik bezładności; TII - współczynnik transestryfikacji drugiego stopnia).

TABLE 2. Changes in microstructure of poly(L-lactide-co-TMC) in bilayered systems of AA, AB and BB type (Mn- number-average molecular weight; D - polydispersity; ILL, IT - the average length of lactidyl and carbonate units; R - randomization ratio; TII – transesterification of the second mode ratio).

S. on ns (TABLE 2). It indicates presence of longer TLT sequences that may be less susceptible to hydrolysis and retain drug molecules in AA matrices. Different degradation process of systems ob-

na właściwości fizykochemiczne całego systemu. W systemach PLATMC 70:30 BB zaobserwowano równomierny ubytek jednostek laktydylowych i węglanowych, utrzymujący się w stosunku 70:30 przez cały czas degradacji, nieznaczne obniżenie współczynnika transestryfikacji i niewielki wzrost uporządkowania łańcuchów kopolimerowych. Wyniki te wskazuja, iż w przypadku systemów niezawierających substancji leczniczej sekwencje mieszane typu TLT ulegają szybszej degradacji hydrolitycznej niż w matrycach zawierających cyklosporynę A. Stopniowa degradacja i dyfuzja krótszych fragmentów łańcucha tłumaczyć może wzrost masy cząsteczkowej matryc PLATMC 70:30 BB po 42 dniach degradacji.

# Wnioski

Wykazano odmienny przebieg procesu degradacji zachodzący w trzech analizowanych dwuwarstwowych systemach otrzymanych z PLATMC 70:30. Znacznie większa ilość CyA uwolniła się z systemu uzyskanego w wyniku połączenia 1 matrycy zawierającej lek i 1 matrycy bez leku (AB) niż z systemu otrzymanego z 2 matryc z lekiem (AA). Opracowanie warstwowego systemu zawierającego cyklosporynę A może służyć zatem nie tylko jako sposób na jednoczesne podanie kilku leków immunosupresyjnych, ale również jako metoda modyfikacji właściwości fizykochemicznych i optymalizacji profilu uwalniania CyA.

# Podziękowania

Praca finansowana z projektu MEMSTENT (Nr: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-00) oraz w ramach badań statutowych SUM (NN-1-040/07).

tained from two matrices without drug (BB) was observed, which is the evidence that composition of the particular layers influence the physicochemical features of the whole system. In case of BB systems, even decrease of lactidyl and carbonate unit content (70:30 during the studied period of degradation process), insignificant decrease of transesterification and randomization ratio was determined. These results indicate that in case of systems without drug, sequences of TLT type undergo faster hydrolytic degradation than in case of matrices containing cyclosporine A. Gradual degradation and diffusion of short polymer chains may explain increase of molecular weight of PLATMC 70:30 BB systems after 42 days of degradation.

# Conclusions

Different degradation process of the three analyzed bilayred systems obtained from PLATMC 70:30 was determined. Significantly higher amount of CyA was released from system obtained by lamination of 1 matrice containing drug and 1 matrice without drug (AB) than from systems obtained from 2 matrices with drug (AA). Developing multilayered system containing cyclosporine A may be used as a method of several drugs administration, but also as a method of physicochemical features of the polymeric system modification and optimization of CyA release.

# Acknowledgements

This study has been financially supported by MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-00) and Medical University of Silesia (Grant No: NN-1-040/07).

## Piśmiennictwo

# References

[1] Li S, Vert M. Biodegradable polymers: Polyester. [In:] Mathiowitz E, ed. The Encyclopedy of Controlled Drug Delivery. New York: John Wiley & Sons 1999: pp. 71 – 91.

[2] Nair LS, Laurencin CT. Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 2006, 102: 47-90.

[3] Chacón M, Molperces J, Berges L, Guzman M, Aberturas M. R. Stability and freeze – drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide – glycolide) carriers, Eur J Pharm Sci. 1999; 8: 99 – 107.

[4] Gref R, Quellec P, Sanchez A, Calvo P, Dellacherie E, Alonso MJ. Development and characterization of CyA – loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers, Eur J Pharm Biopharm. 2001; 51: 111 – 118.

[5] Talegaonkar S, Mishra PR. Recent advances in modulated drug delivery systems. Indian J Pharm Sci. 2002, 64: 515- 24.

[6] Charalambopoulou GCH, Kikkinides ES, Papadokostakia KG, Stubos AK, Papaioannou AT. Numerical and experimental investigation of the diffusional release of a dispersed solute from polymeric multilaminate matrices. J Control Rel. 2001, 70: 309–319.

[7] Sershen S, West J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery. Adv Drug Del Rev. 2002, 54: 1225-1235.

[8] Loo SCh.J, Tan WLJ, Khoa SM, Chia NK, Venkatraman S, Boey F. Hydrolytic degradation characteristics of irradiated multi-layered PLGA films. Int J Pharm. 2008, 360: 228-230.

[9] Dobrzyński P, Kasperczyk J. Synthesis of Biodegradable Copolymers with Low–Toxicity Zirconicum Compounds.V. Multiblock and Random Copolymers of L-Lactide with Trimethylene Carbonate Obtained in Copolymerizations Initiated with Zirconium (IV) Acetylacetonate. J Polym Sci: Part A: Polym Chem. 2006, 44: 3184-3201.

•••••

# ANALIZA PORÓWNAWCZA SKŁADU PIERWIASTKOWEGO ŚCIAN AORTY BRZUSZNEJ I TĘTNIAKA AORTY BRZUSZNEJ

# Magdalena Kobielarz<sup>1,2</sup>, Krzysztof Marycz<sup>3</sup>, Sylwia Szotek<sup>1</sup>, Romuald Będziński<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Inżynierii Biomedycznej i Mechaniki Eksperymentalnej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska

<sup>2</sup>Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo- Rozwojowy

<sup>3</sup>Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław, Polska

# Streszczenie

Głównym celem pracy było określenie procentowego składu pierwiastkowego ścian zdrowej aorty brzusznej (NAA) i tętniaka aorty brzusznej (AAA) na podstawie mikroanalizy rentgenowskiej (Rtg) dla dużej populacji materiału badawczego, ażeby sprawdzić użyteczność metody do różnicowania (na poziomie molekularnym) materiału biologicznego pod kątem zmian chorobowych. Dla żadnego z analizowanych pierwiastków nie odnotowano, na poziomie istotności p=0,05, istotnych statystycznie zmian w procentowym rozkładzie pierwiastków między preparatami ścian zdrowych aort brzusznych oraz tętniaków. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, biorąc pod uwagę wielkość grup badawczych, że zastosowana metoda nie umożliwia różnicowania materiału biologicznego na założonym poziomie istotności.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 186-188]

# Wprowadzenie

Tętniak aorty brzusznej (AAA) to trwałe i postępujące, lokalne poszerzenie aorty brzusznej o minimum 50%

# COMPARISON ANALYSIS OF CHEMICAL ELEMENTS COMPOSITION OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS AND NORMAL ABDOMINAL AORTIC WALLS

Magdalena Kobielarz<sup>1,2</sup>, Krzysztof Marycz<sup>3</sup>, Sylwia Szotek<sup>1</sup>, Romuald Będziński<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Biomedical Engineering and Experimental Mechanics, Faculty of Mechanical Engineering, Wroclaw University of Technology, Wroclaw, Poland <sup>2</sup>Regional Specialist Hospital in Wroclaw, Research and Development Centre, Poland <sup>3</sup>Electron Microscope Laboratory, Wroclaw University of Environmental and Life Sciences, Poland

# Abstract

The main aim of paper was evaluation of chemical elements composition of normal abdominal aortic walls (NAA) and abdominal aortic aneurysms walls (AAA) based on X-ray microanalysis for a numerous and diversified population in order to differentiate (on molecular level) biological materials according pathological changes. For neither of analyzed elements were noticed statistically significant on the confidence level p=0,05 differences between NAA walls and AAA walls. On the basis of the obtained results it can be concluded that used methods isn't sufficient to differentiation of biological materials according pathological changes.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 186-188]

# Introduction

An abdominal aortic aneurysm (AAA) is a permanent and progressive dilatation (widening or bulge) of the abdominal aorta by at least 50% relative to its normal diameter [1-3]. AAA arises as a result of the many-factor pathologic remodelling of the aorta's connective tissue [4]. The cause leading

w stosunku do jej prawidłowej średnicy [1-3]. AAA powstaje w wyniku wieloczynnikowej, patologicznej przebudowy tkanki łącznej ściany aorty [4]. Przyczyna prowadząca do powstania tętniaka nie jest jeszcze znana, ale powoduje obniżeniem wytrzymałości ściany naczynia i wzrost jej sztywności [5,6]. Potencjalnie, proces rozwoju AAA może być wywołany przez deficyt miedzi, cynku lub kwasu askorbinowego [7,8]. Wiele badań przeprowadzonych w ciągu ostatnich kilku lat wskazuje, że inicjację, rozwój oraz pęknięcie tętniaka powoduje proteolityczna degradacja białek strukturalnych ściany aorty, czyli elastyny i kolagenu [9-13]. Pierwiastki śladowe, takie jak miedź (Cu), cynk (Zn) i molibden (Mo) związane są z procesami biodegradacji białek macierzy pozakomórkowej, głównie włókien elastynowych. Ocena procentowego składu pierwiastkowego za pomoca metody mikroanalizy rentgenowskiej (Rtg) może umożliwić różnicowanie, na poziomie molekularnym, materiału biologicznego pod kątem zmian chorobowych. Stąd celem pracy było określenie procentowego składu pierwiastkowego ścian aorty brzusznej i tętniaka aorty brzusznej na dużej grupie materiału badawczego.

#### Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły preparaty ścian niezmienionych patologicznie aort brzusznych oraz ścian tętniaków aorty brzusznej. Preparaty ścian tętniaków aorty brzusznej (AAA) oraz ścian niezmienionych patologicznie aort brzusznych (NAA) pobrano odpowiednio: śródoperacyjnie od 96 pacjentów oraz podczas autopsji od 67 dawców (na podstawie decyzji Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej we Wrocławiu na podstawie decyzji nr KB – 764/2004). Każdorazowo z materiału badawczego pobierano przy pomocy skalpela skrawek wielkości około 10 mm2 pełnej grubości ściany naczynia w celu przeprowadzenia analizy składu pierwiastkowego analizowanych tkanek. Analiza składu pierwiastkowego wykonana została przy zastosowaniu techniki mikroanalizy rentgenowskiej. Badanie przeprowadzono z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego Leo 435 VP (Zeiss) z przystawką do mikroanalizy (Rőentec).

Materiał utrwalano przez okres 7 dni w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego na buforze fosforanowym. Następnie utrwalony materiał odwadniano w szeregu kąpieli acetonowych o stopniowo rosnących stężeniach; od wartości 50% aż do 100%; po czym suszono je i naklejano na stoliki używając kleju węglowego. Pojedynczy pomiar procentowego udziału pierwiastków w strukturze poszczególnych preparatów prowadzono w punkcie o wymiarach: 0,5µm x 0,5µm. Dla każdego analizowanego przypadku, wykonano 10 pomiarów, w losowo wybranych obszarach badanego preparatu. Wyniki przeprowadzonych badań uśredniano dla każdego preparatu.

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich wraz z odchyleniami standardowymi (X ± SD). Statystyczną analizę danych przeprowadzono na podstawie testu t-Studenta dla prób niezależnych (pakiet Statistica 8.0, StatSoft). Testy prowadzono przy zachowaniu założenia, że wartość graniczna poziomu istotności (p) wynosi 0,05.

## Wyniki i dyskusja

Analiza składu pierwiastkowego ścian zdrowych aort brzusznych oraz ścian tętniaków aorty brzusznej wykazała, że zdecydowanie najwyższy procentowy udział w strukturach obu grup mają pierwiastki budujące struktury białkowe (głównie: elastynę i kolagen), tj. węgiel (C) oraz tlen (O) (TABELA 1.), przy czym zakres zmienności to an AAA is still unknown although causes strength reduction and stiffness increase [5,6]. Potentially, the development of an AAA can be induced by, among other things, copper, zinc or ascorbic acid deficiency [7,8]. Many researches done in recent years indicate that the initiation, development and rupture of the aneurysm are caused by the degradation of the aortic wall structural proteins, i.e. elastin and collagen [9-13]. Vestigial components like cup rum (Cu), zinc (Zn) and molybdenum (Mo) are connected with biodegradation processes of extracellular matrix proteins, mainly elastin fibers. Proportional evaluation of elemental composition by X-ray microanalysis may enable differentiation of biological materials according pathological changes on molecular level. Hence, the main aim of paper was proportional evaluation of elemental composition of normal abdominal aortic walls and abdominal aortic aneurysms walls based on a numerous and diversified population.

#### Material and methods

The experimental material had the form of preparations of normal abdominal aortas (NAA) and abdominal aorta aneurysm walls (AAA). The abdominal aorta aneurysm walls (AAA) were intraoperatively taken from 96 patients and the normal abdominal aorta walls (NAA) were taken during autopsies from 67 donors (the permission was granted by the Bioethical Committee at Wrocław Medical University on the basis of decision KB – 764/2004). Vascular wall segments 10 mm2 in area constituted the material for chemical composition analysis, based on X-ray microanalysis. The investigations were performed on a Leo 435 VP (Zeiss) electron microscope with additional equipment to X-ray microanalysis (Rőentec).

The biological material were fixed in a 2,5% phosphatebuffered glutaraldehyde for 7 days. Afterwards fixed materials were dehydrated in an acetone series, then dried and stuck onto microscope stages, using carbon glue. Every single measurement of chemical composition of particular specimen structure was conducted in a point dimension  $0,5\mu m \times 0,5\mu m$ . For every single case 10 measurements were performed at random chosen areas analyzed specimen. The results were presented in the form of averages with standard deviations (X ± SD). The statistical analysis of the data was based on Student's t-test for independent samples (Statistica 8.0, StatSoft package). The statistical tests were performed assuming the confidence level limit value (p) of 0,05.

## Results and conclusions

On the basis of the conducted research on normal abdominal aortic walls and abdominal aortic aneurysms walls, the obtained results indicate the highest proportional contribution had composition constructed protein structures (mainly: elastin and collagen), i.e. carbon (C) and oxygen (O) (TABLE 1.). A change of variability was determinedly wider for abdominal aortic aneurysms walls than for normal abdominal aortic walls. The calcium (Ca) content in analyzed preparations structures was extremely variable; it was indicated on a various development level of atherosclerotic alteration in blood vessels walls; normal and pathologically changed. In AAA walls were noted presence of vestigial chemical element connected with biodegradation of elastin fibers, mainly cuprum (Cu). The contribution of zinc (Zn) and molybdenum (Mo) weren't noticed. Neither of this components were prevailing in NAA walls.

w przypadku ścian tętniaków był zdecydowanie szerszy niż w przypadku ścian zdrowych naczyń krwionośnych. Zawartość wapnia (Ca) w strukturze analizowanych preparatów jest wysoce zmienna, co wskazuje na różny stopień rozwoju zmian miażdżycowych w ścianie zarówno aorty, jak i tętniaka. W przypadku ścian tętniaków, odnotowano obecność pierwiastków śladowych związanych z procesami biodegradacji włókien elastynowych, głównie miedzi (Cu), nie odnotowano natomiast obecności cynku (Zn) i molibdenu (Mo). Żaden z tych pierwiastków nie był obecny w strukturze ścian zdrowych naczyń.

Dla żadnego z analizowanych pierwiastków nie odnotowano, na poziomie istotności p=0,05, istotnych statystycznie zmian w procentowym rozkładzie pierwiastków między preparatami ścian zdrowych aort brzusznych oraz tętniaków, aczkolwiek zakres uzyskanych wyników w przypadku tętniaków był zdecydowanie szerszy. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, biorąc pod uwagę wielkość grup badawczych, że zastosowana metoda nie umożliwia różnicowania materiału biologicznego (na założonym poziomie istotności).

		_									
	Udział / Contribution[%]										
		NAA	Ą	AAA							
Pierwiastek Element	rednia Average value	SD	Zakres Range	rednia Average value	SD	Zakres Range					
С	55,97	6,88	40,28÷70,51	56,53	11,36	20,88÷73,95					
0	34,70	5,34	22,63÷43,90	36,04	9,67	18,72÷53,62					
Na	1,39	0,94	0,44÷3,39	1,20	0,85	0,26÷4,48					
Si	0,70	0,67	0,23÷2,69	0,55	0,30	0,04÷1,04					
Р	2,84	1,72	0,73÷7,64	1,81	2,14	0,44÷11,50					
S	0,98	0,19	0,75÷1,44	1,02	0,32	0,48÷1,78					
Са	2,44	2,90	0,17÷9,34	1,60	4,17	0,11÷20,77					
Mg	0,24	0,09	0,11÷0,44	0,23	0,13	0,01÷0,42					
Al	0,79	0,75	0,03÷2,73	1,52	1,75	0,03÷6,61					
Fe	6,14	14,83	0,05÷39,73	0,15	0,08	0,05÷0,37					
Cu	0	0	-	0,10	0,02	0,08÷0,11					
CI	0,64	0,20	0,44÷0,85	0,53	0,15	0,30÷0,68					
Zn	0,88		-	0	0	-					
Cr	4,17	5,62	0,19÷8,14	0	0	-					
K	0,89		-	0,33	-	-					
Ti	0,97	0,93	0,31÷1,63	0,08	-	-					
Мо	2,74		-	0	0	-					
Sn	0	0	-	0	0	-					
	1,19		-	0	0	-					
F	4,63		-	0	0	-					

For neither of analyzed elements were noticed statistically significant on the confidence level p=0,05 differences between normal abdominal aortic walls and abdominal aortic aneurysms walls. Although the range of obtained results for AAA specimens was definitely broader. On the basis of the experimental results including a magnitude of experimental group produce evidence used methods isn't sufficient to differentiation of biological materials according pathological changes.

TABELA 1. Udział procentowy pierwiastków w strukturze ścian preparatów zdrowych aort brzusznych (NAA) oraz w strukturze preparatów ścian tętniaków aorty brzusznej (AAA).

TABLE 1. Contribution of chemical elements in normal abdominal aortic walls (NAA) and abdominal aortic aneurysms walls (AAA).

## Podziękowania

Badanie realizowane w ramach projektu "WROVASC-Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo - Naczyniowej", finansowanego w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego oraz z budżetu państwa - Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.

# Piśmiennictwo

[1]. Sakalihasan, N., R. Limet, and O. Defawe, Abdominal aortic aneurysm. Lancet, 2005; 365: 1577-89.

[2]. Alexander, J., The pathobiology of aortic aneurysms. Journal of Surgical Research, 2004; 117: 163-175.

[3]. Li, Z. and C. Kleinstreuer, Analysis of biomechanical factors affecting stent-graft migration in an abdominal aortic aneurysm model. Journal of Biomechanics, 2006; 39: 2264-2273.

[4]. Davies, M., Aortic aneurysm formation: lessons from human studies and experimental models. Circulation, 1998a; 98: 193-195.

[5]. Kobielarz, M., R. Będziński, S. Szotek, P. Kuropka, and J.J. Gnus, In vitro analysis of directional mechanical properties of the walls of abdominal aorta and the abdominal aortic aneurysm. Meccanica, w druku.

[6]. Kobielarz, M., S. Szotek, P. Kuropka, and K. Kaleta, Właściwości mechaniczne i strukturalne tętniaków aorty brzusznej. Inżynieria Biomateriałów, 2008; 11: 98-100.

[7]. Cooggon, D., C. Martyn, and C. Osmond, Mortality from aortic aneurysms in migrants between countries of England and Wales: evidence for causes acting early in life. QJM, 1997; 90: 133-137.

#### Acknowledments

This work is supported by European Regional Development Fund and the Polish Government (Operational Programme - Innovative Economy) under the grant "WROVASC – Integrated Cardiovascular Centre" which is being realized in years 2007-2013.

#### References

[8]. Rucker, R., T. Kosonen, M. Clegg, A. Mitchell, B. Rucker, J. Uriu-Hare, and C. Keen, Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. American Journal of Clinical Nutrition, 1998; Suppl 67: 996-1002.

[9]. Longo, M., S. Buda, N. Fiotta, W. Xiong, T. Griener, S. Shapiro, and T. Baxter, MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. Surgery, 2005; 137: 457-462.

[10]. Brady, A., S. Thompson, G. Fowkes, R. Greenhalgh, and J. Powell, Abdominal aortic aneurysm expansion. Risk factors and time intervals for surveillance. Circulation, 2004; 110: 16-21.

[11]. Lindholt, J., L. Heickendorff, S. Vammen, H. Fasting, and E. Henneberg, Five-year results of elastin and collagen markers as predictive tools in the management of small abdominal aortic aneurysms. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2001; 21: 235-240.

[12]. Eriksson, P., K. Jones, L. Brown, R. Greenhalgh, A. Hamsten, and J. Powell, Genetic approach to the role of cysteine proteases in the expansion of abdominal aortic aneurysms. British Journal of Surgery, 2004; 91: 86-89.

[13]. Carmo, M., L. Colombo, A. Bruno, F. Corsi, L. Roncoroni, M. Cuttin, F. Radice, E. Mussini, and P. Settembrini, Alteration of elastin, collagen and their cross-links in abdominal aortic aneurysms. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2002; 23: 543-549.

#### . . . . . . . . . . . . . . . .

# WPŁYW OBECNOŚCI NANODODATKÓW NA STRUKTRURĘ I WŁAŚCIWOŚCI WŁÓKIEN Z ALGINIANU WAPNIA

 $\label{eq:maciej} \begin{array}{l} Maciej \; Boguń^{1*}, \; Teresa \; Mikołajczyk^1, \; Stanisław \; Rabiej^2, \\ Ewa \; Stodolak^3 \end{array}$ 

<sup>1</sup>Politechnika Łódzka, Katedra Włókien Sztucznych <sup>2</sup>ATH Bielsko-Biała, Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materia-Łów Polimerowych <sup>3</sup>AGH Kraków, Katedra Biomateriałów \*MAILTO: maciek.bogun@wp.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 189-193]

## Wstęp

Inżynieria biomateriałowa jest obecnie jedną z najprężniej rozwijających się dziedzin nauki. Wykorzystanie w nowoczesnej medycynie biokompozytów opartych zarówno o nanotechnologię, jak i materiały włókniste pozwala na opracowanie biomateriałów, które w przyszłości mogą odegrać znaczącą rolę w medycynie regeneracyjnej. Wprowadzenie do włókien, a tym samym do biokompozytu, bioaktywnych nanododatków powinno w wydatny sposób przyczynić się do skrócenia czasu leczenia pacjentów, a tym samym skróceniu ich czasu hospitalizacji.

Jednym z polimerów, który odgrywa szczególnie rolę w inżynierii materiałowej jest alginian sodowy, który znalazł szerokie zastosowanie w wytwarzaniu specjalistycznych materiałów opatrunkowych [1]. Nowym obszarem zastosowań dla tego polimeru, może być wykorzystanie go w inżynierii tkankowej. Alginian jest liniowym polisacharydem, zbudowanym z reszt kwasu β-D-mannuronowego (M) i α-Lqulrunowego (G) [2], przeważnie wykazującym przemienna strukturę typu MMMGGGMG[3]. Polimer ten charakteryzuje się bardzo istotnymi z punktu widzenia medycyny właściwościami, a mianowicie: brakiem toksyczności, antybakteryjnością, unikatową kompatybilnością tkankową oraz kontrolowanym czasem biodegradacji. Alginiany w różnej postaci znalazły zastosowanie w inżynierii tkankowej do leczenia i regeneracji skóry, tkanki chrzęstnej, tkanki kostnej, wątroby, jak również tkanki mięśnia sercowego [4-8].

Specyficzną grupę biomateriałów stanowią włókna alginianowe, a przede wszystkim włókna z alginianu wapnia, uzyskane w wyniku podstawienia w kąpieli zestalającej jonów Na<sup>+</sup> jonami Ca<sup>2+</sup>. Włókna te znalazły szerokie zastosowanie w wytwarzaniu nowoczesnych opatrunków, bandaży, absorbentów, które pod wpływem wydzieliny z rany przechodzą częściowo w postać żelu, umożliwiając łatwą zmianę opatrunku, a tym samym zmniejszając odczucie bólu przez pacjenta.

W związku z tym, iż właściwości sorpcyjne związane są przede wszystkim z hydrofilowym charakterem tworzywa, jak to już analizowano w naszych wcześniejszych pracach [9-11] celem niniejszej pracy było przeprowadzenie analizy porównawczej struktury nadmolekularnej i właściwości wytrzymałościowych nanokompozytowych włókien z alginianu wapnia. W analizie wykorzystano włókna formowane w optymalnych warunkach dla zawierających dany rodzaj nanododatku.

# EFFECT OF THE PRESENCE OF NANOADDITIVES ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF CALCIUM ALGINATE FIBRES

Maciej Boguń<sup>1\*</sup>, Teresa Mikołajczyk<sup>1</sup>, Stanisław Rabiej<sup>2</sup>, Ewa Stodolak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES, FACULTY OF MATERIAL TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND <sup>2</sup>INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS, FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENT SCIENCES, UNIVERSITY OF BIELSKO - BIAŁA <sup>3</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW \*MAILTO: MACIEK.BOGUN@WP.PL

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 189-193]

## Introduction

.....

Biomaterials engineering is currently one of the most rapidly developing branches of science. The use in modern medicine of biocomposites based on both nanotechnology and fibrous materials makes it possible to develop biomaterials which may in the future play a significant role in regenerative medicine. The introduction of bioactive nanoadditives into fibres, and thus into the biocomposite, can be expected to lead to significantly faster treatment of patients, and consequently reduced hospitalization times.

One of the polymers playing a particular role in materials engineering is sodium alginate, which has found wide application in the production of specialized dressing materials [1]. A new area of application for this polymer may be its use in tissue engineering. Alginate is a linear polysaccharide, built of radicals of  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) and  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) [2], usually having an alternating structure of the type MMMGGGMG [3]. This polymer has properties which are very important from a medical standpoint, namely nontoxicity, antibacterial properties, unique tissue compatibility and controlled biodegradation time. Alginates in various forms have been used in tissue engineering for the treatment and regeneration of skin, cartilage, bone tissue, the liver, and heart muscle tissue [4-8].

A specific group of biomaterials is alginate fibres, and especially fibres made of calcium alginate, obtained by the substitution of Ca<sup>2+</sup> ions for Na<sup>+</sup> ions in a solidifying bath. These fibres have found wide application in the production of modern dressings, bandages and absorbents which, under the influence of secretion from the wound, transform partially into gel, making it easier to change the dressing, and thus reducing the pain felt by the patient.

Since the sorption properties are associated primarily with the hydrophilic nature of the material, as has been analysed in our earlier works [9-11], the purpose of the present work was to perform a comparative analysis of the supramolecular structure and strength properties of calcium alginate nanocomposite fibres. The fibres used in the analysis were formed in optimum conditions for those containing a given type of nanoadditive. 190

#### Materiały i metody badawcze

Do sporządzania roztworów przędzalniczych stosowany był alginian sodowy firmy FMC Biopolimer (Norwegia) o nazwie handlowej Protanal LF 10/60LS, o lepkości istotnej η=3,16dL/g. Polimer ten charakteryzuje się przewagą bloków pochodzących od kwasu mannuronowego (do 65%) w stosunku do reszt kwasu guluronnowego. W pracy wykorzystano następujące nanododatki:

 hydroksyapatyt (HAp) Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> otrzymany w AGH Kraków

• β-trójfosforan wapnia (TCP) Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> produkt handlowy firmy Chempur Polska:

 krzemionkę SiO<sub>2</sub> produkt handlowy firmy Sigma Aldrich;

 bioszkło otrzymane w AGH Kraków i charakteryzujące się następującym składem tlenkowym: CaO-16%mol, SiO<sub>2</sub>-80%mol, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-4%mol.;

 montmorylonit (MMT) otrzymany w AGH Kraków z bentonitu ze złoża Jelesovy Potok.

Włókna formowano metodą z roztworu na mokro przy zastosowaniu przędzarki wielkolaboratoryjnej umożliwiającej stabilizację parametrów technologicznych na założonym poziomie oraz ciągłą ich kontrolę, a dokładny opis procesu formowania został zawarty w pracy [9].

Wytrzymałość właściwa włókien została wyznaczona zgodnie z normą PN-EN ISO 5079:1999

Stopień krystaliczności i wielkość obszarów krystalicznych wyznaczono metodą szerokokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (WAXS). Badania wykonano za pomocą dyfraktometru URD 6 firmy Seifert (Niemcy) wyposażonego w lampę miedziową emitującą promieniowanie o długości fali λ=1.54Å przy parametrach zasilania U=40kV i I=30mA. Stosowano promieniowanie monochromatyzowane przy pomocy monochromatyzatora krystalicznego. Krzywe dyfrakcyji

## Materials and methods

Spinning solutions were prepared with sodium alginate from FMC Biopolymer (Norway) with trade name Protanal LF 10/60LS, with intrinsic viscosity  $\eta$ =3.16dL/g. This polymer is characterized by a predominance of blocks derived from mannuronic acid (up to 65%) over radicals of guluronic acid. The following nanoadditives were used in the work:

• hydroxyapatite (HAp) Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> obtained at the College of Mining and Metallurgy (AGH), Kraków;

 calcium β-triphosphate (TCP) Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> produced commercially by Chempur Poland;

• silica SiO<sub>2</sub>, produced commercially by Sigma Aldrich;

 bioglass obtained at AGH Kraków with oxide content CaO 16%mol, SiO<sub>2</sub> 80%mol, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 4%mol.;

 montmorillonite (MMT) obtained at AGH Kraków from bentonite from the Jelesovy Potok deposit.

Fibres were formed wet from solution with the use of a large laboratory spinning machine which enabled stabilization of the technological parameters at the desired level and constant monitoring of those parameters. A full description of the forming process can be found in [9].

The intrinsic strength of the fibres was determined in accordance with the PN-EN ISO 5079:1999 standard.

The degree of crystallinity and size of crystalline zones were determined by a wide-angle X-ray scattering (WAXS) method. Tests were performed with the use of a URD 6 diffraction meter from Seifert (Germany) having a copper lamp emitting radiation of wavelength  $\lambda$ =1.54Å at supply parameters U=40kV and I=30mA. Monochromatized radiation was used, with the use of a crystal monochromatizer. Diffraction curves were recorded using a reflection method and step measurement. The tested fibres were powdered using a microtome in order to eliminate texture, and then pressed into tablets with diameter c. 2cm and thickness 1mm. The

i tryb skokowy	rejestrowano st	osując metodę	oddiciową	precise methodo	biogy for deter	mining the deg	free of crysta
pomiaru. Bada- ne włókna były proszkowane przy pomocy mikrotomu w celu zlikwido-	Symbol próbki Sample symbol	Wyciąg filierowy As-spun draw ratio [%]	Rozciąg całkowity Total draw- ing [%]	Stopień krysta- liczności Degree of crystallinity [%]	D <sub>100</sub> (M) [nm]	D <sub>110 / 011</sub> (G) [nm]	D <sub>101</sub> (M /G) [nm]
rv a nastennie	AC 2	70	120,40	31	4.6	4.5	5.3
nrasowane w	AH 2	70	103,58	25	5.3	5.3	5.3
tabletki o śred-	AT 2	70	100,66	27	6,2	4,2	4,8
nicy ok 2cm i	AS 2	70	79,06	24	5,3	4,2	5,2
grubości 1mm.	AM 2	70	89,27	27	6,2	5,2	5,1
Dokładna me-	AB 4	110	88,09	25	5,5	4,1	5,9
todyka ozna- czenia stopnia krystaliczności i rozmiarów kry- stalitów została przedstawiona	AC 2 - włókna z a AH 2 - włókna z a AT 2 - włókna z a AS 2 - włókna z a AM 2 - włókna z a AB 4 - włókna z a	alginianu wapnia l alginianu wapnia z Ilginianu wapnia z alginianu wapnia z alginianu wapnia z alginianu wapnia z	bez nanododatku zawierające 3% awierające 3% 1 zawierające 3% zawierające 3% zawierające 3% 1	IAC 2 - fibre:HApAH 2 - fibre:"CPAT 2 - fibre:SiO2AS 2 - fibre:MMTAM 2 - fibre:pioszkłoAB 4 - fibre:	s without nanoa s containing 3% s containing 3% s containing 3% s containing 3% s containing 3%	dditive 6 HAp 7CP 6 SiO <sub>2</sub> 6 MMT 6 Bioglass	
w pracach 191							

w pracach [9] Dyskusja

Z analizy danych zawartych w TABELI 1 można zauważyć, że stopień krystaliczności włókien zawieTABELA 1. Stopień krystaliczności i rozmiary krystalitów włókien z alginianu wapnia.  $D_{100}$  (M) – rozmiar krystalitów w kierunku prostopadłym do płaszczyzn (100) w krystalitach mannuronowych, D<sub>110/011</sub> (G) – średni rozmiar krystalitów w kierunkach prostopadłych do płaszczyzn (110) i (011) w krystalitach guluronowych, D<sub>101</sub> (M /G) - średni rozmiar krystalitów w kierunkach prostopadłych do płaszczyzn (101) w krystalitach guluronowych i mannuronowych.

TABLE 1. Degree of crystallinity and dimensions of crystallites of calcium alginate fibres.  $D_{100}$  (M) – average size of crystallites in the direction perpendicular to the planes (100) in crystallites formed of M blocks. D<sub>110/011</sub> (G) - average size of crystallites in the direction perpendicular to the planes (110) and (011) in crystallites formed of G blocks. D<sub>101</sub> (M /G) - average size of crystallites in the direction perpendicular to the planes (101) both in crystallites formed of M and G blocks.



RYSUNEK 1.. Rozkład krzywej dyfrakcyjnej włókien alginianowych z nanododatkiem MMT formowanych przy rozciągu filierowym +70% - próbka AM1. Na rysunku podane są indeksy Millera poszczególnych pików krystalicznych. Piki pochodzące od krystalitów zbudowanych z bloków malluronowych i guluronowych oznaczone są odpowiednio literami M i G. Składowe amorficzne oznaczone są symbolami A1 i A2. Pik pochodzący od nanododatku montmorylonitu oznaczony jest symbolem MMT.

FIGURE 1. Distribution of the diffraction curve for alginate fibres with MMT nanoadditive formed at +70% pull-out at the spinning nozzle – sample AM2. The diagram shows the Miller indices for the particular crystalline peaks. Peaks corresponding to crystallites built of mannuronic and guluronic blocks are marked M and G respectively. Amorphous components are marked A1 and A2. The peak from the montmorillonite nanoadditive is marked MMT.

rających nanododatki maleje w porównaniu do włókien niezawierających nanododatków. Jednakże stopień krystaliczności kształtuje się na dość niskim poziomie 24–27% w zależności od stosowanego nanododatku. Najprawdopodobniej, jest to spowodowane stosunkowo wysoką koncentracją wapnia w tworzywie włókien. Negatywny wpływ obecności wapnia na stopień krystaliczności włókien alginianowych był już opisywany w literaturze [12,13], nie został on jednak całkowicie wyjaśniony.

Analiza wyników uzyskanych w naszych wcześniejszych pracach [9-11] oraz danych literaturowych prowadzi do wniosku, że zmniejszona zdolność do krystalizacji jest związana z powstawaniem stref połączeń typu "eggs-box", jakie tworzą się między dwoma blokami guluronowymi znajdującymi się w dwóch sąsiadujących ze sobą makrocząsteczkach alginianu. Specyficznym spośród stosowanych

nanododatków jest montmorylonit, posiadający budową warstwową. Badania rentgenowskie włókien alginianowych zawierających montmorylonit (RYSUNEK 1) wykazały, że wprowadzenie MMT do tworzywa włókna spowodowało znaczne zmniejszenie się wysokości charakterystycznego piku występującego na dyfraktogramach MMT (RYSUNEK 2), a także zmianę jego położenia. Pik ten przesuwa się w stronę mniejszych kątów. Oznacza to wzrost odległości bazowej montmorylonitu, co jest spowodowane interkalacją, czyli penetracją makrocząsteczek alginianu do wnętrza galerii znajdujących się pomiędzy warstwami glinokrze-

linity and dimensions of crystallites is described in [9].

191

#### **Discussion of results**

Analysis of the data contained in TABLE 1 indicates that the degree of crystallinity of fibres containing nanoadditives decreases in comparison with fibres not containing nanoadditives. However the degree of crystallinity is at the fairly low level of 24-27%, depending on the nanoadditive used. This is probably due to the relatively high concentration of calcium in the fibre material. The negative effect of the presence of calcium on the degree of crystallinity of alginate fibres has already been described in the literature [12,13], although it has not been fully explained.

Analysis of the results obtained in our earlier work [9-11] and data from the literature leads to the conclusion that the reduced propensity for crystallization is associated with the formation of zones of "egg-box" type links, created between two guluronic blocks in two neighbouring alginate macromolecules. Notable among the nanoadditives used is montmorillonite, which has a layer structure.



RYSUNEK 2. Krzywa dyfrakcyjna WAXS montmorylonitu. FIGURE 2. WAXS diffraction curve for montmorillonite.

X-ray analysis of alginate fibres containing montmorillonite (FIGURE 1) showed that the addition of MMT to the fibre material caused a significant decrease in the height of the characteristic peak occurring on the MMT diffractograms (FIGURE 2), as well as a change in its position. This peak moves towards smaller angles. This indicates an increase in the base distance of montmorillonite, which is caused by intercalation – the penetration of macromolecules of alginate into the spaces between the aluminosilicate layers, pushing them apart. In turn the small height of this peak indicates 192

mianowymi i ich rozpychaniem Natomiast nie wielka wysokoś rozważaneg piku wskazuj na to, że praw dopodobnie juz w roztworz przędzalniczyn i następnie v tworzywie włó kien, wskute zmieszania alginianem część pakie tów MMT uległ eksfoliacji, czyli oddzieleniu się i rozproszeniu

n - ć	Symbol próbki Sample	Wyciąg filierowy [%] As-spun draw	Rozciąg całkowity [%] Total	iąg Naprężenia wity Deformacja Rozciągające Wytrzymałość ] całkowita Drawing stress właściwa al Total defor- [cN/tex] Tenacity		Naprężenia Rozciągające Drawing stress [cN/tex]		Względne wy- dłużenie przy zeraniu	
o e	symbol	ratio [%]	drawing [%]	mation	$\sigma_{\text{zest}}$	$\sigma_{plast}$	$\sigma_{para}$	[cN/tex]	Elongation of break[%]
'-	AC 2	70	120,40	3,747	0,030	2,719	2,156	28,07±0,68	10,00±0,39
ż	AH 2	70	103,58	3,461	0,050	2,628	2,291	26,03±0,97	9,77±0,44
e	AT 2	70	89,27	3,217	0,029	1,850	1,605	24,39±	10,39±
n	AS 2	70	88,09	3,197	0,047	1,625	1,453	22,86±0,69	9,23±0,47
V	AM 2	70	100,66	3,411	0,032	2,113	1,799	25,95±	10,63±
-	AB 4	110	79,06	3,756	0,043	2,160	2,149	24,73±1,08	7,20±0,65
K Z ,	$\sigma_{zest}$ - stress in the solidification process (plastification bath) $\sigma_{para}$ - stress in the second drawing process (saturated water vapour at a temperature of 135§C)								
a									

# TABELA 2. Właściwości wytrzymałościowe włókien z alginianu wapnia.TABLE 2. Strength properties of calcium alginate fibres.

poszczególnych warstw w objętości polimeru. Niemniej, pomimo zmniejszenia wysokości, refleks nie zanikł całkowicie co dowodzi, że oprócz rozproszonych warstw glinokrzemianowych, wytworzone kompozyty nadal zawierają uporządkowane pakiety.

Jak to analizowano we wcześniejszych pracach [9-11] właściwości wytrzymałościowe włókien, o sztywnej budowie makrocząsteczki, uzależnione są nie tylko od wielkości rozciągu całkowitego, ale głównie deformacji jeszcze płynnej strugi (zachodzącej w wyniku działania podłużnego gradientu prędkości) oraz wartości naprężeń pod wpływem których ma miejsce kształtowanie się struktury świeżo zestalonych włókien. Z analizy danych zawartych w TABELI 2 wynika, iż obecność nanododatków wpływa na obniżenie podatności tworzywa na deformację w etapie rozciągu, co skutkuje obniżeniem właściwości wytrzymałościowych włókien. Przy jednakowych parametrach procesu zestalania i etapów rozciągu najwyższą wartość R<sub>c</sub>=120% uzyskuje się dla włókien bez nanododatku, a najniższą R<sub>2</sub>=88,1% dla włókien zawierających SiO2. Jednocześnie, proces rozciągu w kapieli plastyfikacyjnej realizowany jest w tym etapie pod wpływem naprężeń niższych o 1,1 cN/tex w porównaniu do włókien bez nanododatku.

Efektem tego jest obniżenie wytrzymałości właściwej włókien zawierających SiO<sub>2</sub> o 5,2cN/tex w porównaniu do włókien bez nanododatku. Analogiczna zależność zachodzi również dla innych włókien nanokompozytowych. Można więc sądzić, iż obecność w zestalającej się strudze i rozciąganym włóknie nanododatków ceramicznych wpływać bedzie na tarcie wewnetrzne układu poddawanego procesom deformacyjnym. Tarcie to będzie zależało od wielkości ziaren nanododatku i jego oddziaływań z makrocząsteczkami tworzywa. Obecność pomiędzy makrocząsteczkami nanododatku utrudniać będzie ich wzajemny poślizg. Spowoduje to obniżenie możliwej do uzyskania wielkość deformacji. Jednocześnie proces zachodzi pod wpływem niższych naprężeń w porównaniu do włókien bez nanododatku [9]. Oba te parametry wpływają (jak to analizowano we wcześniejszych pracach [9-11]) na właściwości wytrzymałościowe włókien.

# Podsumowanie

Z analizy struktury krystalicznej zarówno włókien zawierających nanododatki, jak i bez nanododatku wynika, iż jej powstawaniu sprzyja deformacja jeszcze płynnej strugi. Natomiast ograniczeniem jest sztywna budowa makrocząsteczki tworzywa i występowanie struktury typu "eggs-box". that probably already in the spinning solution and then in the fibre material, as a result of mixing with alginate, some of the MMT packets have undergone exfoliation – separation and dispersion of the layers within the volume of the polymer. Nonetheless, in spite of the reduced height, the reflex did not vanish completely, which shows that, apart from the dispersed aluminosilicate layers, the produced composites still contain ordered packets.

As has been analysed in earlier work [9-11], the strength properties of fibres with rigid macromolecular structure depend not only on the value of the total stretch, but chiefly on the deformation of the still liquid stream (resulting from the lengthwise velocity gradient) and the value of the stresses under which the structure of freshly solidified fibres is shaped. Analysis of the data in Table 2 shows that the presence of nanoadditives causes a decrease in the deformability of the material at the stretching stage, which leads to a reduction in the strength properties of the fibres. At uniform parameters for the solidification process and stages of stretching, the highest value (R<sub>c</sub>=120%) is obtained for fibres without nanoadditive, and the lowest (R = 88,1%) for fibres containing SiO<sub>2</sub>. At the same time, the process of stretching in a plasticization bath is carried out at that stage under stresses which are lower by 1.1 cN/tex in comparison with the fibres without nanoadditive.

The result of this is a reduction in the intrinsic strength of fibres containing SiO<sub>2</sub> by 5.2 cN/tex compared with fibres without nanoadditive. An analogous relationship also holds for other nanocomposite fibres. It can therefore be concluded that the presence of ceramic nanoadditives in the solidifying stream and stretched fibre will affect the internal friction of the system being subjected to deformation processes. This friction will depend on the size of the grains of nanoadditive and its interaction with the macromolecules of the material. The presence of nanoadditive between macromolecules will make it harder for them to slip against one another, causing a reduction in the attainable deformation value. At the same time the process takes place under lower stresses compared with fibres without nanoadditive [9]. Both of these parameters (as has been analysed in earlier work [9-11]) affect the strength properties of the fibres.

# Summary

Analysis of the crystal structure of fibres containing nanoadditives and those without nanoadditive shows that its formation is favoured by deformation of the still fluid stream. A constraint, however, is the rigid structure of the macromolecule of the material and the presence of an "egg-

Związany jest z tym zarówno niski stopień krystaliczności włókien bez nanododatku 31%, jak i jeszcze niższy stopień krystaliczności włókien nanokompozytowych na poziomie 24–27%.

Właściwości wytrzymałościowe włókien alginianowych uzależnione są od struktury wytworzonej w etapie zestalania, wartości naprężeń w poszczególnych etapach procesów deformacyjnych oraz od wielkości rozciągu całkowitego. W przypadku włókien zawierających MMT, dodatkowym pozytywnie działającym czynnikiem jest częściowa eksfoliacja pakietów MMT. Z wprowadzeniem do tworzywa włókien alginianowych różnego typu ceramicznych nanododatków związane jest obniżenie podatności na deformacje, co skutkuje ich niższymi od 2 do 6 cN/tex właściwościami wytrzymałościowymi w porównaniu do włókien bez nanododatku.

## Podziękowania

Badania finansowane przez Ministerswo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2008-2010 w ramach projektu badawczo-habilitacyjnego 3809/B/T02/2008/35.

## Piśmiennictwo

[1]. Kong, H.J.; Kaigler, D.; Kim, K.; Mooney, D.J. Biomacromolecules 2004, 5, 1720

[2]. Draget, K.I.; Skjåk-Brćk, G.;Simdsrřd, O. Int. J. Biol. Macromol. 1997, 21, 47

[3]. Mřrch, Y.A.; Donati, I.; Strand, B.L.; Skjĺk-Brćk, G. Biomacromolecules 2007, 8, 2809

[4]. Hashimoto, T.; Suzuki, Y.; Yamamoto, E.; Tanihara, M.; Kakimaru, Y.; Suzuki, K.; Biomaterials 2004, 25, 1407

[5]. Bouhadir, K.H.; Lee, K.Y.; Alsberg, E.; Damm, K.L.; Anderson, K.W.; Mooney, D.J. Biotechnol. Prog. 2001, 17, 945

[6]. Alsberg, E.; Anderson, K.W.; Albeiruti, A.; Franceschi, R.T.; Mooney, D.J. J.Dent. Res. 2001, 80, 2025

[7]. Chung, T.W.; Yang, J.; Akaike, T.; Cho, K.Y.; Nah, J.W.; Kim, S.I.; Cho, C.S. Biomaterials 2002, 23, 2827

box" structure. This is connected both with the low degree of crystallinity of fibres without nanoadditive (31%), and the even lower degree of crystallinity of nanocomposite fibres (24-27%).

The strength properties of alginate fibres depend on the structure formed at the solidification stage, the values of the stresses at particular stages of the deformation processes, and the value of the total stretch. In the case of fibres containing MMT, an additional positively acting factor is the partial exfoliation of the MMT packets. The introduction of various types of ceramic nanoadditive into the material of the alginate fibres is associated with a reduction in deformability, a result of which is that their strength properties are between 2 and 6 cN/tex lower than in the case of fibres without nanoadditive.

# Acknowledgement

Research financed by the Minister of Science and Higher Education in 2008-2010 as project No. 3809/B/ T02/2008/35.

#### References

[8]. Nie, H.; He, A.; Zheng, J.; Xu, S.; Li, J.; Han, Ch.C. Biomacromolecules 2008, 9, 1362

[9]. Boguń, M.; Mikołajczyk, T.; Rabiej, S. J Appl Polym Sci 2009, 114, 70

[10]. Boguń, M.; Rabiej, S. The influence of fibre formation conditions on the structure and properties of nanocomposite alginate fibres containing tricalcium phosphate or montmorillonite J Polym Composite - w druku

[11]. Boguń, M. Nanocomposite calcium alginate fibres containing SiO2 and bioglass, Polym Biull - w druku

[12]. Sikorski,P.; Frode, M.; Skjak-Brćk,G.; Stokke, B.T. Biomacromolecules 2007,8,2098.

[13]. Fabia, J.; Ślusarczyk, C.; Gawłowski, A.; Graczyk, T.; Włochowicz, A.; Janicki, J. Fibres Text Estern Eur 2005, 13, 114

• • • • • • • • • • • • • • • • • •

# WPŁYW ILOŚCI HYDROKSYAPATYTU NA WŁAŚCIWOŚCI NANOKOMPOZYTOWYCH WŁÓKIEN PAN

GRZEGORZ SZPARAGA\*, TERESA MIKOŁAJCZYK

Katedra Włókien Sztucznych. Wydział Technologii Materiałowych i Wzornictwa Tekstyliów, Politechnika Łódzka \*MAILTOL: grzegorz.szparaga@gmail.com

#### Streszczenie

W pracy zbadano wpływ ilości nanododatku na właściwości nanokompozytowych włókien PAN zawierających hydroksyapatyt. Otrzymane włókna charakteryzują się wytrzymałością dochodzącą do 38,45 cN/tex oraz podwyższoną porowatością.

Słowa kluczowe: włókna prekursorowe, nanododatki.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 193-197]

# EFFECT OF QUANTITY OF HYDROXYAPATITE ON THE PROPERTIES OF PAN NANOCOMPOSITE FIBRES

GRZEGORZ SZPARAGA\*, TERESA MIKOŁAJCZYK

DEPARTMENT OF MAN MADE FIBRES, FACULTY OF MATERIAL TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ \*MAILTOL: GRZEGORZ.SZPARAGA@GMAIL.COM

# Abstract

This paper explores the influence of the quantity on the properties of nanocomposite PAN fibres containing hydroxyapatite.

The fibres obtained were characterized by a tensile strength of 38,45 cN/tex and an increased porosity. **Key words**: precursor fibres, nanoadditives.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 193-197]

Zastosowanie nanokompozytu poliakrylonitrylu (PAN) i hydroksyapatytu (HAp), jako prekursora do otrzymywania włókien węglowych, stwarza możliwość otrzymania nowej generacji nanokompozytowych materiałów węglowych do zastosowań medycznych. Włókna węglowe od lat wykorzystywane są w medycynie (ze względu na wysokie właściwości wytrzymałościowe oraz biozgodność z tkankami) w postaci kompozytów węglowo-polimerowych jako łączniki, płytki i śruby [1]. Hydroksyapatyt natomiast jest materiałem budową zbliżoną do substancji nieorganicznej kości, charakteryzującym się wysoką biozgodnością w stosunku do tkanek i kości [1]. Stosowany jest on między innymi do wytwarzania implantów [1], jak również jest nanoszony na powierzchnię implantów w celu polepszenia ich biozgodności i lepszego zespolenia z tkanką kostną [2].

Połączenie obu tych materiałów w formie nanokompozytowych włókien poliakrylonitrylowych [3, 4], a następnie otrzymanie na ich bazie włókien węglowych umożliwiło otrzymanie nowego typu materiału implantacyjnego wykazującego korzystne z punktu widzenia medycyny właściwości [5].

Ponadto, jak to wykazały prace [3, 4], włókna prekursorowe zawierające 3% hydroksyapatytu charakteryzowały się szeregiem interesujących właściwości. Zaobserwowano bowiem wzrost porowatości jak również wzrost stopnia krystaliczności tego typu włókien w porównaniu do włókien niezawierających nanododatku. Interesujące wyniki tych prac skłoniły autorów niniejszej pracy do kontynuacji badań, celem określenia wpływu ilości nanododatku HAp na strukturę porowatą i właściwości wytrzymałościowe nanokompozytowych włókien PAN.

#### Materiały i metody badawcze

Do sporządzenie roztworów przędzalniczych PAN w dwumetyloformamidzie (DMF) stosowano kopolimer statystyczny trójskładnikowy produkcji węgierskiej firmy Zoltek.

Lepkość istotna kopolimeru wyznaczona w temperaturze 20°C w DMF-ie wynosiła 1,29dl/g.

Polidyspersyjność wyznaczono metodą chromatografii żelowej i wynosiła Mw/Mn=3,1.

W pracy stosowano hydroksyapatyt otrzymany w AGH Kraków.

Rozkład wielkości nanosrebra badany był przy użyciu aparatu Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern Inc. wykorzystującego do tego celu technikę dynamicznego rozpraszania światła laserowego (Dynamic Light Scattering). Metoda pomiarowa bazuje na ruchach Browna cząstek w cieczy i pozwala na pomiar cząstek o średnicach (równoważnych) od 0,1nm do ok. 6µm zarówno w środowisku wodnym jak i niewodnym.

Analizując rozkład wielkości cząstek hydroksyapatytu stwierdzono, iż prawie 98% próbki stanowią cząstki z przedziału wielkości 100-800nm. Maksimum tego przedziału przypada na wartość 82 nm.

Właściwości reologiczne roztworów przędzalniczych oznaczano przy zastosowaniu reometru rotacyjnego Anton Paer. Pomiary przeprowadzono w zakresie szybkości ścinania 0,2–200s<sup>-1</sup> w temperaturze 20°C. Parametry reologiczne "n" i "k" wyznaczono na podstawie krzywych płynięcia.

Wytrzymałość właściwą przy zerwaniu wyznaczano dla wiązki włókien według Normy PN-EN-ISO-268:1997, przy użyciu maszyny wytrzymałościowej typu Instron.

Porowatość włókien oznaczono metodą porozymetrii rtęciowej stosując porozymetr Carlo-Erba sprzężony z systemem komputerowym, umożliwiający oznaczenie

## Introduction

The use of polyacrylonitrile (PAN) and hydroxyapatite (HAp) nanocomposite, as a precursor to the obtaining of carbon fibres, is an opportunity to produce a new generation of nanocomposite carbon materials with medical applications. Carbon fibres have been used in medicine for many years (due to their high strength properties and biocompatibility with tissue) in the form of carbon-polymer composites, as connectors, plates and screws [1]. Hydroxyapatite, in turn, is a material with a structure similar to an inorganic bone substance, displaying high biocompatibility with tissues and bone [1]. Its uses include the making of implants [1], and it is also applied to the surface of implants to improve their biocompatibility and combination with bone tissue [2].

The combination of these two materials in the form of nanocomposite polyacrylonitrile fibres [3, 4], then used to obtain carbon fibres, has made it possible to produce a new type of implant material whose properties are favourable from the medical point of view [5].

Moreover, as work has shown [3, 4], precursor fibres containing 3% hydroxyapatite demonstrate a number of interesting properties. Increased porosity has been observed, as well as an increase in the degree of crystallinity of fibres of this type compared with fibres not containing nanoadditive. The interesting results of this work encouraged the present authors to continue these investigations in order to determine the effect of the quantity of HAp nanoadditive on the porous structure and strength properties of PAN nanocomposite fibres.

# Materials and methods

For the preparation of spinning solutions of PAN in dimethylformamide (DMF) a triple-component statistical copolymer from the Hungarian firm Zoltek was used. The intrinsic viscosity of the copolymer determined at a temperature of 20°C in DMF was 1.29dl/g.

Polydispersivity was determined by gel chromatography and amounted to Mw/Mn=3.1.

The hydroxyapatite used was obtained at AGH Kraków.

The size distribution of nanosilever was investigated with a Zetasizer Nano-ZS apparatus from Malvern Inc., using a Dynamic Light Scattering technique. The measurement method is based on Brownian motion of particles in fluid, and enables the measurement of particles of (equivalent) diameters from 0.1nm to c. 6µm in both aqueous and nonaqueous environments.

Analysing the size distribution of hydroxyapatite particles it was found that almost 98% of the sample consisted of particles in the size range 100–800nm. The maximum of this range is at 825nm.

The rheological properties of spinning solutions were found using an Anton Paer rotary rheometer. Measurements were carried in within a shearing velocity range of 0.2–200s<sup>-1</sup> at a temperature of 20°C. The rheological parameters n and k were determined from the flow curves.

The intrinsic tearing strength was determined for bundles of the fibres in accordance with the PN-EN-ISO-268:1997 standard, using an Instron strength-testing machine.

The porosity of the fibres was found by mercury porosimetry, using a Carlo-Erba porosimeter connected to a computer system, enabling determination of total pore volume, proportion by volume of pores in the size range 5–7500nm, and the total internal surface area of pores.

The fibres were formed according to the method described in [6].

całkowitej objętości por, udziału objętościowego por o rozmiarach z zakresu 5–7500nm oraz całkowitej powierzchni wewnętrznej por.

Włókna formowano zgodnie z metodyką podaną w pracy [6].

# Dyskusja wyników

Właciwości reologiczne płynów przędzalniczych decydują o rozkładzie prędkości podczas przepływu płynu przędzalniczego w kanaliku filiery, efekcie rozszerzenia strugi po wyjściu z kanalika oraz rozkładzie prędkości i podłużnego gradientu prędkości zmieniających się wzdłuż drogi formowania. Decydują także o stabilności procesu formowania. Właściwości reologiczne płynu i wartości parametrów reologicznych n i k uzależnione są także od obecności w nim różnego rodzaju nanododatków [6]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż obecność nanododatku w roztworze przędzalniczymi w ilości 1, 3 i 5% nie powoduje zmiany charakteru płynów. Badane roztwory pozostają cieczami nienewtonowskimi rozrzedzonymi ścinaniem bez granicy płynięcia. Wartość parametru reologicznego n, ulega nieznacznym zmianom. Obserwuje się natomiast niewielki spadek wartości parametru reologicznego k, opisującego konsystencję roztworu, związany z wprowadzeniem nanododatku do roztworu. W przypadku roztworów zawierających hydroksyapatyt wartość tego parametru wynosiła w przybliżeniu 23 natomiast dla roztworu niezawierającego nanododatku wynosiła odpowiednio 25,1.

Na podstawie przeprowadzonych badań wpływu ilości hydroksyapatytu na właściwości nanokompozytowych włókien poliakrylonitrylowych stwierdzono, iż właściwości wytrzymałościowe otrzymanych włókien zawierają się w granicach od 35,42 do 38,45cN/tex, przy czym najniższą wartość wytrzymałości właściwej wykazują włókna zawierające 5% nanododatku. Wytrzymałość włókien niezawierających nanododatku, formowanych w analogicznych warunkach wynosi odpowiednio 39,12cN/tex. Obserwowane różnice w wartości wytrzymałości właściwej otrzymanych włókien związane są głównie z wartością rozciągu całkowitego, któremu zostały poddane włókna w etapie ich wytwarzania i nadaną w tym etapie orientacją elementów struktury włókien. Najwyższą wytrzymałość, na poziomie 39,12cN/tex, wykazują bowiem włókna niezawierające nanododatku, dla **Discussion of results** 

The rheological properties of spinning liquids determine the distribution of velocities when the liquid flows in the channel of the spinning nozzle, the effect of widening of the stream after leaving the channel, and the distribution of velocities and lengthwise gradient of velocity as it varies along the forming route. They also determine the stability of the forming process. The rheological properties of the liquid and the values of the rheological parameters n and k also depend on the presence in it of various types of nanoadditives [6]. Based on the tests carried out it was found that the presence of nanoadditive in the spinning solution in quantities of 1, 3 and 5% did not cause a change in the nature of the liquids. The considered solutions remain non-Newtonian fluids diluted by shearing without flow boundary. The value of the rheological parameter n experiences slight changes. A small fall is observed in the value of the rheological parameter k (which describes the consistency of the solution) when nanoadditive is introduced into the solution. In the case of solutions containing hydroxyapatite, the value of this parameter was close to 23, while for a solution not containing nanoadditive the corresponding value was 25.1.

Based on investigations of the effect of hydroxyapatite on the properties of polyacrylonitrile nanocomposite fibres it was found that the strength properties of the fibres obtained were within the range 35.42 to 38.45 cN/tex, the lowest value of intrinsic strength being obtained for fibres containing 5% nanoadditive. The strength of fibres not containing nanoadditive, formed in analogous conditions, was 39.12cN/tex. The observed differences in the intrinsic strength value of the obtained fibres are chiefly connected with the value of the total stretch to which the fibres were subjected at the stage of their production and the orientation of elements of the fibre structure applied at that stage. The highest strength, 39.12cN/tex, was displayed by fibres not containing nanoadditive, for which the value of the total stretch was 844%.

Among the nanocomposite fibres, the highest strength (38.45 cN/tex) was obtained for PAN H2 fibres containing 3% nanoadditive. The lowest strength value was that of the fibres denoted PAN H3, equal to 35.42cN/tex.

Analysing the deformations applied to the fibres at various stages of the stretching process, it can be observed that in

których wartość rozciągu całkowitego wynosiła 844%.

Spośród włókien nanokompozytowych najwyższą wytrzymałość wynoszącą 38,45cN/tex wykazują włókna PAN H2 zawierające 3% nanododatku. Najniższą wytrzymałością charakteryzują się natomiast włókna o symbolu PAN H3, dla których wartość tego wskaźnika wynosi 35,42 cN/tex.

Analizując wartości deformacji nadanych włóknom na poszczególnych etapach procesu rozciągania zaobserwować można, iż w przypadku włókien zawierających hydroksy-

Symbol próbki Sample symbol	llość nanododatku Amount of nanoadditive 1%l	<ul> <li>Parametry reologiczne roztworów przedzalniczych</li> </ul>	Rheological parameters of spinning solutions	Rozciag w kapieli plastyfikacyjnej Drawing in plasticization batch [%]	Rozciąg w parze Drawing in steam [%]	Rozciag całkowity Total drawing [%]	Wytrzymałość właściwa Tenacity [cN/tex]	Wydłużenie przy zerwaniu Elongation at break [%]	Całkowita objęgość por Total volume of pores [ cm³/g]	Powierzchnia wewnętrzna Total internal surface [m²/g]
P 3	0	0,96	25,10	196	218	844	39,12	11,23	0,316	6,578
PAN H1	1	0,973	22,92	233	159	764	37,85	11,83	0,531	52,035
PAN H2	3	0,966	23,08	265	147	805	38,45	11,21	0,317	25,027
PAN H3	5	0,959	23,01	276	128	757	35,42	11,45	0,525	61,576

TABELA 1. Parametry reologiczne roztworów przędzalniczych i właściwości włókien z nich otrzymanych.

TABLE 1. Rheological parameters of spinning solutions and properties of the fibres obtained from them. 196

apatyt zdecydowanie większą podatność na deformację wykazywały one w pierwszym etapie rozciągu. W przypadku włókien niezawierających nanododatku większą wartość deformacji uzyskiwano w drugim etapie procesu rozciągania. Świadczyć to może o tym, iż w przypadku włókien zawierających hydroksyapatyt, struktura tych



RYSUNEK 1. Zależność udziału objętościowego por w funkcji ich promienia. FIGURE 1. Proportion of pores by volume as a function of their radius.

włókien kształtuje się głównie już podczas pierwszego etapu ich rozciągania. Ponadto struktura ta jest na tyle zwarta, iż podczas drugiego etapu rozciągu wartość możliwej do nadania deformacji jest zdecydowanie niższa, niż w przypadku włókien niezawierających nanododatku.

Z analizy struktury porowatej otrzymanych włókien wynika, iż z wprowadzeniem do tworzywa włókien PAN hydroksyapatytu związane jest znaczące zwiększenie powierzchni wewnętrznej włókien (od wartości 6,578m²/g – włókna bez nanododatku, do wartości 61,567m²/g – próbka PAN H3). Wzrostowi powierzchni wewnętrznej odpowiada wzrost udziałów por o najmniejszych wymiarach, widocznych jako pierwsze maksimum na wykresie rozkładu por w funkcji ich promienia. Również wartość całkowitej objętości por ulega zwiększeniu z wartości 0,316cm³/g do wartości 0,531cm³/g dla próbki PAN H1. Jednocześnie włókna o nanokompozytowe o najwyższej wytrzymałości właściwej, poddane najwyższej deformacji w etapie rozciągu, odznaczają się mniejszą wartością całkowitej objętości por – na poziomie włókien niezawierających nanodoatku.

# Podsumowanie

Z wprowadzeniem do tworzywa włókien PAN nanododatku HAp związane jest obniżenie ich właściwości wytrzymałościowych (w porównaniu do włókien bez nanododatku) w stopni uzależnionym od ilości wprowadzonego nanododatku oraz wielkości nadanej deformacji w etapie rozciągu.

Poziom wytrzymałości włókien nanokompozytowych rzędu 35-38cN/tex przy porowatości dochodzącej do 0,5 m<sup>3</sup>/g jest odpowiedni do ich zastosowania jako prekursora do otrzymywania włókien węglowych. uzyskanie z takiego prekursora włókna węglowe ze względu na obecność HAp przeznaczone będą do wytwarzania biomateriałów o właściwościach osteokonduktywnych.

# Podziękowania

Praca naukowa finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2008-2010 jako projekt badawczy (3808/B/T02/2008/35). the case of fibres containing hydroxyapatite they showed a significantly greater deformability at the first stage of stretching. In the case of fibres not containing nanoadditive a larger deformation was obtained at the second stage of the stretching process. This may indicate that in the case of fibres containing hydroxyapatite, the structure of these fibres is largely already formed during the first stage of stretching. Moreover the structure is so compact that at the second stage of stretching the value of possible deformation is significantly lower than in the case of fibres not containing nanoadditive.

Analysis of the porous structure of the obtained fibres shows that the addition of hydroxyapatite to PAN fibres leads to a significant increase in the internal surface area of the fibres (from 6.578 m2/g for fibres without nanoadditive to 61.567 m2/g in the case of sample PAN H3). The increase in internal surface area corresponds to the increase in the proportion of pores of the smallest sizes, visible as the first maximum on the graph of pore distribution as a function of radius. The value of total pore volume also increased, from 0.316cm<sup>3</sup>/g to 0.531cm<sup>3</sup>/g for sample PAN H1. At the same time the nanocomposite fibres with the highest intrinsic strength, subjected to the greatest deformation at the stretching stage, have the smallest value for total pore volume – at the same level as fibres not containing nanoadditive.

# Summary

The addition of HAp nanoadditive to the material of PAN fibres leads to a lowering of their strength properties (in comparison with fibres without nanoadditive) to a degree which depends on the quantity of nanoadditive and the size of the deformation applied at the stretching stage.

The strength value for nanocomposite fibres, around 35–38cN/tex, with a porosity approaching 0.5cm<sup>3</sup>/g, is appropriate for their use as a precursor for obtaining carbon fibres. The carbon fibres obtained from such a precursor will, in view of the presence of HAp, be used to produce biomaterials with osteoconductive properties.

# Acknowledgements

The autors thank the Ministry of Science and Higher Education for the financial support of this work (3808/B/ T02/2008/35).

# Piśmiennictwo

 M. Nałęcz; Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000; tom
 4 – Biomateriały, redaktorzy tomu: Stanisław Błażewicz, Leszek Stoch; Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT; Warszawa 2003
 I.F. Morris, S. Ochi; Hydroxyapatite coated implants: a case for their use; Journal of ora land maxillofacial burgery; Volume 56, Issue 11 (1998) 1303-1311

[3]. T. Mikołajczyk, S. Rabiej, M. Boguń; Analysis of the structural parameters of polyacrylonitrile fibers containing nanohydroxyapatite; Journal of Applied Polymer Science, Vol. 101 (2006) 760-765

[4]. T. Mikołajczyk, M. Boguń, S. Rabiej; comparative analysis of the structural parameters and strength properties of polyacrylonitrile fibers containing ceramic nanoadditives; Journal of Applied Polymer Science; Vol. 105 (2007) 2346-2350 [5]. I. Rajzer, E. Menaszek, M. Błażewicz; Carbon fibers for medical application; MEDTEX 2005: textiles for medical and therapeutic applications; biomaterials, their structure and applications; bioactive and biodegradable fibers: V international scientific conference : Łódź, 28–29 November 2005 : proceedings Polish Textile Association. - [Łódź, 2005]. S. 154–155

[6]. T. Mikołajczyk, G. Szparaga, G. Janowska; Polymers for Advanced Technologies; Influence of silver nano-additive amount on the supramolecular structure, porosity, and properties of polyacrylonitrile precursor fibers; Published online 2009.

. . . . . . . . . . . . . . . .

# WSTĘPNA OCENA BIOLOGICZ-NA KOMPOZYTÓW POLIOKSY-METYLEN/NANOSREBRO

Magdalena Ziąbka<sup>1\*</sup>, Anna Mertas<sup>2</sup>, Wojciech Król<sup>2</sup>, Jan Chłopek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, Al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków <sup>2</sup>Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze \*MAILTO: Ziabkam@gmail.com

# Streszczenie

W pracy przedstawiono ocenę morfologiczną i biologiczną kompozytu polioksymetylen/nanocząstki srebra otrzymanego w procesie wytłaczania i wtrysku. Badania komórkowe przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu. Na podstawie zmian w morfologii komórek (fibroblasty mysie 3T3 Balb), ich przeżywalności i zdolności do proliferacji oceniono stopień toksyczności materiałów. Wykorzystując technikę osadzania powierzchniowego przeprowadzono badania oceny aktywności przeciwbakteryjnej wobec bakterii Gram-dodatnich - Staphyloccocus aureus i Gram-ujemnych – Escherichia coli. Przeprowadzone badania komórkowe pokazały, że zarówno czysty polioksymetylen jak i modyfikowany nanosrebrem nie posiadają działania cytotoksycznego. Testy aktywności bakteriobójczej dowiodły natomiast, że materiały modyfikowane nanosrebrem wykazują niewielkie działanie bakteriobójcze wobec badanych bakterii.

Słowa kluczowe: nanokompozyty, polioksymetylen, nanosrebro, bakteriobójczość, cytotoksyczność [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 197-200]

# PRELIMINARY BIOLOGICAL EVALUATION OF POLYOXYMETHYLENE/ NANOSILVER COMPOSITES

Magdalena Ziąbka<sup>1\*</sup>, Anna Mertas<sup>2</sup>, Wojciech Król<sup>2</sup>, Jan Chłopek<sup>1</sup>

 <sup>1</sup>AGH-UST, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials,
 30 Mickiewicza Av., 30-059 Krakow, Poland
 <sup>2</sup>Medical University of Silesia - Katowice, Chair and Department of Microbiology and Immunology,
 19 Jordana St., 41-808 Zabrze, Poland
 \*MAILTO: Ziabkam@gmail.com

# Abstract

This paper presents morphological and biological evaluation of polyoxymethylene / silver nanoparticle composite produced in extrusion and injection moulding. Studies of cellular interactions were performed using direct contact method. The toxicity rate of materials was assessed on the basis of changes in cellular morphology (mouse fibroblasts 3T3 Balb), cell survivability and proliferation rates. Antibacterial activity against Gram-positive - Staphyloccocus aureus and Gram-negative - Escherichia coli bacteria was evaluated by means of surface deposition method. In studies of cellular interactions, both, pure polyoxymethylene and nanosilver-modified polyoxymethylene produced no cytotoxicity. Also, nanosilver-modified materials showed slight bactericidal activity against the tested bacteria.

Keywords: nanocomposites, polyoxymethylene, nanosilver, bactericidal, cytotoxicity [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 197-200] 31 MATERIALS

Częstą przyczyną niepowodzenia zabiegów operacyjnych związanych z implantacją jest pojawienie się komplikacji pooperacyjnych wywołanych powstaniem infekcji bakteryjnych w miejscu wprowadzenia wszczepu. Celem obniżenia ryzyka pojawienia się zakażenia proponuje się modyfikacje biomateriałów antybiotykami lub środkami antyseptycznymi. Jednakże działanie kuracji antybiotykowej może prowadzić do wystąpienia zjawiska oporności bakterii na zastosowany antybiotyk [1]. Prostym sposobem pozwalającym na uzyskanie biomateriałów posiadających funkcję bakteriostatyczną lub bakteriobójczą jest modyfikacja materiału poprzez wprowadzenie środka antybakteryjnego. Jednym z przykładów takiej modyfikacji może być zastosowanie nanocząstek miedzi, złota, tytanu, cynku oraz srebra [2]. Badania opisane w literaturze donoszą jednak, że nanocząstki srebra wykazują największą skuteczność wobec bakterii oraz innych mikroorganizmów [3].

Prezentowana praca miała na celu sprawdzenie czy kompozyt na bazie polioksymetylenu modyfikowanego nanoproszkiem srebra posiada funkcję bakteriobójczą przy jednoczesnym zachowaniu biozgodności.

# Materiały i metody

W niniejszej pracy zastosowano komercyjnie dostępny polioksymetylen – POM (Ultraform® firmy BASF, Niemcy) oraz nanoproszek srebra (firmy Sigma Aldrich) o rozmiarze cząstek poniżej 100nm.

Materiały kompozytowe zostały wytworzone w procesie obróbki termoplastycznej (wytłaczanie i wtrysk). W tym celu polimer został wysuszony w temperaturze 80°C przez okres dwóch godzin. Następnie POM oraz nanoproszek srebra (0.5%wag) zhomogenizowano przy użyciu współbieżnej wytłaczarki dwuślimakowej (PRISM Eurolab Digital). Nanokompozyty w postaci wiosełek otrzymano przy użyciu wtryskarki laboratoryjnej (DSM laboratory injection molding machine).

Otrzymane materiały zostały poddane ocenie mikrostrukturalnej (skaningowy mikroskop elektronowy (SEM, Jeol) wraz z przystawką do analizy chemicznej w mikroobszarach (EDS).

Materiały polimerowe POM oraz POM/Ag zostały pocięte na kwadraty o boku (10mm x 10mm) i poddane sterylizacji przy użyciu niskotemperaturowej plazmy (aparat Sterrad 120) z zastosowaniem pary nadtlenku wodoru w cyklu podwójnym (2 x 45 minut). Tak przygotowane materiały zostały poddane testom biologicznym (cytotoksyczność, aktywność przeciwbakteryjna).

Badania oceniające aktywność przeciwbakteryjną przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii ŚUM w Zabrzu. Do testów zastosowano wzorcowe szczepy bakterii Gram-dodatnich Staphyloccocus aureus (ATCC 25923) i Gram-ujemnych Escherichia coli (ATCC 25922). Materiały POM oraz POM/Ag zostały wprowadzone do zawiesiny bakteryjnej w wodzie tryptonowej o gęstości 0,75x105CFU/ml bakterii Staphyloccocus aures lub Escherichia coli. Następnie zawiesiny inkubowano w warunkach statycznych w temperaturze 37°C przez 17 godzin. Jako próbki odniesienia (blank) wykorzystano wodę tryptonową zawierającą odpowiednio bakterie Staphylococcus aureus lub Escherichia coli w ilości 0,75x105CFU/ml. Ujemne próby kontrolne stanowił: POM w wodzie tryptonowej, POM/Ag w wodzie tryptonowej oraz sama woda tryptonowa. Po przeprowadzonej inkubacji wysiewano po 10µL każdej próbki na podłoże agarowe zawierające 5% dodatek krwi baraniej. Następnie

# Introduction

Surgical implantations often fail because of post-operative complications caused by bacterial infections at the implant site. To lower the risk of infection, it is recommended to modify biomaterials with antibiotics and antiseptics. However, intensive antibiotic therapy may lead to increased resistance of selected bacteria to the applied antibiotics [1]. To produce biomaterials of bacteriostatic and bactericidal properties, these may be modified by means of an antibacterial agent. To this end, nanoparticles of copper, gold, titanium, zinc and silver can be applied [2]. According to the relevant literature data, silver nanoparticles exhibit higher effectiveness against bacteria and other microorganisms [3].

The purpose of this study was to verify whether the composite based on polyoxymethylene modified with silver nanopowder shows bactericidal properties without compromising its biocompatibility.

# Materials and methods

Commercially available form of polyoxymethylene – POM (Ultraform®, BASF, Germany) and silver nanopowder (Sigma Aldrich) of particle size below 100 nm were used in the studies.

Composite materials were produced in thermoplastic processing (extrusion and injection moulding). Polymer was dried at 80°C for 2h. Next, POM and silver nanopowder (0.5% by weight) were homogenised using a corotating twinscrew extruder (PRISM Eurolab Digital). Nanocomposites in the form of dumbbells were produced using a laboratory injection moulding machine (DSM).

Microstructure of the produced materials was examined (by means of scaning electron microscope (SEM, Jeol) with an attachment for chemical analysis of specimen microareas (EDS)).

POM and POM/Ag polymeric materials were cut to 10mm x 10mm squares and sterilized using low-temperature plasma (Sterrad 120 apparatus) with hydrogen peroxide vapour in a double cycle (2 x 45 minutes). Next, the materials were biologically tested (cytotoxicity, antibacterial activity).

Antibacterial activity was tested at the Chair and Department of Microbiology and Immunology of the Medical University of Silesia in Zabrze. Materials was examined with the use of Gram-positive Staphyloccocus aureus (ATCC 25923) and Gram-negative Escherichia coli (ATCC 25922) bacteria strains. POM and POM/Ag materials were introduced to bacterial suspension in tryptonic water, with colony-forming bacteria density of 0.75x10<sup>5</sup> (CFU/ml) Staphyloccocus aureus or Escherichia coli respectively. The suspensions were then incubated under static conditions at 37°C for 17h. The respective bacteria of Staphyloccocus aureus or Escherichia coli in tryptonic water were used as reference specimens. POM in tryptonic water, POM/Ag in tryptonic water and pure tryptonic water were used as negative controls. After incubation, 10µL of each specimen was put on 5% sheep blood agar plates. The plates were incubated at 37°C for 24h. Two specimens were tested for each group of materials. Antibacterial efficiency of tested materials was determined according to Xiaoyi X et al. [4].

Tests of cellular interactions were performed at the Cell Culture Centre of the Department of Histology and Embryology of the Wroclaw Medical University in compliance with PN-EN ISO 10993-5 standard using direct contact method. A reference cell line was applied – mouse fibroblasts 3T3/ Balb from the Tissue Bank at the Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences



RYS.1. Mapa rozkładu pierwiastków dla kompozytu POM/0,5wt.%Ag. FIG.1. Distribution of chemical elements for POM/ 0,5wt.%Ag composite.

podłoża inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Testy przeprowadzono dla 2 próbek z każdej grupy materiałowej. Skuteczność antybakteryjną badanych materiałów określano według Xiaoyi Xu i wsp.[4].

Badania komórkowe zostały wykonane w Pracowni Hodowli Komórkowych, Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii AM we Wrocławiu zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5 metodą bezpośredniego kontaktu. Wykorzystano referencyjną linię komórkową - fibroblasty mysie 3T3/Balb otrzymane z Banku Tkanek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Komórki fibroblastów mysich zostały założone na 12-dołkowych płytkach w ilości 0,5x10<sup>6</sup> każda. Po zasiedleniu około 60% powierzchni na hodowle komórkowe nałożono próbki materiałów tak aby pokrywały około 30% powierzchni hodowli i inkubowano je w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Zmiany ilościowe i morfologiczne, po kontakcie z badanymi materiałami oceniono po okresie 24, 48 i 72 godzin w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. W celu określenia ilości komórek martwych zastosowano barwienie błękitem trypanu. Stopień toksyczności materiałów został oceniony na podstawie zmian w morfologii komórek, ich przeżywalności i zdolności do proliferacji. Każdy materiał oceniano na 9 hodowlach komórek po 3 na każdy dzień badania.

# Wyniki i dyskusja

	<b>Staphylococcus a</b> (początkowa gęsto (initial density 0	<b>ureus ATCC 25923</b> ść 0,75x10⁵ CU/ml) ,75x10⁵ CFU/ml)
Materiał Material	Liczba CFU/mI po 17h inkubacji z kompozytem Number of CFU/ ml after 17h of incubation with composite	Skuteczność bakteriobójcza Antibacterial ef- ficacy ( ABE %)
POM	4,8 x 10⁴	0 %
POM / 0,5wt%Ag	4,0 x 10 <sup>4</sup>	16,7 %
BLANK	4,8 x 10⁴	

TAB.1 Skuteczność bakteriobójcza dla materiałów POM i POM/Ag przeciw Staphylococcus ureus. TAB.1 Antibacterial efficacy of POM and POM/Ag materials against Staphylococcus aureus.

#### in Wroclaw.

Mouse fibroblast cells were arranged on 12-hole plates,  $0.5 \times 106$  each. After approximately 60% of the surface has been colonized with cell cultures, specimens of materials were applied to cover ca. 30% of the culture surface, to be incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Quantitative and morphological changes on contact with the tested materials were examined in 24, 48 and 72 h in an inverted phase-contract microscope. Number of dead cells were estimated by staining with tryphan blue. Material toxicity was evaluated on the basis of changes in cell morphology, survivability and proliferation rates. Each material was tested in 9 bacterial cultures, 3 per each testing day.

#### **Results and discussions**

Studies of composite microstructures confirmed that the nanocomposite production method (extrusion and injection) was acceptable and that nanosilver could be uniformly homogenized throughout the entire volume of nanomaterials (RYS.1).

Bactericidal activity tests revealed that after addition of nanosilver at 0.5% by weight, POM polymer showed slight antibacterial efficacy (16,7%) against Gram-positive and Gram-negative bacteria (TAB.1)

The results of cytotoxicity tests for polyoxymethylene and polyoxymethylene momdified with nanosilver were similar.



RYS.2. 48h hodowla (kontrolna) RYS.3. 48h hodowla fibroblastów RYS.4. 48h hodowla fibroblastów fibroblastów mysich 3T3 Balb/C, mysich 3T3 Balb/C po kontakcie mysich 3T3 Balb/C po kontakcie pow. 100x. z próbką POM, pow. 100x. z próbką POM/0,5wt%Ag, pow. 100x FIG.2. Mouse fibroblasts 3T3/Balb FIG.3. 48h mouse fibroblasts 3T3/Balb .FIG.4. 48h mouse fibroblasts 3T3/ cells culture (control group), mag. cells culture after contact with POM Balb cells culture after contact with 100x. POM/0,5wt%Ag sample, mag. 100x.



Przeprowadzona ocena mikrostruktury materiałów kompozytowych wykazała, iż zastosowana technika otrzymywania nanokompozytów jaką stanowi wytłaczanie i wtrysk jest poprawna i pozwala na równomierne zhomogenizowanie nanosrebra w całej objętości nanomateriałów (RYS.1).

Testy aktywności przeciwbakteryjnej wykazały, że dodatek nanosrebra do polimeru POM w ilości 0,5% wagowych jest zbyt mały, ponieważ badane materiały zawierające tenże nanododatek charakteryzowała nieznaczna zdolność bakteriobójcza (16,7%) wobec szczepów wzorcowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (TAB.1).

Uzyskane wyniki badań działania cytotoksycznego dla polioksymetylenu i polioksymetylenu z dodatkiem nanosrebra były natomiast podobne. Po 24 godzinach w hodowlach z próbkami komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. Po 48 i 72 godzinach obserwowano pojedyncze obkurczone komórki. W przypadku wszystkich czasów badawczych nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji ani lizy błon komórkowych (RYS.2-4). Proliferacja komórek po 24 godzinach nieznacznie spadła natomiast po 48 i 72 godzinach była istotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych (RYS.5). W przypadku próbek POM proliferacja po 24 godzinach była mniejsza o 5,55%, po 48 godzinach - o 20,41% i po 72 godzinach - o 32,88% w odniesieniu do próby kontrolnej. Natomiast w przypadku próbek POM/0,5wt%Ag odpowiednio - o 11,11% - 24,49% i 34,25% niższa w porównaniu do kontroli (RYS.5). Odsetek komórek martwych po 48 godzinach dla próbek POM i POM/0,5wt%Ag wyniósł 2% a po 72 godzinach odpowiednio 8% i 5%.

# Wnioski

Przeprowadzone badania komórkowe pokazały, że polimer POM i kompozyt POM/0,5wt%Ag nie wykazują działania cytotoksycznego na fibroblasty mysie 3T3 Balb. Dodatek 0,5% wagowych nanosrebra do polioksymetylenu w niewielkim stopniu pogorszył właściwości biologiczne polimeru. Natomiast badania aktywności przeciwbakteryjnej dowiodły, że zaproponowany udział wagowy nanosrebra daje efekt w postaci nieznacznej skuteczności przeciwbakteryjnej kompozytu POM/Ag. Uzyskane wyniki dają podstawę do kontynuacji badań kompozytów zawierających większy udział wagowy nanosrebra.

# Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego grant Nr 0408/R/2/T02/06/01

Autorzy dziękują Panu prof. dr hab. Stanisławowi Pielce oraz Paniom dr Danucie Paluch i dr Elżbiecie Gębarowskiej za przeprowadzenie badań oceny działania cytotoksycznego.



RYS.5. Proliferacja fibroblastów mysich 3T3 Balb w hodowlach z materiałami POM i POM/0,5wt.%Ag. FIG.5. Proliferation of mouse fibroblast 3T3 Balb in culture with POM and POM/0,5wt.%Ag materials.

showed regular morphological features in 24 h. In 48 and 72 hours, single contracted cells were spotted.

No agglutination, vacuolization and cellular membrane lyses were observed at all study times (RYS.2-4). Cellular proliferation in 24 h decreased slightly, and was significantly lower in comparison to control cultures in 48 and 72 h (RYS.5). For POM specimens, the proliferation in 24 h decreased by 5.55%, in 48 h – by 20.41%, and in 72 h – by 32.88% against the control group. For POM/0,5wt%Ag specimens, the proliferation was lower by 11.11%, 24.49% and 34.25%, respectively, compared to controls (RYS.5). The percentage of dead cells in 48 h for POM and POM/0,5wt%Ag equalled 2%, and in 72 h - 8% and 5%, respectively.

## Conclusions

In studies of cellular interactions, no cytotoxic properties of POM polymer and POM/0,5wt%Ag composite against mouse fibroblasts 3T3 Balb were observed. Following addition of nanosilver to polyoxymethylene at 0.5% by weight, the biological properties of the polymer were affected to a limited extent only. Antibacterial activity studies showed that suggested mass fraction of nanosilver slightly improved the bactericidal efficacy of the POM/Ag composite. Results obtained from the biological tests incline authors to continue experiments with a larger quantity of nanopowder addition.

#### Acknowledgments

This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (grant No 0408/R/2/ T02/06/01).

Authors wish to thank Prof. Stanisław Pielka and PhD Danuta Paluch, PhD Elżbieta Gębarowska for carring out the cytotoxicity tests.

# Piśmiennictwo

G.Speranza et al. Biomaterials 25 (2004) 2029–2037
 M. Rai et al. Biotechnology Advances 27 (2009) 76–83

#### References

[3] P. Gong et al. Nanotechnology (2007)18:604–11
[4] Xiaoyi Xu et al. European Polymer Journal 42 (2006) 2081–2087



# SKAFOLDY HYDROKSYAPATYTOWE I KOMPOZYTOWE WYTWARZANE METODĄ ROBOCASTING

K.GRYŃ<sup>1</sup>, J. CHŁOPEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wydział Metali Nieżelaznych, AGH–Akademia Górniczo-Hutnicza, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków. <sup>2</sup>Wydział Inżynierii Materiałowej I Ceramiki, AGH–Akademia Górniczo-Hutnicza, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków. \*MAILTO: kgryn@agh.edu.pl

#### Streszczenie

W celu poprawy własności mechanicznych implantów kostnych a także chęci odtworzenia rozwiązań wypracowanych przez naturę stale prowadzi się poszukiwania nowych materiałów i technologii wytwórczych. W artykule przedstawiono badania nad rusztowaniami hydroksyapatytowymi (HA) i kompozytowymi o kontrolowanej porowatości wykonanymi metodą Robocasting.

Celem badań było wytworzenie materiału bazującego na rusztowaniach HA naśladującego strukturalnie naturalną kość, która zbudowana jest z dwóch głównych składników: organicznej macierzy, składającej się głównie z jednorodnie zorientowanych włókien kolagenowych stanowiących ok. 30wt% i porowatego szkieletu mineralnego zbudowanego z fosforanów wapnia (HA) – ok.70wt%. Dzięki takiej budowie kość jest lekka i sztywna a jednocześnie zachowuje elastyczność w pewnym zakresie. To stanowi o jej naturalnej odporności na obciążenia dynamiczne.

Porowate rusztowania bioceramiczne, w dużo większym stopniu niż bioceramika gęsta, podatne są na uszkodzenia związane z obciążeniami dynamicznymi. Ich kruchość stanowi poważny problem i znacząco ogranicza stosowanie takich materiałów. Z tego powodu poszukuje się sposobów polepszających ich własności wytrzymałościowe. Opierając się na zasadach biomimetyzmu zdecydowano o wykonaniu kompozytu ceramiczno-polimerowego. [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 201-204]

# Wprowadzenie

Do przygotowania próbek o kontrolowanym kształcie i makroporowatości zastosowano metodę Robocasting [1]. Technika ta pozwala budować rusztowania ceramiczne z odpowiednio przygotowanej pasty bazującej na wodzie i celulozie. Całość procesu jest sterowana i kontrolowana w stystemie CAD-CAM Wyciskając pojedyncze linie układa się je w warstwy, które następnie nakładane są kolejno na siebie [FIG.1].

W ten sposób uzyskuje się przestrzenną strukturę porowatą. Końcowa obróbka ogranicza się do spiekania próbek. W przypadku hydroksyapatytu (HA) 1200°C/3h. Technika ta pozwala na wykonanie struktur przestrzennych o niemal dowolnym stopniu złożoności w mniej niż 24h. Szczegółowe informacje na temat procesu wytwarzania i przygotowania

# DEVELOPMENT OF HYDROXYAPATITE AND HYDROXYAPATITE/POLYMER COMPOSITE SCAFFOLDS BY ROBOCASTING

K.GRYŃ<sup>1\*</sup>, J. CHŁOPEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Non-Ferrous Metals, AGH–University of Science and technology, 30 Mickiewicz av., 30-059 Cracow, Poland. <sup>2</sup>Faculty of Material Sciences and Ceramics, AGH–University of Science and technology, 30 Mickiewicz av., 30-059 Cracow, Poland. \*MAILTO: kgryn@agh.edu.pl

## Abstract

The quest for a better bone implant and mimicing the nature led to a new material preparation. This article presents further research on Robocasting and controlled porosity bioceramic scaffolds.

The aim was to fabricate a composite material based on hydroxyapatie scaffold. Because natural bone consists of two main compounds: mineral matrix (hydroxyapatite  $\approx$ 70%) and organic part (mostly collagen fibrils  $\approx$ 30%). It was decided to strengthen pure HA robocasted scaffolds with the poly-lactide L-glicolide (PGLA 85/15) which is resorbable polymer widely used in medical applications.

HA scaffolds were embedded in PGLA. Newly produced composites were tested and results were compared with pure HA scaffolds. Structural and mechanical testing was conducted. It was observed that HA/PGLA composite has much higher values of Fmax and  $\sigma$  when compared with pure HA. Important fact which has to be highlighted is that after compressive test pure HA samples turned into rubble whereas HA/PGLA stayed coherent and kept their shape.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 201-204]

# Introduction

A new rapid prototyping technique called Robocasting was applied for controlled porosity scaffold fabrication [1]. It is the near-net-shape processing of materials by sequentially stacking thin layers until complicated, threedimensional shapes are produced. Mixtures of ceramic powder, water and trace amounts of chemical modifiers are deposited through a nozzle [FIG.1]. The operation is computer-controlled and requires no mold. This technology allows producing objects rapidly and directly from CAD drawings. No final machining is necessary. After the part is formed and completely dried, it is baked in a furnace at very high temperatures (for HA 1200°C) so that the particles can "densify," in a process called sintering. Robocasting is able to make complex parts in less than 24 hours. Detailed fabrication process and preliminary tests of Robocasted structures were already described and published [2,3]. In this article a continuation of that research is presented.

Ceramic scaffolds used as bone substitutes have one big disadvantage – brittleness [4]. Thus, the use of such materials is limited for non-load-bearing applications. Although próbek zostały zaprezentowane i opublikowane w literaturze [2,3] Dotychczas stosowane porowate rusztowania bioceramiczne, w dużo większym stopniu niż bioceramika gęsta podatne są na uszkodzenia związane z obciążeniami dynamicznymi [4]. Ich kruchość stanowi poważny problem i znacząco ogranicza stosowanie takich materiałów. Z tego powodu poszukuje się sposobów polepszających ich własności wytrzymałościowe. Mimo tego, że metoda Robocasting pozwala dowolnie zaprojektować makrostrukturę i nadać odpowiedni do pełnionej funkcji kształt przyszłego im-



RYS.1. Zasada metody Robocasting. FIG.1. Robocasting principle.

plantu, nadal problemem pozostaje dopasowanie własności mechanicznych materiału syntetycznego i naturalnej kości.

Dzięki swojej specyficznej budowie kość jest lekka i sztywna a jednocześnie zachowuje elastyczność w pewnym zakresie, co stanowi o jej naturalnej odporności na obciążenia dynamiczne. Kość jest naturalnym kompozytem składającym się z organicznej macierzy, na która składają się głównie jednorodnie zorientowane włókna kolagenowe stanowiące ok. 30wt% i porowatego szkieletu mineralnego, zbudowanego z fosforanów wapnia (HA) – ok. 70wt%.

Celem prezentowanych badań było wytworzenie syntetycznego kompozytu naśladującego rozwiązania naturalne. Przestrzenne rusztowania HA zostały poddane infiltracji fazą organiczną w postaci polimeru PGLA. W artykule przedstawiono wyniki wstępnych testów mechanicznych przeprowadzonych na tak przygotowanych kompozytach.

# Materiały i metody

Ze względu na biozgodność i bioaktywność do przygotowania rusztowań wykorzystano hydroksyapatyt. Przestrzenne struktury zostały wykonane techniką Robocasting [3D Inks, Stillwater, OK]. O użyciu PGLA do infiltracji zadecydowały możliwość sterowania czasem resorbcji, wysoka biozgodność a także szerokie zastosowanie w medycynie. Materiałem wsadowym w procesie Robocasting była pasta ceramiczna bazująca na wodzie i celulozie [Methocel F4M, Dow Chemical Co., Midland, MI] z 45obj% zawartością komercyjnie dostępnego proszku HA o wielkości ziaren 1-3µm i powierzchni swobodnej wynoszącej 3,57m²/g [Trans-Tech Inc. Adamstown, USA]. Stosując dyszę drukującą o średnicy wewnetrznej 410µm wykonano prostokatne próbki o wymiarach 25x5x2,5mm3 [FIG.2]. By uzyskać różną wielkość porów zaprojektowano dwa rodzaje odstępów pomiędzy pojedynczymi liniami w warstwie, które wynosiły odpowiednio: dla typu A 0,82mm i dla typu B 1,6mm. Warstwy zorientowano względem siebie pod kątem 90° a odległość miedzy warstwami ustalono na 0,2mm. W ten sposób, po spiekaniu, uzyskano quasi-sześcienne pory o wymiarach: 0,3x0,3x1,18mm<sup>3</sup> (typ A) i 0,7x0,7x0,18mm<sup>3</sup> (typ B). Spiekanie przeprowadzono w temp.1200°C przez 3h. Próbki podzielono na dwie grupy: I - rusztowania z czystego HA, II - rusztowania infiltrowane rozpuszczonym w dichlorometanie (1:10) kopolimerem laktydu i glikolidu PGLA (85/15; n<sub>inh</sub>=1,85; M<sub>n</sub>~100,000) [Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN, Zabrze]. Obie grupy zostały poddane testom wytrzymałościowym jednoosiowemu ściskaniu [Zwick 1435]. Dokonano obserwacji mikroskopowych [Stereo Discovery V8, Zeiss].

Robocasting method has the ability of designing and producing fully controlled shapes, inner and outer structures of prepared scaffolds still there is a problem with matching the mechanical properties of natural bone and an implant.

Calcified bone contains of two components: organic matrix (mainly orderly orientated collagen fibrils ~30wt%) and mineral substance (calcium phospsate- hydroxyapatite ~70wt%). Collagen fibers give bones the ability to resist snapping or breaking. The mineral component gives bone its hardness, toughness and rigidity. The aim is to mimic the nature

RYS.2. Rusztowania wykonane metodą Robocasting. a) Typ A-pory o wymiarach 0,3x0,3x1,18mm<sup>3</sup>; b) Typ B-pory o wymiarach 0,7x0,7x0,18mm<sup>3</sup>. FIG.2. Robocasted scaffolds. a) Type A pores: 0,3x0,3x1,18mm<sup>3</sup>; b) Type B-pores: 0,7x0,7x0,18mm<sup>3</sup>.

and to fabricate better HA porous structures for bone tissue regeneration and engineering. In this work an attempt of Robocasted HA scaffolds strengthening with organic part (PGLA) is shown and results of the research are presented.

# Materials and methods

Because of its biocomapatibility and bioactivity HA was used as a base material for scaffolds fabrication and PGLA as a strengthening compound because it is resorbable polymer widely used in medical applications. Commercially available hydroxyapatite powder with a particle size between 1 and 3µm, surface area 3,57m<sup>2</sup>/g was used [Trans-Tech Inc. Adamstown, USA]. It was transformed in to a water based paste (45vol% of HA). Such ink was applied for Robocasting process [3D Inks, Stillwater,OK]. Samples, rectangular in shape, were fabricated (25x5x2,5mm3). A410µm diameter printing nozzle was used. Two different spacing between rods were applied 0,82mm and 1,6mm to obtain various pore sizes/types. Orientation between layers was set on 90° and 0,2mm spacing was designed. That is how quasi-cubical pores ("A"=0,3x0,3x0,18mm<sup>3</sup> and "B"=0,7x0,7x0,18mm<sup>3</sup>) were achieved [FIG.2]. Structures were sintered at 1200°C/3h. Scaffolds were divided in two groups: I - pure HA and II - for strengthening with polymer. They were embedded in PGLA (85:15;  $\eta_{inb}$ =1,85;  $M_n$ ~100,000) [Center of Polymer and Carbon Materials PAN, Zabrze, Poland] dissolved in dichloromethane (1:10) and left overnight for solvent evaporation. Both groups of samples were tested on uniaxial universal testing machine [Zwick 1435] in a compression test and results were compared. Microscopic observations were conducted [Stereo Discovery V8, Zeiss].

## Wyniki

Obserwacje mikroskopowe wykazały, że w przypadku obu rodzajów makroporowatości (typu A i B) zaobserwowano częściową penetrację polimeru w głąb rusztowań HA. Polimer bardziej pokrywał powierzchnię zewnętrzną niż wnikał w strukturę [Fig.3]. Badania mechaniczne ujawniły różnice w zachowaniu się rusztowań z czystego HA i kompozytu HA/PGLA. W pierwszym przypadku zanotowano wahania wartości maksymalnej siły ściskającej Fmax i wytrzymałości na ściskanie σ [FIG.4; TAB.1]. Wnioskować można, że w strukturze mogły być obecne zaburzenia w postaci pęknięć lub innych niejednorodności. Ponadto stwierdzono ponad

#### **Results and discussion**

For both types of pores (type A and B) microscopic observation revealed partial penetration of polymer into HA scaffolds. Polymer rather covers the scaffold surface than infiltrates it [FIG.3]. Homogenous structure and very good bonding in layer-to-layer contact areas was observed. Uniaxial compressive test showed different behavior of pure HA and HA/PGLA scaffolds. For HA there were rather big diversities in Fmax and compression strength  $\sigma$  values and results were not repeatable [FIG.4]. This might indicate that there were some imperfections in the structure. Moreover for smaller pores (type A) more than two times



RYS.3. Rusztowania z czystego HA (a, c) i pokryte PGLA (b,d) FIG.3. Pure HA scaffolds (a,c) and covered with PGLA (b,d)



RYS.4. Wyniki badań mechanicznych (jednoosiowe ściskanie) rusztowań z czystego HA. a) Typ A, b) Typ B. Na przykładowych wykresach widać duże wahania wartości wytrzymałości na ściskanie. FIG.4. Pure HA scaffolds mechanical (compression) testing results. a) Type A, b) Type B. Example diagrams show big diversity of compressions strength values.



RYS.5. Wyniki badań mechanicznych (jednoosiowe ściskanie) kompozytowych rusztowań HA/PGLA. a) Typ A, b) Typ B. Przykładowe przebiegi wartości wytrzymałości na ściskanie pokazują powtarzalne zachowanie się kompozytu pod obciążeniem.

FIG.5. HA/PGLA composite scaffolds mechanical (compression) testing results.

a) Type A, b) Type B. Example diagrams show repeatable values of compression strength.

BI MATERING OF



RYS.6. Pozostałości po przeprowadzonym teście ściskania. a) Czysty HA - w trakcie testu rusztowania ulegały całkowitemu zniszczeniu. b) PGLA zabezpieczył rusztowanie HA przed dekohezją. FIG.6. Samples after uniaxial compressive test. a) Pure HA. Scaffold was completely destroyed. b) PGLA secured HA scaffold from decohesion.

dwukrotnie wyższe wartości F<sub>max</sub> i σ w przypadku rusztowań o mniejszych porach (typ A). Jest to prawdopodobnie związanie większą ilością węzłów przenoszących obciążenie a także mniejszą odległością pomiędzy nimi.

W przypadku kompozytów HA/ PGLA uzyskano dużo lepsze wyniki. Dla rusztowań typu A zarejestrowano nieznaczny wzrost Fmax i σ w stosunku do analogicznych

Rodzaj pora / Pore type	Materiał /Material	σ [MPa	
	HA	2499 (±735)	40,7 (±10)
тур Л/ туре Л	HA/PGLA	4135 (±784)	63 (±13)
Тур В / Туре В	HA	578 (±122)	8,9 (±1,9)
	HA/PGLA	1654 (±144)	26,2 (±2)

TABELA 1. Wyniki badań wytrzymałości na ści-

**TABLE 1. Uniaxial compression test results** 

higher values of Fmax and  $\sigma$ were disclosed [TAB.1]. Probably it is connected with larger number of layer-to-layer bonding points which bear load and smaller distance between them in comparison to type B pores.

HA/PGLA composite revealed much higher values of Fmax and compression strength  $\sigma$  [FIG.5]. For type A samples there was insignificant increase of

rusztowań z czystego HA, natomiast dla próbek typu B ujawniono niemal dwukrotny wzrost wartości Fmax i o w porównaniu z rusztowaniami niepokrytymi polimerem [FIG.5, TAB.1].

skanie.

W trakcie testów rusztowania z czystego HA ulegały całkowitemu zniszczeniu natomiast kompozytowe HA/PGLA zachowywały spójność struktury [FIG.6]. Zastosowanie polimeru zabezpieczyło rusztowania przed dekohezją.

# Wnioski

Zastosowanie PGLA w znaczący sposób poprawiło własności mechaniczne rusztowań HA. Efekt widoczny jest zwłaszcza dla próbek typu B. Dodatkowym aspektem jest zabezpieczenie rusztowań przed całkowitym zniszczeniem. Zadowalające wyniki przeprowadzonych badań zachęcają do dalszych prac. Należy kontynuować badania w kierunku testów in vitro a w dalszym etapie in vivo, aby ocenić możliwość zastosowania takich kompozytów w medycznej praktyce klinicznej.

# Podziękowania

Badania finansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego No: 0408/R/2/T02/06/01. Autorzy pragną podziękować A.P.Tomsia, E.Saiz z Lawrence Berkeley National Laboratory, California za wsparcie i udostępnienie laboratorium a zwłaszcza drukarki Robocasting.

# Piśmiennictwo

[1]. J.Cesarano, P.Clavert: "Freeforming object with low binder slurry"; US Patent #6027236, 2000

[2]. E.Saiz, L.Gremillard, G.Menendez, K.Gryn, P.Miranda, A.P.Tomsia: "Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds"; Material Science and Engineering C, Vol.27, Issue 3, April 2007, 546-550.

Fmax and  $\sigma$  when compared to analogical ones made

of pure HA. Better results were obtained for type B samples, where almost three times higher values of  $F_{max}$  and  $\sigma$  were recorded in comparison to scaffolds not covered with polymer [TAB.1].

After compressive test was finished pure HA samples turned in to rubble (were completely destroyed) whereas HA/ PGLA composite kept their shape and cohesion [FIG.6]

# Conclusions

Tests have shown that PGLA improved mechanical properties of HA scaffolds. It was especially visible for type B samples. Another very important aspect is that PGLA secured porous structures from total destruction. Promising results encourage for further research. They should be focused firstly on in vitro behavior and secondly on in vivo answer. Such tests should give an evaluation of future medical application of such materials.

# Acknowledgements

This research was financially supported by the research project No: 0408/R/2/T02/06/01. Authors wish to thank A.P. Tomsia, E. Saiz of Lawrence Berkeley National Laboratory, California for the support and facilities available in their laboratory, especially Robocasting printer.

# References

[3]. K.Gryń, J.Chłopek, E.Saiz, A.P.Tomsia: " Sposób wytwarzania materiałów o kontrolowanej porowatości z hydroksyapatytu przy wykorzystaniu metody Robocasting"; Engineering of Biomaterials, No.62, Vol.X, June 2007, 26-29.

[4]. Z.Jaegermann, A.Ślósarczyk: " Gęsta i porowata ceramika korundowa w zastosowaniach medycznych"; AGH Uczelniane Wydawnictwa Naukowo-Dydaktyczne, Kraków 2007.

.......

# WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE POROWATEGO TYTANU MODYFIKOWANEGO POWIERZCHNIOWO – BADANIA IN VIVO

BARBARA SZARANIEC<sup>1</sup>, KATARZYNA JODKOWSKA<sup>2</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akademia Górniczo – Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, Kraków <sup>2</sup>SGGW, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Nauk Klinicznych, Warszawa

#### Streszczenie

Celem pracy była ocena biologiczna w warunkach in vivo porowatych implantów tytanowych modyfikowanych powierzchniowo ceramiką bioaktywną. Wszczepy tytanowe otrzymywano stosując metalurgię proszków, a następnie przy użyciu metod zol-żel i elektroforezy pokrywano je powierzchniowo bioszkłem, zolem wapniowo-krzemionkowym oraz hydroksyapatytem. Badania in vivo przeprowadzono na królikach nowozelandzkich. Implanty wprowadzano do łoża kostnego powstałego po usunięciu siekacza żuchwy. Na podstawie obserwacji rentgenowskich oraz mikroskopowych oceniono biozgodność materiałów. Żadna z zastosowanych modyfikacji nie wykazuje negatywnego wpływu na otaczające tkanki. Implanty łączą się bezpośrednio z kością bez otoczki łącznotkankowej, jedynie w przypadku modyfikacji zolem wapniowo-krzemionkowym połączenie kość-implant jest nieco gorsze.

*Słowa kluczowe*: *tytan, badania in vivo, hydroksyapatyt, bioszkło* 

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 205-207]

#### Materiały i metody

Porowate próbki tytanowe w postaci walców o średnicy 4,6mm i wysokości 4mm otrzymano metodą metalurgii proszków mieszając proszek tytanowy (Atlantic Equipment Engineers, USA) z porogenem (wodorowęglan amonu, Chempur) w stosunku wagowym 30/70 [1,2,3]. Po zaprasowaniu proszków i usunięciu porogenu wypraski spiekano w wysokiej próżni (5·10<sup>-4</sup>mbar) w temperaturze 1200°C przez 5h. Otrzymane spieki tytanowe modyfikowano powierzchniowo trzema rodzajami materiałów bioaktywnych: bioszkło (TiBio), zol wapniowo-krzemionkowy (TiCS) oraz hydroksyapatyt (TiHAp).

Hydroksyapatyt nanoszono metodą elektroforezy z 0,4% zawiesiny hydroksyapatytu w alkoholu absolutnym (odległość między próbką a elektrodą 1,5mm, U=15V, I=0,3mA, t=15s).

Bioszkło z układu CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> (80-4-16%) (na bazie tetraetoksyortosilanu Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub> (TEOS), fosforanu trietylu OP(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> (TEP) i azotanu wapnia Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O [6]) nanoszono na podłoże metodą zol-żel wynurzając próbki ze stałą prędkością 20cm/min. Po 24h suszenia powłok w powietrzu poddano je obróbce termicznej w temperaturze 160°C przez kolejną dobę [4].

Powłokę wapniowo-krzemionkową (o stosunku CaO/ SiO<sub>2</sub>=1,2 na bazie tetraetoksyortosilanu Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub> (TEOS) oraz azotanu wapnia Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O) podobnie jak poprzednio nanoszono na podłoże metodą zol-żel wynurzając

# BIOLOGICAL PROPERTIES OF POROUS TITANIUM WITH MODIFIED SURFACE – IN VIVO STUDIES

#### BARBARA SZARANIEC<sup>1</sup>, KATARZYNA JODKOWSKA<sup>2</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials, Cracow, Poland <sup>2</sup>SGGW Warsaw Agricultural University, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw, Poland

#### Abstract

The aim of the work was to evaluate the biological behaviour of porous titanium implants surface modified with bioactive ceramics. Titanium implants were obtained by powder metallurgy. Their surface was modified with: electrophoretically deposited hydroxyapatite, sol-gel coating with bioglass (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>), sol-gel coating with calcium-silica. The specimens were implanted in jaw-bone of New Zealand rabbits. The implants were placed into incisor alveolus. Biocompatibility of materials were evaluated by X-ray and SEM techniques.

No modifications negatively influenced on the surrounding tissues. Implants joined with bone directly without fibrous connective tissue. Only for calciumsilica sol modified titanium the bone-implant interface was slightly weaker.

Keywords: titanium, in vivo tests, hydroxyapatite, bioglass

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 205-207]

#### Materials and methods

Porous titanium specimens (cylinder-shaped, 4.6 mm in diameter and 4 mm tall) were produced by combining titanium powder (Atlantic Equipment Engineers, USA) with porogen (ammonium bicarbonate, Chempur) at 30/70 weight ratio, which is a method used in powder metallurgy [1,2]. The powders were compressed and after porogen removal, the compacts were sintered under high vacuum (5·10<sup>-4</sup>mbar) at 1,200°C for 5h. The sintered titanium was subject to surface modifications with three types of bioactive materials: bioglass (TiBio), calcium-silica sol (TiCS) and hydroxyapatite (TiHAp).

Hydroxyapatite was transferred by electrophoresis in form of 0.4 % hydroxyapatite suspension in absolute alcohol (the distance between the specimen and the electrode = 1.5 mm, U=15V, I=0,3mA, t=15s).

Another specimen was covered with bioglass of the CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> (80-4-16%) system (based on tetraethoxy-ortosilane Si(OC2H5)4 (TEOS), triethyl phosphate OP(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> (TEP) and calcium nitrate Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O [3]) via sol-gel method. The specimens were emerged with a constant speed of 20cm/min. After 24 h of air drying, the specimens were subjected to heat treatment at 160°C for another 24 h.

The last specimen was coated with calcium-silica (CaO/ SiO<sub>2</sub>=1.2 based on tetra-ethoxy-ortosilane Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>(TEOS) and calcium nitrate) via sol-gel method as previously. The specimens were emerged with a constant speed of 20cm/




RYSUNEK 1. Zdjęcia rentgenowskie królików ze wszczepami tytanowymi bezpośrednio i 6 tygodni po implantacji. FIGURE 1. X-ray images of rabbits with titanium implants initially and 6 weeks after implantation.



próbki ze stałą prędkością 20cm/min. W celu zagęszczenia naniesionej warstwy oraz jej związania z podłożem metalicznym próbki po wysuszeniu wygrzewano przez 2h w temperaturze 600°C w atmosferze argonu [5].

Otrzymane wszczepy zostały zaimplantowane królikom w tkankę kostną żuchwy. Dorosłe samce królika domowego rasy nowozelandzkiej zostały poddane ogólnemu znieczuleniu infuzyjnemu. Po kontrolnym badaniu RTG każdemu ze zwierząt usunięto siekacz żuchwy. Wszczep wprowadzono w poszerzony wiertłem zębodół po zębie siecznym. Ranę nad wszczepem zaszyto szwami przerywanymi nicią wchłanialną. Zwierzęta po zabiegu otrzymywały leki przeciwbólowe oraz kilkudniową osłonę antybiotykową. Po zakończeniu 6 tygodniowej obserwacji zwierzęta poddano eutanazji, a wypreparowane fragmenty tkanek zakonserwowano w roztworze formaliny. Regenerację śledzono na podstawie badań rentgenowskich oraz obserwacji w elektronowym mikroskopie skaningowym z analizą EDS (Jeol JSM 5400).

### Dyskusja

Obserwacje przeprowadzone po implantacji wykazały, że we wszystkich przypadkach rany nad wszczepami zagoiły się przez rychłozrost. Na zdjęciach RTG (RYS.1) nie widać cech osteolizy oraz odczynów odokostnowych, co może świadczyć o biozgodności wszystkich implantowanych materiałów.

Obserwacje mikroskopowe (SEM) preparatów kostnych po 6 tygodniowej implantacji (RYS.2) wykazały najkorzystniejszą reakcję tkankową na implant z tytanu pokrywanego elektroforetycznie hydroksyapatytem, a następnie dla tytanu modyfikowanego bioszkłem. W obu przypadkach widoczne jest wrastanie i modelowanie tkanki kostnej. Materiały te tworzą z kością bezpośrednią więź z rozmytą granicą faz.

W przypadku tytanu modyfikowanego zolem wapniowokrzemionkowym połączenie kość-implant jest nieco gorsze i odbywa się poprzez cienką warstwę niezmineralizowanej tkanki (bogatszej w tlen i węgiel – RYS.2b), która oddziela powierzchnię implantu od tkanki kostnej.

#### Wnioski

Wyniki badań in vivo wskazują na biozgodność otrzymanych spieków oraz szybką integrację implantu z tkanką kostną. Z punktu widzenia osteointegracji najlepszą modyfikację stanowi pokrycie hydroksyapatytem. Dodatkowo odpowiednia porowatość wszczepu sprzyja wrastaniu tkanki kostnej w implant.

### Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu Nr 103/ GRE/2007/02

# Piśmiennictwo

[1] Szaraniec B., Ziąbka M., Chłopek J., S. Papargyri, D. Tsipas: Obtaining of porous titanium for medical implants. Engineering of Biomaterials vol.11, no.81–84 (2008) s.49–52

[2] Szaraniec B., Ziąbka M., Chłopek J.: Porous Titanium Surface Modification with Hydroxyapatite. 15th Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2009) Middle East Technical University Northern Cyprus Campus (METU-NCC), Güzelyurt, Cyprus min. To thicken the applied film and to bind it to the metallic substrate, dry specimens were held for 2 h at 600°C in argon atmosphere [4].

The specimens were implanted in jaw-bone tissue in rabbits. Adult males of New Zealand rabbits were administered general anaesthesia by infusion. Each animal had an incisor removed after an X-ray examination. The implant was placed into incisor alveolus extended with a drill. The wound over the implant was sewn with interrupted sutures using absorbable thread. Animals were administered analgesics and antibiotic cover for several consecutive days. After a 6-week monitoring period, the animals were euthanized, and fragments of tissues were preserved in formalin solution. The regeneration was traced using X-ray and SEM procedures with EDS analysis (Jeol JSM 5400).

#### **Results and discussion**

The post-implantation observations revealed that all wounds over the implants were healed by first intention. X-ray images (FIG.1) show no signs of osteolysis and periosteal reactions, which may point to biocompatibility of all implanted materials.

In microscope examination (SEM) of bone preparations after 6 weeks following implantation (FIG.2), bone tissue reaction to implant was shown to be the best for titanium coated with hydroxyapatite via electrophoresis, followed by bioglass-modified titanium. In both cases, bone tissue ingrowth and modelling into the implant were observed. The boundary between these materials and bones was considered 'fuzzy'.

For titanium modified with calcium-silica sol, the boneimplant interface was slightly weaker, and was composed of a thin film of non-mineralized tissue (rich in oxygen and carbon – FIG.2b), which separated the implant surface from the bone tissue.

#### Conclusions

Biocompatibility of the sinters and fast implant-bone integration were confirmed in vivo studies. In terms of osteointegration, surface modification with hydroxyapatite proved to be the best. In addition, suitable porosity of the implant stimulated bone tissue ingrowth into the implant.

### Acknowledgements

This study was supported by grant No. 103/ GRE/2007/02.

### References

[3] Szaraniec B., Chłopek J., Dynia G.: Porowate biomateriały tytanowe modyfikowane ceramiką bioaktywną. Inżynieria Materiałowa (2009) (w druku)

[4] Stoch A.: Biomimetic preparation of apatite layers on implant surfaces. Polski Biuletyn Ceramiczny vol.61, 121–129
[5] Sindut R., Łączka M., Cholewa-Kowalska K., Najman J.: Bioacti-

ve glass coating, Materials Science-Poland, Vol. 23, No. 1 (2005)

207

• • • • • • • • • • • • • • • • • •

208

# WŁAŚCIWOŚCI SKÓRY LUDZKIEJ UZYSKANE W TESTACH MECHANICZNYCH I TECHNIKĄ SPEKTROSKOPII RAMANA

Sylwia Szotek<sup>1\*</sup>, Romuald Będziński<sup>1</sup>, Magdalena Kobielarz<sup>1</sup>, Marlena Gąsior-Głogowska<sup>2</sup>, Małgorzata Komorowska<sup>2</sup>, Krzysztof Maksymowicz<sup>3</sup>, Jerzy Hanuza<sup>4,5</sup>, Krzysztof Hermanowicz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Wrocławska, Wydział Mechaniczny, Instytut Konstrukcji i Eksploatacji Maszyn, Zakład Inżynierii Biomedycznej i Mechaniki Eksperymentalnej, ul.Łukasiewicza 7/9, 50-371 Wrocław, Polska <sup>2</sup>Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Plac Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław, Polska <sup>3</sup>Akademia Medyczna we Wrocławiu, Katedra Medyczna we Wrocławiu, Katedra Medyczny Sądowej, ul.Mikulicza-Radeckiego 4, 50-368 Wrocław, Polska <sup>4</sup>Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polska Akademia Nauk, ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław, Polska <sup>5</sup>Uiwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny, Katedra Chemii Bioorganicznej,

UL. KOMANDORSKA 118/120, 53-345 WROCŁAW, POLSKA \*MAILTO: SYLWIA.SZOTEK@PWR.WROC.PL

### Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było porównanie charakterystyk otrzymanych: w testach wytrzymałościowych i z pomiarów spektroskopowych. W pracy wyznaczono podstawowe parametry mechaniczne skóry, które są zdeterminowane ułożeniem włókien kolagenowych. Następnie zarejestrowano widma ramanowskie badanej tkanki, zidentyfikowano pasma charakterystyczne dla białka kolagenowego. Na podstawie analizy uzyskanych wyników, dla kolejnych etapów rozciągnięcia skóry, zaobserwowano między innymi różnice w położeniu maksimum pasma amidu I (1658cm<sup>-1</sup>) w zależności od kierunku rozciągania próbki. Porównanie, w obu metodach charakterystycznych zakresów, zachodzących zmian wykazało możliwość stosowania Spektroskopii Ramana w celu wyznaczenia kierunku ułożenia włókien kolagenowych w trakcie rozciągania co jest istotne z punktu widzenia przeszczepów skóry.

*Słowa kluczowe*: skóra, test jednoosiowego rozciągania, spektroskopia ramanowska, właściwości mechaniczne, białka strukturalne, włókna kolagenowe.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 208-210]

Skóra jako najbardziej zewnętrzny i największy organ

człowieka jest najczęściej narażona na uszkodzenia, stąd

niezwykle istotne jest poznanie jej właściwości mechanicz-

nych, które są zależne od ułożenia i orientacji włókien kola-

genowych oraz naprężeń powierzchniowych występujących

na jej powierzchni a mających związek z rozkładem linii Lan-

gera. Linie te, stanowią obszary o zmniejszonym naprężeniu

wyznaczane są przy użyciu maszyn wytrzymałościowych

w testach jednoosiowego rozciągania [2]. Spektroskopia

Właściwości mechaniczne skóry in vitro najczęściej

i są ułożone prostopadle do długich osi mięśni [1].

# Wprowadzenie

# HUMAN SKIN PROPERTIES DETERMINED BY MECHANICAL TESTS AND RAMAN SPECTROSCOPY

Sylwia Szotek<sup>1\*</sup>, Romuald Będziński<sup>1</sup>, Magdalena Kobielarz<sup>1</sup>, Marlena Gąsior-Głogowska<sup>2</sup>, Małgorzata Komorowska<sup>2</sup>, Krzysztof Maksymowicz<sup>3</sup>, Jerzy Hanuza<sup>4,5</sup>, Krzysztof Hermanowicz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, INSTITUTE OF MACHINE DESIGN AND OPERATION, DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND EXPERIMENTAL MECHANICS, ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLAND <sup>2</sup>WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF FUNDAMENTAL PROBLEMS OF TECHNOLOGY, INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND INSTRUMENTATION, PLAC GRUNWALDZKI 13, 50-377 WROCŁAW, POLAND <sup>3</sup>WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY. DEPARTMENT OF FORENSIC MEDICINE, MIKULICZA-RADECKIEGO 4, 50-368 WROCŁAW, POLAND <sup>4</sup>INSTITUTE OF LOW TEMPERATURE AND STRUCTURE RESEARCH, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, OKÓLNA 2, 50-422 WROCŁAW, POLAND <sup>5</sup>WROCŁAW UNIVERSITY OF ECONOMICS, FACULTY OF INDUSTRY AND ECONOMICS. DEPARTMENT OF BIOORGANIC CHEMISTRY. KOMANDORSKA 118/120, 53-345 WROCŁAW, POLAND \*MAILTO: SYLWIA.SZOTEK@PWR.WROC.PL

# Abstract

The aim of the investigations was to compare the characteristics obtained from strength tests and spectroscopic measurements. The basic skin parameters dependent on the arrangement of collagen fibres were determined. Then Raman spectra of the investigated tissue were recorded and bands characteristic of collagen protein were identified. An analysis of the results for the successive stages of skin stretching showed, among other things, differences in the location of the amid I band maximum (1658cm-1) depending on the direction of specimen stretching. A comparison of the characteristic ranges of change determined by the two methods showed that Raman spectroscopy can be used to ascertain the orientation of collagen fibres in the course of stretching, which information is essential for skin transplantation.

Key words: skin, uniaxial tension test, Raman spectroscopy, mechanical properties, structural proteins, collagen fibres.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 208-210]

# Introduction

Skin as the most outer and largest human organ is most often exposed to damage. Hence it is vital to identify its mechanical properties. The latter are determined by the arrangement and orientation of collagen fibres and by the stresses (connected with the distribution of Langer lines) occurring on the skin's surface. Langer lines constitute areas with reduced stress and run perpendicularly to the longitudinal axes of muscles [1].

The mechanical properties of skin in vitro are usually determined by uniaxial tension tests in testing machines [2]. Raman spectroscopy is commonly used to investigate

Ramana jest powszechnie stosowaną metodą badań materiałów biologicznych, w tym tkanek miękkich. Jest to metoda nieinwazyjna, nadająca się do zastosowań in-vivo [3,4].

### Materiał i metody

Płat skóry do badań in vitro pobrano z obszaru uda, ze zwłok mężczyzny w wieku 53 lat. Próbki wycięto za pomocą specjalnego wykrojnika w dwóch kierunkach: wzdłuż i w poprzek do linii Langera. Do momentu wykonania pomiarów były one przechowywane w temperaturze pokojowej w roztworze soli fizjologicznej. Widma ramanowskie zostały uzyskane przy pomocy spektrofotometru Bruker RFS 100, wykorzystującego laser Nd:Yag (1064nm) o mocy 450mW, jako źródło promieniowania wzbudzającego. Wykonywano 128 skanów, rozdzielczość wynosiła 4cm<sup>-1</sup>. Próbkę skóry umieszczano w specjalnie zaprojektowanym aparacie pozwalającym na kontrolę stopnia rozciągnięcia próbki, który umieszczano w spektrofotometrze. Widma rejestrowano dla kolejnych etapów rozciągania próbki skóry (początkowo, co 0,5mm, a po przekroczeniu 6mm wartości wydłużenia próbki, co 1mm) aż do osiągnięcia maksymalnego rozciągnięcia. Równolegle przeprowadzono badania mechaniczne. Zastosowano maszynę wytrzymałościową MTS Synergie 100, dzięki której wykonano testy jednoosiowego rozciągania (w podobny sposób, jak w trakcie badań spektroskopowych) dzięki czemu wyznaczono podstawowe parametry mechaniczne.

#### Wyniki i dyskusja

Dla wszystkich badanych próbek uzyskano nieliniowe charakterystyki odkształceniowo – naprężeniowe (FIG.1), co jest charakterystyczne dla tkanek miękkich [6].

Wyznaczono umowny moduł Younga i wartość przy której dochodziło do uszkodzenia próbki. Otrzymane wartości wyznaczonych parametrów mechanicznych były prawie dwukrotnie większe dla próbek skóry pobranych zgodnie z liniami Langera. Dla uzyskanych charakterystyk można było wyróżnić charakterystyczne przedziały odpowiadające poszczególnym etapom testu, które są związane z kierunkiem ułożenia włókien kolagenowych w skórze [5,6].

Położenie pasm drgań amidu I i amidu III w widmie skóry ludzkiej, odpowiednio przy 1658cm<sup>-1</sup> oraz 1266 m<sup>-1</sup> świadczy o tym, że białka skóry występują głównie w konformacji αhelikalnej Taką konformację struktur białkowych potwierdza także obecność w widmie skóry pasma związanego z drganiem rozciągającym C-C łańcucha około 939cm<sup>-1</sup>. Pasma przy 859 i 876cm<sup>-1</sup> są związane z drganiami v(C-C) proliny i hydroksyproliny, aminokwasów typowych dla kolagenu [7,8].

Rozciąganie próbki skóry spowodowało zmiany w położeniu omawianych pasm w widmie (RYS.2). Przesunięcie się pasma amidu I wraz ze wzrostem wartości odkształcenia było widoczne zwłaszcza dla próbki pobranej wzdłuż linii Langera. Zwracają uwagę punkty charakterystyczne na krzywej zależności przesunięcia pasma w funkcji odkształcenia: ~5%,~20%i ~40%. W tych punktach obserwujemy gwałtowne przesunięcia się pasma typowego biological materials, including soft tissues. It is a noninvasive technique suitable for in-vivo applications [3,4].

#### Materials and methods

A skin for in vitro investigations was taken from a male (aged 53) cadaver's thigh area. Specimens were excised in two directions: along and across the Langer lines, using a special punch. The specimens were stored in physiological saline at room temperature until measurements. Raman spectra were obtained using a Bruker RFS 100 spectrophotometer with a 450mW Nd:Yag laser (1064nm) as the excitation radiation source. 128 scans were performed at a resolution of 4cm<sup>-1</sup>. A skin specimen was installed in a specially designed apparatus (making it possible to control the degree of specimen stretching) which was placed in the spectrophotometer. Spectra were recorded for the consecutive stages of skin specimen stretching (initially at every 0.5mm and once 6mm specimen elongation was reached, at every 1mm) until rupture. Simultaneously mechanical tests were carried out. An MTS Synergie 100 testing machine was used to carry out (in a similar way as during the spectroscopic investigations) uniaxial tension tests in order to determine major mechanical parameters.

# **Results and discussion**

Nonlinear stress-strain dependencies (FIG.1), characteristic of soft tissues, were obtained for all the specimens [6].

Conventional Young's modulus and the value at which the specimen failed were determined. The determined values of the mechanical parameters were twice higher for the skin specimens excised along Langer lines. Characteristic intervals (corresponding to the particular test stages), connected with the orientation of the collagen fibres in the skin, could be distinguished [5,6].

The location of amid I and amid III vibration bands in the human skin spectrum at respectively 1658cm<sup>-1</sup> and 1266cm<sup>-1</sup> shows that skin proteins occur mainly in an  $\alpha$ -helical conformation. The presence of a band associated with the C-C chain stretching vibrations at circa 939cm<sup>-1</sup> corroborates this





FIG.1. Stress-strain curves typical for human skin specimens excised along and across Langer lines from thigh area.



RYS.2. Położenie pasma amidu I w funkcji odkształcenia: a) próbka skóry wycięta wzdłuż linii Langera, b) próbka skóry wycięta w poprzek linii Langera. FIG.2. Amide I location as function of strain: a) skin specimen excised along Langer lines, b) skin

specimen excised across Langer lines.

dla kolagenu w kierunku niższych wartości liczb falowych świadczące o porządkowaniu się części włókien kolagenowych w kierunku działającego naprężenia. Zrywanie się włókien kolagenu odbywa się stopniowo, aż po osiągnięciu 40% odkształcenia wszystkie włókna białka biorą udział w przenoszeniu obciążeń. W przypadku próbki pobranej wzdłuż linii Langera do wartości odkształcenia około 33%, odpowiadającemu maksymalnemu odkształceniu, w przybliżeniu nie obserwuje się przesunięć w położeniu pasma amidu I.

# Podsumowanie

W przeprowadzonych równolegle testach mechanicznych i pomiarach spektroskopowych otrzymano porównywalne wartości zakresów w których zachodzą zmiany, w trakcie rozciagania próbek skóry ludzkiej. Podobne rezultaty autorzy otrzymali we wcześniej przeprowadzonych badaniach na materiale zwierzęcym. Otrzymane wyniki są obiecujące, świadczą o możliwości zastosowania spektroskopii Ramana jako nieinwazyjnej metody, która umożliwi określenie kierunku ułożenia włókien kolagenowych w skórze w trakcie jej rozciągania. Informacja ta jest niezwykle istotna z punktu widzenia zabiegów operacyjnych, zwłaszcza w transplantacji skóry, ponieważ zachowanie odpowiedniego przebiegu włókien kolagenowych sprzyja m.in. lepszemu gojeniu się ran i zmniejszeniu widoczności blizny [1].

#### Acknowledgements

Praca wykonana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N 518 038 31/3666.

#### strain was particularly visible for the specimen taken along Langer lines. Characteristic points: ~5%, ~20% and ~40% on the band shift-strain curve are notable. Abrupt shifts of the band typical for collagen towards lower wavenumber values occur in these points. The shifts indicate that some of the collagen fibres arrange themselves consistently with direction of the stress. The rupture of the collagen fibres is gradual. When 40% of the strain is reached, all the protein fibres take part in load carrying. In the case of the specimen taken along Langer lines, no shifts in the amid I location are observed up to about 33% strain (the maximum strain).

#### Conclusion

The mechanical tests and the spectroscopic measurements, conducted simultaneously, yielded comparable ranges of changes taking place during the stretching of human skin. The previous investigations on animal material carried out by the authors yielded similar results. This is promising and indicates that Raman spectroscopy as an noninvasive technique can be used to determine the orientation of collagen fibres in skin as the latter is being stretched [1]. This information is vital from the surgical procedure point of view, particularly in skin transplantation, since the preservation of the proper arrangement of the collagen fibres contributes to better healing of wounds and reducing scar visibility [1].

#### Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education within the framework of grant No. N 518 038 31/3666.

### References

The stretch-

in the spec-

trum (FIG.2).

The shift of the

amid I band with the increase in

[5] Daly, C. H.: Biomechanical properties of dermis. Journal of Investigative Dermatology 79 (1982) 17-20.

[6] Fung Y.C.: Biomechanics: Mechanical properties of living tissues. Springer-Verlag New York, Inc. 1993.

[7] Gniadecka M., Nielsen O.F., Heidenheim M., Christensen D.H., Wulf H.Ch.: Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. The Journal of Investigative Dermatology 111 (1998) 1129-1133.

[8] Gniadecka M., Nielsen O.F., Christensen D.H., Wulf H.Ch.: Structure of water, proteins and lipids in intact human skin, hair and nail. The Journal of Investigative Dermatology 110 (1998) 393-398.

# Piśmiennictwo

[1] Arumugam V., Naresh M.D., Sanjeevi R.: Effect of strain rate on the fracture behavior of skin. Journal of Biosciences 19 (1994) 307–313.

[2] Edwards Ch., Marks R.: Evaluation of Biomechanical Properties of Human Skin. Clinics in Dermatology 13 (1995) 375-380.

[3] Schrader B., Dippel B., Erb I., Keller S., Löchte T. Schulz H., Tatsch E., Wessel S.: NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects. Journal of Molecucular Structure 480-481 (1999) 21-32.

[4] Olsztynska-Janus S., Szymborska K., Komorowska M., Lipinski J.: Usefulness of spectroscopy for biomedical engineering. Acta of Bioengineering and Biomechanics 10 (2008) 45-9.

# WSTĘPNE BADANIA KOMPOZYTOWEGO STABILIZATORA ZEWNĘTRZNEGO O ZMIENNEJ PODATNOŚCI

FILIPIAK J.1\*, BĘDZIŃSKI R1\*, CHŁOPEK J.2

<sup>1</sup>Politechnika Wrocławska, ul Łukasiewicza 7/9, 50-371 Wrocław <sup>2</sup>Akademia Górniczo – Hutnicza, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

\*MAILTO: JAROSŁAW.FILIPIAK@PWR.WROC.PL

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 211-213]

### Wprowadzenie

Stabilizatory zewnętrzne kości długich stosowane są w praktyce klinicznej przede wszystkim do leczenia skomplikowanych złamań. Niektóre konstrukcje pozwalają na dokonywanie korekcji osi kończyny, czy też ich wydłużanie. Zadaniem każdego stabilizatora zewnętrznego jest przejęcie funkcji kości w zakresie przenoszenia obciążeń, jakie na nia działają, unieruchomienie odłamów kostnych oraz zapewnienie dynamizacji miejsca zespolenia odłamów. Cechą współczesnych stabilizatorów jest ich "programowa" sztywność zapewniająca dynamizację miejsca zespolenia odłamów, szczególnie w kierunku osiowym [1,2]. W świetle doniesień literaturowych to właśnie przemieszczenia odłamów kostnych, wywołujące określony stan odkształcenia w miejscu zespolenia, są jednym z podstawowych bodźców decydujących o przebiegu procesu powstawania i różnicowania się tkanek w szczelinie międzyodłamowej [2,3,5]. Celem prezentowanej pracy jest wyznaczenie właściwości mechanicznych prototypowego, kompozytowego stabilizatora zewnętrznego o zmiennej sztywności, przeznaczonego do leczenia złamań kości długich kończyn górnych i dolnych.

### Cel pracy, materiał badawczy

Badania prowadzono dla trzech stabilizatorów wykonanych z materiałów kompozytowych o różnych właściwościach mechanicznych. Badany stabilizator zewnętrzny powstał w wyniku współpracy Politechniki Wrocławskiej i Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Jest to jednopłaszczyznowy stabilizator typu klamrowego (RYS.1). Stabilizator zaprojektowano tak, aby możliwa była zmiana jego sztywności w czasie procesu leczenia złamania. Zmiana sztywności stabilizatora w funkcji czasu, leczenia pozwala na dostosowanie podatności konstrukcji stabilizatora do zmieniających się właściwości biomechanicznych tkanek rozwijających się w szczelinie złamania [1]. Opracowany stabilizator składa się z trzech płytek nakładanych kolejno jedna na druga. Płytka bazowa, usytuowana najbliżej leczonej kości łączona jest z odłamami za pośrednictwem czterech śrub wykonanych ze stali 316L. Do płytki bazowej dołączane są kolejne dwie płytki o odpowiednio zaprojektowanej geometrii. Zmiana sztywności w omawianym stabilizatorze odbywa się w sposób dyskretny, poprzez zmianę liczby elementów konstrukcyjnych biorących udział w przenoszeniu obciążeń działających na stabilizator (RYS.1).

W przeprowadzonych badaniach analizowano stabilizatory wykonane z trzech różnych kompozytów: PEEK i wyso-

# PRELIMINARY TESTS OF COMPOSITE EXTERNAL FIXATOR WITH CHANGEABLE STIFFNESS

FILIPIAK J.1\*, BĘDZIŃSKI R1\*, CHŁOPEK J.2

<sup>1</sup>TECHNICAL UNIVERSITY OF WROCŁAW, 7/9 LUKASIEWICZ STR., 50-371 WROCŁAW, POLAND <sup>2</sup>AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGYY IN CRACOW, 30 MICKIEWICZ AV., 30-059 CRACOW,POLAND \*MAILTO: JAROSŁAW.FILIPIAK@PWR.WROC.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 211-213]

#### Introduction

In clinical practice, the external fixators are used mostly in the treatment of complicated fractures and false joints. Some of the construction enables to make correction of limb axis and the elongation of limbs. Regardless of its design, each fixator's function is to take over load bearing from the bone and the bone fragments fixation. The mark of contemporary external fixators are their define stiffness that to ensure the dynamisation of the bone union site [1,5]. The mechanical properties of the fixator construction determine the extent of displacement of the fragments of the treated bone and the resultant bone regenerate deformity. It is a kind of mechanical signal received by the tissue cells, which is changed into an appropriate chemical signal triggering processes of tissue differentiation [2,5,6]. The aim of this paper is mechanical properties of prototype composite external unilateral fixator with specific changeable stiffness. This fixator is designed for treatment of lower and upper long bone fractures.

### Material and metodology

The objects of the experimental investigations were unilateral external fixator. The project of researched composite external fixator has been arisen from co-operation between Technical University of Wrocław and University of Mining and Metallurgy in Cracow. The main idea of the described fixator is possibility of change their stiffness in the function of treatment process time. Change of fixator stiffness during the processes healing is very important, because it is possible the mechanical characteristic of the fixator adaptation to biomechanical condition of tissue in interfragmentary gap.

The examined external fixators were consisting with tree plates fixing one on top of the other. Individual elements are joining by means of screws with metrical thread. The basic plate of external fixator is connected with bone fragments through screws with normalized bone thread, made of steel 316L. The change of fixator stiffness achieve in a gradual manner on the way next structural elements separate.

We tested fixators made with tree different composite material. Tree materials were used: composite PEEK and one direction high modulus carbon fiber (1D), composite PEEK and one direction middle modulus carbon fiber (1DM), composite PEEK two direction high modulus carbon fiber (2D).

For this purpose the authors developed a simplified model of system: external fixator – bone fragments. The model consists of external fixator structural elements, bone fragments and bone screws

. . . . . . . . . . . . . . . . . . .

212

komodułowe włókna węglowe o jednokierunkowej orientacji (1D), PEEK i średniomodułowe włókna węglowe o jednokierunkowej orientacji (1DM), PEEK i wysokomodułowe włókna węglowe o orientacji dwukierunkowej (2D).

### Metoda badań

Badania przeprowadzono na modelach fizycznych układu stabilizator – odłamy kostne. Stabilizatory zamontowano na ele-



RYS.1. Model fizyczny układu stabilizator płytkowy – odłamy kostne (a) oraz schematy obciążenia stosowane podczas testów (b). FIG.1. Physical model of external fixator – bone fragments system (a) and scheme the system loading (b

mentach rurowych modelujących odłamy kości długiej. Elementy te zostały wykonane z polietylenu usieciowanego, a ich wymiary były następujące: długość L=450 mm, średnica zewnętrzna  $d_z$ =30mm, a średnica wewnętrzna  $d_w$ =20mm.

Przygotowane w ten sposób modele fizyczne poddano obciążeniu: siłą osiową, momentem zginającym i momentem skręcającym. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono wartości współczynników sztywności: osiowej k<sub>A</sub>, giętnej k<sub>A-P</sub>, k<sub>M-L</sub> i skrętnej k<sub>R</sub> stabilizatora w rozpatrywanych konfiguracjach. Współczynniki sztywności, zdefiniowano jako iloraz wartości obciążenia i wywołanego nim przemieszczenia. Pomiary przeprowadzono na stanowisku obciążającym MTS MiniBionix 858. Poszczególne wartości współczynników sztywności wyznaczono dla trzech wariantów konfiguracji stabilizatora: (i) stabilizator z jedną płytką – bazową, (ii) stabilizator z dwoma płytkami, (iii) stabilizator z kompletem trzech płytek. Dodatkowo jako parametr zmienny analizowano również odległość b płytki bazowej od kości. Parametr ten przyjmował wartości 10mm i 15mm.

# Wyniki

Na podstawie zarejestrowanych wyników uzyskano charakterystyki ilustrujące zmiany wartości siły w funkcji przemieszczenia F=f(d). Korzystając z tych charakterystyk wy-

znaczono współczynniki sztywności: osiowej  $k_A$ , giętnej  $k_{A-P}$ ,  $k_{M-L}$  i skrętnej  $k_R$  stabilizatorów w analizowanych konfiguracjach. Przykładowe wyniki przedstawiono na RYS.2.

# Dyskusja

Uzyskane charakterystyki FA(d) są nieliniowe, co odróżnia prototypowe stabilizatory od innych konstrukcji jednopłytkowych, np.: Zespol, Polfix [6], Orthofix, Hoffmann [4]. W założeniach konstrukcyjnych wielopłytkowa budowa stabili-



RYS.2. Wartości współczynników sztywności osiowej wyznaczonych dla porównywanych stabilizatorów w zależności od parametru b-odległości płytki bazowej od kości: a) stabilizator z materiału1D, b) stabilizator z materiału 2D.

FIG.2. Value of axial stiffness coefficient for different level of parameter b- distance between basic plate and surfaces of the bone fragments: a) fixator 1D, b) fixator 2D.

joining of fixator and bone fragments. High density polyethylene pipe were used to simulate true bone to construct the configuration. The polyethylene pipes were prepared in two sections, each 200mm long and 30 mm in external and 20 mm in internal diameter.

The physical models of

system: external fixator - bone fragments were loading: axial force, bending moment and torsion moment (FIG.1). On the basis load-displacement characteristics axial stiffness coefficient k0, bending stiffness kA-P (in anteroposterior direction), kM-L (in lateral direction) and torsional stiffness kR were determined. Stiffness coefficients were defined as the ratio of load value to bone fragments displacement in direction of the applied load. Testing was performer using an MTS Machine, MiniBionix 858. Value of each stiffness coefficient we determined for tree cases: (i) basic fixator - only one plate, (ii) basic plate with one plate, (iii) complete fixator- basic plate and two additional plates. Additionally we analyzed how is influence of distance (b) between basic plate and surfaces of the bone fragments on external fixator stiffness. We examined two values of parameter b: 10 and 15mm.

# Results

On the basis of experimental data force – displacement characteristics F=f(d) for analysed cases determined. On the basis these characteristics axial stiffness coefficient k0, bending stiffness  $k_{A-P}$ ,  $k_{M-L}$  and torsional stiffness  $k_R$  were cal-

culated. The sample results demonstrated on the FIG.2.

zatora ma umożliwiać zmianę sztywności stabilizatora w funkcji czasu leczenia. W przypadku konstrukcji wykonanych z kompozytów 1D i k63712 zakres takich zmian jest bardzo ograniczony – odpowiednio: 200,9 N/mm (iii), 193,6N/mm (ii), 174,9N/mm (i) dla konstrukcji z kompozytu 1D, co daje możliwość zmiany sztywności o 13%, a w przypadku zastosowania materiału k63712 sztywność osiowa osiąga wartości: 181,9N/mm (iii), 170,7N/mm (ii), 146,3N/mm (i), co zapewnia zmianę o 19,6%. Znacznie szerszy zakres zmian sztywności (blisko 48%) uzyskuje się przypadku stabilizatora wykonanego z materiału o strukturze dwukierunkowej (2D). W tym przypadku najwyższa wartość sztywności osiowej wynosi  $k_a$ =130,6N/mm.

W przypadku stabilizatorów o konstrukcji klamrowej jednym z parametrów geometrycznych wykorzystywanym do kształtowania sztywności stabilizatora jest odległość b płytki od powierzchni kości. Również w analizowanych przez nas konstrukcjach parametr ten daje możliwość sterowania wartością sztywności stabilizatora. Przykładowo w przypadku sztywności osiowej zmieniając odległość b z 10 do 15mm uzyskano zmniejszenie wartości sztywności od 12 do 18% w zależności od badanego wariantu konfiguracyjnego stabilizatora.

Przeprowadzone badania pokazują, że przyjęta koncepcja konstrukcji kompozytowego stabilizatora zewnętrznego pozwala na praktyczne zrealizowanie postulatu zmiennej sztywności stabilizatora w czasie leczenia złamania. Warto podkreślić, że zastosowanie kompozytów polimerowo-węglowych daje wiele korzyści istotnych w praktyce klinicznej. Oprócz uzyskania pożądanych charakterystyk mechanicznych stabilizatora, możliwe jest obniżenie jego masy, a także zwiększa się możliwość wykorzystania techniki rentgenowskiego obrazowania do oceny postępu procesu zrostu kostnego.

#### Podziękowania

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant nr 0408/R/2/T02/06/01)

#### Discussion

Prototype fixators showed a non-linear pattern in each of loading model. It is opposed effect to the other unilateral fixators: Zespol, Polfix [6], Orthofix, Hoffmann [4].The main idea of fixators is possibility of change their stiffness in the function of treatment process time. In the case fixators with was made from composite 1D and 1DM the range of stiffness change it has been very limited. For example axial stiffness for fixator made with composite 1D fare values: 200,9 N/mm (iii), 193,6N/mm (ii), 174,9N/mm (i), and change of stiffness about 13% after-effects. In the case of fixator made with composite 1DM adequately values of axial stiffness are: 181,9N/mm (iii), 170,7N/mm (ii), 146,3N/mm (i), and change of stiffness about 20%. Much wider range of stiffness change –on the level 48% - is possibility in the case fixator made with two direction structure material (2D).

Distance between basic plate and surfaces of the bone fragments (parameter b) has been one of the most important geometrical parameter, that has decisive about fixator stiffness [6]. Results our investigations showed, that change parameter b from 10mm to 15mm decrease value o axial stiffness (about 12 -18%).

The obtained results clearly show that composite external fixator idea allow practically execute of postulate variable of fixator stiffness in the function of treatment process time. It's very important that application composite material offer many other essential advantages in medical practice. Aside from adequate mechanical characteristics of external fixator is possible reduce of its weight as well as increase possibility take advantage of X-ray technique to assessment of the bone fracture healing and callus formation progress.

#### Acknowledgment

. . . . . . . . . . . . .

This work was supported by grant no. 0408/R/2/T02/06/01 from the Polish Ministry of Science and Higher Education

# Piśmiennictwo

[1] Będziński R., Filipiak J. (1999): Experimental analysis of external fixators for femoral bone elongation. Acta Bioeng. Biomech., Vol.1, No 2, pp. 93-105

[2] Claes L.E., Heigele C.A. (1998): Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. J. Biomech., 32, pp. 255-266

[3] Filipiak J., Ścigała K. (2004): Displacement of bone fragments as a factor determining bone regenerate formation. Engineering of Biomaterials, No. 38-42, pp. 136-138 [4] Podolski A., Chao E.Y.: Mechanical performance of Ilizarov circular external fixators in comparison with other external fixators. (1993), Clin. Orthop., pp. 61-70

References

 [5] Prendergast P.J., Huiskes R., Sřballe K. (1997): Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces.
 J. Biomech., Vol. 30, pp. 539–548

[6] Ramotowski W.: Stabilizatory płytkowe Zespol i Polfix. (1998) BHH Mikromed

# DEGRADACJA MIESZANIN POLIMEROWYCH POLIURETANU Z POLILAKTYDEM W SYMULOWANYM ŚRODOWISKU BIOLOGICZNYM

J.GAJOWY, P.BEDNARZ\*, J.LASKA

Akademia Górniczo – Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów Al. Mickiewicza 30, 30–059 Kraków \*MAILTO: pbednarz@agh.edu.pl

### Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki szczegółowych badań degradacji mieszaniny poliuretanu i poli(L-laktyd-co-DL-laktydu) PU/PLDL w symulowanym środowisku biologicznym. Mieszanina o takim składzie charakteryzuje się bardzo dobrą poręcznością chirurgiczną, tj. można uzyskiwać cienkie, elastyczne i wytrzymałe folie, łatwe do przyszycia do tkanki żywej.

Proces biodegradacji był badany poprzez inkubację sześciennych próbki o boku 1m w wodzie destylowanej i płynie Ringera w temp. 37°C przez okres 4 miesięcy i obserwację zmian pH, przewodnictwa, ubytku masy oraz czasu przejścia fali ultradźwiękowej.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 214-217]

# Wprowadzenie

Polimery, ze względu na bardzo różnorodne właściwości fizyczne oraz małą reaktywność chemiczną, są bardzo często wykorzystywane do zastosowań medycznych. Jak każdy biomateriał muszą one jednak wykazywać cechy warunkujące ich prawidłowe działanie w żywym organizmie czyli biozgodność. Istotne cechy biomateriału to brak toksyczności, brak wpływu na układ immunologiczny organizmu oraz nie wywoływanie hemolizy (dotyczy to implantów mających bezpośredni kontakt z krwią) przez cały okres implantacji, a więc dotyczy to nie tylko samych polimerów, ale również produktów ich degradacji w organizmie. W niniejszej pracy szczegółowym badaniom poddano proces biodegradacji mieszaniny polimerowej polilaktydu z poliuretanem.

Polilaktyd jest jednym z najszerzej i najdłużej stosowanych polimerów biomedycznych. Należy on do grupy poliestrów alifatycznych i ulega degradacji w wyniku hydrolizy połączeń estrowych. Hydroliza łańcuchów polilaktydu prowadzi do powstania kwasu mlekowego, substancji naturalnie występującej w organizmie ludzkim. Powstały kwas mlekowy ulega w cyklu Krebsa rozpadowi na proste produkty przemiany materii, jakimi są dwutlenek węgla i woda [1]. Rola enzymów w całym procesie degradacji nie jest całkowicie poznana. Wiadomo, że działalnie enzymów jest bez znaczenia w stanie szklistym polimeru, natomiast odgrywa znaczącą rolę, gdy polimer jest w stanie elastycznym [2]. Na szybkość rozkładu biologicznego wpływa także wielkość próbki oraz jej porowatość. Najczęściej szybkość degradacji w masie jest większa niż na powierzchni próbki, szczególnie gdy pory są na tyle duże, że umożliwiają swobodną migrację komórek w głąb materiału [3]. Masa cząsteczkowa i polidyspersyjność polimeru również wpływa na proces degradacji materiału. Duży rozrzut mas cząsteczkowych wskazuje na

# DEGRADATION OF POLYMER MIXTURE OF POLYURETHANE AND POLYLACTIDE IN SIMULATED BIOLOGICAL ENVIRONMENT

J.GAJOWY, P.BEDNARZ\*, J.LASKA

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, 30 MICKIEWICZ AV., 30–059 CRACOW, POLAND \*MAILTO: PBEDNARZ@AGH.EDU.PL

# Abstract

In this work results of detailed research on polymer mixture of polyurethane and poly(L-lactide-co-DLlactide) PU/PLDL in simulated biological environment are presented. The mixture of this composition can be easily manoeuvred during the surgery, i.e., thin, elastic, mechanically resistant and suture convenient films can be manufactured.

Samples of cubical shape with all three dimensions of 1cm were incubated in water and Ringer's fluid for four months, and concurrently measurements of pH, conductivity, loss of mass and time of ultrasonic wave passing were carried out.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 214-217]

### Introduction

Polymers, in view of variety of physical properties and low chemical activity, are very often used in medical applications. Like every biomaterial, they have to show properties determining their correct working in the live organism, means biocompatibility. Most importantly, biomaterials should be non-toxic, not influencing the immunological system, and not causing a haemolysis (particularly if implant directly contacts with blood) for whole period of implantation. It means, not only polymers must be clinically harmless, but also their degradation products. In this work, process of degradation of polymer mixture of PU/PLDL has been carried out in detail.

Polylactide is one of the most widely and long time used biomedical polymer. It belongs to a group of aliphatic polyesters and degrades upon hydrolysis of the ester groups. The hydrolysis of polylactide chain leads to the lactic acid, a substance naturally occurring in a human body. The created lactic acid decomposes in Krebs' cycle to simple products of metabolism, i.e., water and carbon dioxide. Enzymes role in the degradation process still is not fully explained. However, it is known that activity of enzymes is meaningless when the polymer is in its glassy state, but takes an important part when polymer is in elastic state [2]. Sample dimensions and porosity also influence the rate of biological decomposition. Most often the degradation rate in the deeper parts of a sample is higher than on the surface, especially if pores are big enough to allow free migration of water inside the material [3]. Molecular weight and polydispersity also influence the decomposition process. Namely, high level of polydispersity indicates high content of oligomers which degrades faster to low molecular products than long polymer chains.

Polyurethane was used because of easiness of changing mechanical properties suitably to specific medical needs,

dużą zawartość oligomerów, które szybciej ulegają procesowi degradacji do produktów małocząsteczkowych niż długie łańcuchy polimerowe.

Poliuretan został użyty ze względu na ogromne możliwości dostosowania właściwości mechanicznych do określonych potrzeb medycznych oraz ze względu na dobrą biozgodność z krwią. Z badań literaturowych wynika, że poliuretany zawierające w swej strukturze segmenty poliestrowe są bardziej wrażliwe na hydrolizę, natomiast zawierające segmenty polieterowe ulegają rozpadowi poprzez kumulację i propagację pęknięć łańcucha [4]. Wiąże się to z przeorganizowaniem struktury poliuretanu tj. formowaniem struktury z regionami o zwiększonej zawartości giętkich albo sztywnych segmentów. Mobilność segmentów zmienia się w zależności od polarności środowiska. Dzięki temu powierzchnia poliuretanu zostaje wzbogacona w polarne sztywne segmenty w środowisku polarnym (woda albo krew), a w segmenty giętkie w środowisku niepolarnym (powietrze albo próżnia) [4]. Ponadto polimery zawierające większą ilość sztywnych segmentów wykazują mniejszą podatność na rozrywanie łańcucha z udziałem enzymów. Znaczenie ma także zdolność giętkich segmentów do krystalizacji w wyniku naprężeń. Rozkład biologiczny poliuretanu przez monocyty lub makrofagi wiąże się z działaniem esterazy i jest w dużym stopniu zależny od budowy chemicznej sztywnych segmentów, a dokładnie od obecności wiązań wodorowych. Budowę chemiczną PU można zaprojektować w taki sposób, że będzie ulegał częściowej lub całkowitej degradacii w określonym czasie. Można to uzyskać modyfikując giętkie segmenty polilaktydem (PLA), poliglikolidem (PGA), polikaprolaktonem (PCL) lub tlenkiem polietylenu (PEO) [4].

#### Materiały i metody

Do badań wykorzystano mieszaniny poliuretanu i polilaktydu o zawartości 95% wag PU i 5% wag PLDL. Materiał o tym składzie wykazuje bardzo dobrą poręczność chirurgiczną. Mieszaniny uzyskiwano poprzez zmieszanie roztworów obu polimerów w DMF w temp. 50-60°C.

Zastosowano poliuretan firmy Bayer, który w swej budowie zawiera sztywne segmenty heksametylenodiizocyjanianowe (HMDI) i giętkie segmenty z polikaprolaktonu (PCL). PCL nadaje elastyczność, dobrą współmieszlaność z innymi polimerami, a także biodegradowalność. Przedłużaczem łańcucha jest izosorbitol, związek otrzymywany z produktów naturalnych, a przez to zwiększający biokompatybilność poliuretanu. Izosorbitol jako przedłużacz łańcucha powoduje także wzrost krystaliczności polimeru, co przekłada się na wzrost wytrzymałości materiału [5].

Polilaktyd, a właściwie kopolimer L- i D-laktydu - poli(Llaktyd-co-DL-laktyd) - o zawartości 80% L-laktydu i 20% DL-laktydu zakupiono w firmie Purac.

Próbki do badań degradacji przygotowano w formie kostek o wymiarach 1cm x 1cm x 1cm. Dla porównania wykonano także kostki z czystych polimerów PU oraz PLDL. Próbki inkubowano w wodzie destylowanej i płynie Ringera w temperaturze 37°C przez cztery miesiące. Zmiany degradacyjne badano oceniano na podstawie zmian przewodnictwa i pH inkubowanych roztworów. Pomiary wykonano za pomocą pH-metru CP-411 (Elmetron) oraz konduktometru CC-315 (Elmetron). Przeprowadzono także pomiary zmian masy próbek oraz czasu przejścia fali ultradźwiękowej w trakcie inkubacji. Pomiar masy wykonywano za pomocą wagosuszarki WPS30S (Radwag), natomiast badania ultradźwiękowe wykonano przy pomocy głowicy Ultrasonic CT3 (Unipan).

and also for its good biocompatibility with blood. It is known from the literature that polyurethanes which possess polyester segments are much more sensitive on hydrolysis, on the other hand the ones built up of polyether segments degrade by the aggregation and propagation of chain cracks. It is connected with reorganisation of polyurethane structure, that is with forming areas enriched in flexible or rigid segments. The segments mobility depends on polarity of the environment. In polar environment (water or blood) polyurethane surface become enriched in rigid segments, and in nonpolar environment (air or vacuum) - in flexible segments [4]. Moreover, polymers containing more rigid segments are less susceptible on chain cleavage by enzymes. Ability of crystalisation of flexible segments upon stress can also influence the degradation process. Biological decomposition of polyurethane by monocytes or macrophages includes activity of esterase and depends on chemical structure of rigid segments, and specifically on the presence of hydrogen bonds. Chemical structure of polyurethane can be designed such a way, that it degrades partially or totally in specific time. It can be achieved by modification of flexible segments with polylactide (PLA), polyglicolide (PGA), polycaprolactone (PCL) or polyethylene oxide (PEO) [4].

#### Materials and methods

Mixtures of polylactide and polyurethane containing 95% of PU and 5% of PLDL were used in the research. The material of this composition can be easily manoeuvred during the surgery. The mixtures were prepared by mixing both kinds of polymers in DMF in the temperature of 50-60°C.

Polyurethane was purchased from Bayer. It is built up of hexamethylenediisocyanate (HMDI) rigid segments and polycaprolactone (PCL) flexible segments. PCL is responsible for the elasticity of PU, and facilitates its blending with other polymers and also biodegradability. The chain extender is isosorbitol, a compound obtained from natural products, what improves biocompatibility of the PU. Isosorbitol causes also higher crystallinity of the polymer, which, in turn, gives the polymer higher mechanical strength.

Ploylactide, i.e., copolymer of L- and D-lactide – poly(Llactide-co-DL-lactide) – consists of 80% of L-lactide and 20 % of DL-lactide. It was purchased from Purac.

The samples were prepared in cubical shape with 1cm dimensions. For the comparative studies also cubes of pure polymers were formed. Samples were incubated in water and Ringer's fluid in temperature 37°C for 4 months. Degradation process was observed by pH and conductivity changes of the solutions. The measurements were carried out with pH-meter CP-411 (Elmetron), conductometer CC-315 (Elmetron). Mass loss measurements were done with drying balance WPS30S (Radwag), and passing time of ultrasound waves - with using Ultrasonic CT3 apparatus (Unipan).

# **Results and discussion**

. . . . . . . . . .

The change of the pH value for pure polymers, PLDL and PU, are shown in FIG.1 (a and b). One can notice that degradation of both polymers runs without significant changes of the pH. The pH value stays at ~6 independently on what medium the polymers are immersed in, i.e. it is only slightly acidic. This phenomenon is probably connected with reversibility of the reactions of hydrolysis of ester groups, which causes reconstruction of ester groups in low molecular weight products. The simulated biological environment is slightly more aggressive in the relation to polylactide than to polyurethane, however degradation runs without the sigBI MATERING OF



RYS.1.Wykresy przedstawiające zmiany wartości pH dla czystych polimerów (PLDL i PU) inkubowanych w a) wodzie destylowanej, b) płynie Singera.

FIG.1. pH changes during the incubation of pure polymers (PLDL and PU) in a) distilled water, b) Ringer's fluid



RYS.2. Wykresy przedstawiające zmiany pH i przewodnictwa dla mieszaniny PU/PLDL inkubowanej w a) wodzie destylowanej b) płynie Singera.

FIG.2. pH and conductivity changes during the incubation of the PU/PLDL mixture in a) distilled water, b) Ringer's fluid.

# Wyniki i dyskusja

Zmiany wartości pH dla czystych polimerów PLDL i PU przedstawione są na RYS.1 (a i b). Pokazują one, że degradacja obu polimerów przebiega bez znaczących zmian pH. Jego wartość przez cały czas inkubacji pozostaje praktycznie stała niezależnie od środowiska w którym zanurzony jest polimer i wynosi ok. 6, czyli odczyn jest tylko lekko kwaśny. Jest to prawdopodobnie związane jest z ciągłym zachodzeniem reakcji odwracalnych rozpadu i tworzenia się estrów o coraz mniejszej masie cząsteczkowej. Symulowane środowisko biologiczne jest nieco bardziej agresywne w stosunku do polilaktydu niż do poliuretanu, jednak niezależnie od rodzaju polimeru degradacja przebiega bez gwałtownych wahań wartości pH i przewodnictwa. Można wobec tego stwierdzić, że polimery te nie powinny wywoływać gwałtownych reakcji i odczynów w organizmie.

Próbki mieszanin PU/PLDL już pierwszego dnia po zanurzeniu w wodzie lub płynie Ringera wykazywały wyraźny odczyn kwasowy (pH=4) (RYS.2a). Było to wynikiem powstawania kwasu mlekowego z polilaktydu oraz kwasu hydroksyheksanowego z mniej podatnego na działanie wody PCL obecnego w PU. Dalsza inkubacja próbki w środowisku wodnym powodowała wzrost pH, co może oznaczać wzrost intensywności procesu hydrolizy sztywnych segmentów PU z utworzeniem wolnych grup aminowych lub amidowych. Natomiast inkubacja w środowisku płynu Ringera (rys.2b) powoduje dalszy spadek pH, co może oznaczać, że dalej przeważają procesy hydrolizy połączeń estrowych PLDL i PCL z wydzielaniem kwaśnych produktów rozpadu. Dopiero po dwóch tygodniach inkubacji następuje wzrost pH, co wskazywałoby na wzrost intensywności zachodzenia procesu hydrolizy wiązań izocyjanianowych w PU.

nificant changes of the pH and conductivity. This behavior is a very good indication that the polymers should not induce unnecessary reactions in the organism.

The mixtures of PU/PLDL showed the strong acidic pH already first day after the submersion in water or Ringer fluid (pH=4) (FIG.2a). This was result of formation of lactic acid from polylactide and hydroxyhexanoic acid from more water sensitive PCL segments present in PU. Farther incubation of the sample in the water environment caused the increase of pH which can mean the growth of the intensity of the process of the hydrolysis of rigid segments in PU with the creation of free amine or amide groups. However incubation in the Ringer fluid (FIG.2b) causes farther decrease of pH which can mean that the processes of the hydrolysis of



RYS.3.Wykres przedstawiający zmiany masy próbek PU/PLDL inkubowanych w wodzie destylowanej. FIG.3. Mass loss of PU/PLDL samples incubated in distilled water.



Zmiany masy próbek inkubowanych zarówno w środowisku wody destylowanej jak i w płynie Ringera (RYS.3) są podobne. We wszystkich badanych próbkach po czterech miesiącach inkubacji zaobserwowano ubytek masy nie przekraczający 40%. Jest to bardzo korzystna szybkość degradacji, gdyż pozwala na równomierne czasowo uwalnianie produktów degradacji do organizmu, generowanie wolnego miejsca dla nowopowstającej tkanki, a jednocześnie niezdegradowana część materiału stanowi rusztowanie dla wzrastającej tkanki.

Dla wszystkich próbek poddanych badaniu ultradźwiękami występuje ta sama prawidłowość: wraz ze spadkiem masy materiału rośnie czas przejścia fali ultradźwiękowej. Jest to prawdopodobnie związane z wnikaniem wody w głąb materiału i niemożliwością jej usunięcia w trakcie suszenia.

Uzyskane wyniki wskazują, że dominującym procesem odpowiedzialnym za degradację PU w środowisku wodnym jest hydroliza. Najszybciej ulegają hydrolizie nietrwałe, bardzo podatne na działanie wody połączenia estrowe. Obecność grup –NH w łańcuchu dodatkowo ułatwia proces hydrolizy. Degradacja hydrolityczna poliuretanów w czystej wodzie jest bardzo powolna, jednakże obecność anionów i kationów ma silny wpływ katalizujący.

#### Wnioski

Inkubacja mieszaniny PLDL/PU w wodzie nie powoduje dużych zmian pH, przy jednoczesnym stałym wzroście przewodnictwa. Inkubacja materiału w symulowanym środowisku biologicznym powoduje większe zmiany pH oraz spadek jego wartości poniżej 4. Spadek wartości pH oznacza wzrost stężenia kwasowych produktów degradacji, jednak wstępne badania in vivo na szczurach dowodzą, że materiał nie wywołuje żadnych odczynów w organizmie. Czyste polimery degradują bez dużych zmian pH, co oznacza, że mechanizm degradacji czystych składników jest trochę inny niż mieszaniny. Ubytek masy mieszaniny wynosi ok. 30% po tygodniu i nie zmienia się podczas dłuższej inkubacji. Materiał może być wykorzystany do otrzymywania resorbowalnych rusztowań dla regenerującej tkanki.

#### Podziękowania

Praca została wykonana w ramach projektu MNiSW N N507 3427 33.

ester groups of PLDL and PCL is the most important in the degradation. The increase of pH was observed after two weeks of incubation suggesting the hydrolysis of isocyanate groups PU.

The changes of the mass of samples incubated both in distilled water and Ringer's fluid are similar (FIG.3). Loss of the mass after four months of incubation was not overcoming 40%. This is the very proper velocity of degradation, because it allows to free the products of degradation to the organism gradually, generate the free space for the regenerating tissue, and simultaneously the non-degraded part of the material makes up the scaffolds for the growing tissue.

All samples subjected to the ultrasounds investigation showed similar behavior: the time of the passage of the ultrasonic wave increased with the mass loss of the material. This is probably connected with penetration of water into the material and the impossibility of its removal during the drying.

The obtained results show that the hydrolysis is the predominant process responsible for degradation PU/PLDL in the water environment. The most water-sensitive ester groups undergo the hydrolysis the most quickly. The presence of –NH groups in the chain additionally facilitates the process of the hydrolysis. The hydrolytic degradation of polyurethanes in water is very slow, yet the presence of anions and cations has the strong catalyzing influence.

#### Conclusions

The incubation of the mixture PLDL/PU in water does not cause large pH changes, however steady increase of the conductivity is observed. The incubation of the material in the simulated biological environment causes larger changes of pH and fall of its value below 4. The decrease of the value of pH means the increase of the concentration of the acidic products of degradation, however preliminary in vivo investigations on rats prove that the material does not cause any reactions in the organism. Pure PU and PLDL degrade without large changes of pH which means that the mechanism of the degradation of the components is different than this of the mixture. The loss of the mass of the mixture after one week was approx. 30% and did not change a lot during longer incubation. The PU/PLDL mixtures can be suitable materials for obtaining resorbable scaffolds for the regenerating tissue.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by MNiSW (Poland) within project N N507 3427 33.

#### Piśmiennictwo

M. Chasin, R. S. Langer; "Biodegrdable polymers as drug delivery systems", Marcel Dekker, New York, 1990, str. 3-6
 Biomateriały Vol. 4, Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Eds: S. Błażewicz, L. Stoch, Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2003, str. 276-279

[3] J. M. Anderson, M. S. Shive; "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres"; Advanced Drug Delivery Review 28 (1997) 5-24

# References

[4] J. P. Santerre, K. Woodhause, G. Laroche, R. S. Labow; "Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implantsto tissue engineering materials"; Biomaterials 26 (2005) 7457-7470

[5] N. M. K. Lamba, K. A. Woodhouse, S. L. Cooper, M. D. Lelah; ", Polyurethanes in biomedical applications"; CRC Press, Boca Raton 1998, str. 65

# 218

# WPŁYW METODY PRZETWÓRSTWA NA WŁAŚCIWOŚCI POLILAKTYDU

#### J. CHŁOPEK, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, A. WIETECHA

Akademia Górniczo–Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów Al. Mickiewicza 30, 30 – 059 Kraków

# Streszczenie

W pracy oceniono wpływ metody przetwarzania (wtrysk, prasowanie) na właściwości termiczne i mechaniczne polimeru resorbowalnego (PLDL). Oceniono również zmiany w szybkości degradacji tego polimeru w zależności od zastosowanej metody przetwórstwa. Właściwości termiczne określono metodą DSC, natomiast szybkość degradacji oceniono na podstawie zmian pH i przewodnictwa płynów inkubacyjnych.

Badania wykazały wpływ metody przetwórstwa na analizowane właściwości PLDL. Metoda wtrysku spowodowała degradację polimeru już w czasie trwania procesu, co objawiło się obniżeniem wytrzymałości. Dopracowania wymaga ustalenie optymalnych parametrów wtrysku, tzn. temperatury i czasu uplastyczniania. Zbyt długi czas przebywania polimeru w strefie grzewczej może sprzyjać degradacji. Polimery otrzymane metodą prasowania prepregów uległy znacznie szybszej degradacji w porównaniu do polimerów otrzymanych metodą wtrysku. Przyczyną tego mogła być łatwiejsza dyfuzja płynu po pozostałych granicach rozdziału pomiędzy poszczególnymi prepregami.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 218-221]

# Wstęp

Do często stosowanych metod formowania polimerowych implantów medycznych należą wtrysk i prasowanie. Metoda wtrysku zyskała swą popularność dzięki niskim kosztom produkcji, wysokiej wydajności, dużej powtarzalności i możliwości otrzymania skomplikowanych kształtów. Problemem jaki napotyka sie w tej metodzie jest dobór odpowiednich parametrów procesu, który dla niektórych materiałów polimerowych jest szczególnie utrudniony. Wiąże się to z faktem, że odpowiednio wysoka temperatura poprawia właściwości reologiczne polimeru, może jednak równocześnie powodować jego degradację. Kolejny problem stanowi zapewnienie właściwej jednorodności w przypadku otrzymywania materiałów kompozytowych. Lepsze rozmieszanie obu faz można uzyskać przez zastosowanie wytłaczarek, z drugiej jednak strony wielokrotne podgrzewanie polimeru może zwiększać jego degradację. Metoda prasowania prepregów otrzymanych z roztworu jest bardziej czasochłonna jednak daje bardziej powtarzalne wyniki i pozwala w większym stopniu sterować rozmieszczeniem i udziałem modyfikatorów w przypadku implantów kompozytowych oraz pozwala na lepszą efektywność wzmocnienia dzięki możliwości zastosowania włókien ciągłych. Jednak ograniczeniem tej metody jest możliwość otrzymania wyrobów o nieskomplikowanych kształtach lub konieczność przeprowadzenia dalszej obróbki mechanicznej, co dodatkowo podnosi koszty produkcji [1,2].

Sposób przetwórstwa może jednak powodować zmiany we właściwościach polimerów, istotnych ze względu na zachowanie biomateriału w środowisku biologicznym. Przede

# THE INFLUENCE OF PROCESSING ON POLYLACTIDE PROPERTIES

#### J. CHŁOPEK, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, A. WIETECHA

AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, 30 MICKIEWICZX AV., 30-059 CRACOW, POLAND

# Abstract

In the present work, the influence of the processing method (injection moulding, prepregs compression) of a resorbable polymer on its thermal and mechanical properties was evaluated. Poly(L-lactide – co-LD-lactide) (PLDL) as resorbable polymer was used. The changes of polymer degradation time depending on their processing method conditions were also investigated. Thermal properties were studied on the basis of DSC, while degradation rate was evaluated on the basis of pH and conductivity changes of incubation solution.

The studies revealed that PLDL properties were influenced by processing methods. Injection moulding caused polymer degradation during processing and it was suggested by strength decrease. Keeping the polymer for long time at high temperature in heating zone may cause degradation process. Therefore, optimization of moulding parameters (temperature, plasticizing time) is required. However, degradation time was significantly longer for samples, which were processed by prepregs compression. It was caused by the presence of borders between prepregs and easier penetration of a solution.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 218-221]

# Introduction

Injection moulding and compression are two methods usually used for polymer implants forming. Popularity of injection moulding is connected with low cost of manufacture, high productivity, large repeatability and possibility to obtain difficult shapes. Optimization the parameters of the process is connected to some typical problems, especially in case of some polymers. It is connected with the fact, that high temperature improves rheological behaviour, however it may cause polymer degradation. The next difficulty concerns securing of the proper homogeneity of composite materials. Improving of the uniformity is possible by using extrusion machines, however it may increase polymer degradation as well.

Compression of prepregs obtaining from solution is timeconsuming, but the results are more repetitive. This method facilitates strict control of distribution and volume fraction contribution of modifying additives in the case of composite materials, as well as enables to use long fibres and in this way obtaining better reinforcement. Restriction for this method is possibility to obtain only the implants with noncomplicated shape and necessity of applying of additional mechanical treatment increasing cost of production [1,2].

Methods of processing may cause changes of some polymer properties, which are important with regard of biological behaviour of implants. First of all, it concerns mechanical properties, crystallinity, chemical purity, degradation rate. Owing to their easy degradation, most significant changes of properties are possible in the case of resorbable polymers. The changes are faster under the influence of elevates wszystkim należą do nich właściwości mechaniczne, stopień krystaliczności, czystość chemiczna, szybkość degradacji. Szczególnie dotyczy to polimerów resorbowalnych, które łatwo ulegają degradacji pod wpływem podwyższonych temperatur lub pod wpływem wilgoci.

Dlatego dla oceny przydatności określonych polimerów resorbowalnych na implanty medyczne konieczne jest wstępne określenie wpływu sposobu przetwórstwa na ich właściwości.

Celem pracy była ocena wpływu metody przetwarzania (wtrysk, prasowanie) na właściwości termiczne i mechaniczne polimeru resorbowalnego (PLDL). W pracy oceniono również zmiany w szybkości degradacji tego polimeru w zależności od zastosowanej metody przetwórstwa. Właściwości termiczne określono metodą DSC, natomiast szybkość degradacji oceniono na podstawie zmian pH i przewodnictwa płynów inkubacyjnych. Taka charakterystyka ma w przyszłości ułatwić dobór metody przetwarzania materiału polimerowego dla konkretnych zastosowań medycznych.

#### Materiały

Kopolimer L-laktydu z DL-laktydem (PLDL-70% L / 30% DL) otrzymano w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu [3]. Polimer ten formowano dwoma metodami, metodą wtrysku oraz metodą prasowania prepregów. Otrzymane próbki miały kształt wiosełek.

Wtrysk prowadzono w temperaturze 160§C w pionowej wtryskarce ślimakowej firmy Multiplas. Przed wtryskiem polimer suszono w 50°C przez 1 godzinę w celu usunięcia wilgoci. Otrzymywanie próbek metodą prasowania prepregów obejmowało dwa etapy. W pierwszym etapie polimer rozpuszczono w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a następnie wylano na szalki w celu otrzymania błonek. W drugim etapie z wysuszonych błonek wycięto próbki w kształcie wiosełek, które następnie prasowano w formie w temperaturze120°C i pod ciśnieniem 110kPa/cm<sup>2</sup>.

Dla tak przygotowanych próbek stosowano następujące oznaczenia:

-  $(PLDL)_{p}$  - PLDL otrzymany metodą prasowania prepregów;

- (PLDL)<sub>w</sub> - PLDL otrzymany metodą wtrysku.

Próbki poddano badaniom termicznym metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) na urządzeniu DSC2010 firmy TAInstruments oraz badaniom mechanicznym na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej (Zwick 1435). Przeprowadzono również badania mikrostrukturalne na skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) Jeol JSM-5400. Następnie wiosełka poddano inkubacji w wodzie destylowanej w temperaturze 37°C przez okres 6 tygodni. Po każdym tygodniu inkubacji rejestrowano zmiany pH i przewodnictwa wody. Po 2, 4 i 6 tygodniach inkubacji zmierzono wytrzymałość próbek.

#### Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania DSC wykazały, że polimer wyjściowy, nieprzetworzony charakteryzował się amorficzną strukturą (RYS.1a). Jego temperatura zeszklenia wynosiła 56,1°C. Badania termiczne polimerów po przetwórstwie wykazały, że zarówno proces prasowania błonek jak i wtrysk wywołały niewielkie zmiany w strukturze polimeru. Proces formowania spowodował niewielki wzrost krystaliczności PLDL (RYS.1b,c), o czym świadczy pojawienie się niewielkiego piku związanego z procesem topnienia fazy krystalicznej. Jednak po wtrysku pik ten jest ostrzejszy, co może wskazywać na nieco większy udział fazy krystalicznej. Podwyższona temperatura może wpływać na porządkowanie temperatures or humidity. Therefore, estimation of usefulness of particular polymers for medical implants is possible after preliminary examination of the influence of processing methods on polymer properties.

The aim of the presented work was the analysis of the influence of resorbable polymer processing (injection moulding, prepregs compression) on their thermal and mechanical properties. Poly(L-lactide – co-LD-lactide). The changes of polymer degradation time depending on their processing were also investigated. Thermal properties were studied on the basis of DSC method, while degradation rate was evaluated on the basis of pH and conductivity changes of incubating solution. This characteristic should facilitate the choice of polymer processing methods for specific medical applications.

#### **Materials**

The synthesis of L-lactide - DL-lactide copolymer (PLDL - 70% L / 30% DL) was performed at the Centre of Polymer and Carbon Materials in Zabrze (Poland) [3]. Two methods of polymer processing were used: injection moulding and compression of prepregs prepared from solution. Obtained samples were in paddle shape.

Injection moulding was performed in 160°C in perpendicular, screw injection moulding machine (Multiplas). Before processing polymer was dried in 50°C, 1 hour in order to remove moisture.

Compression methods included two stages, 1) polymer dissolving in  $CH_2CI_2$  and casting polymer films, 2) cutting out correct shape and prepregs compression in 120°C, 110kPa/cm<sup>2</sup>. The samples prepared by a particular method were related ascribed as follows:

- (PLDL)p PLDL obtained by prepregs compression;
- (PLDL)w PLDL obtained by injection moulding.

Thermal tests of samples were performed by using differential scanning calorimetry (DSC) DSC2010 TAInstruments. Mechanical properties were measured by universal testing machine Zwick 1435. Microscopic observations were performed by using the scanning electron microscope (SEM) Jeol JSM-5400. The samples were also incubated in distilled water in 37°C during the time of 6 weeks. After every week, pH and conductivity changes of a solution were also measured. After 2, 4 and 6 weeks strength of samples was additionally tested.

#### **Results and discussion**

DSC analysis indicates amorfic structure of polymer before processing. Glass transition temperature was determined as 56,1°C (FIG.1a). Thermal study of the polymers after forming process shows, that processing causes slight changes of their structure. These changes are connected with increse of PLDL crystallinity (FIG.1b,c), which is indicated by the presence of peak related to melting process of crystalline phase. However, contribution of cristalline regions is probably higher for samples processed by injection moulding, which is indicated by sharper peak for this material than for this one obtained by compression. Elevated temperature may cause reorganisation of polymer structure and creation of small crystalline regions. Higher temperature used during injection moulding process may also evoke partial degradation of polymer, which is usualy connected with increase of crystallinity degree [4]. Process of PLDL forming affects the Tg changes of samples. This temperature is higher for polymer processed by compression (58,6°C) than for that one obtained by injection moulding (55,6°C).



RYS. 1. Krzywa DSC dla próbki PLDL: a) nieprzetworzonego, b) przetworzonego metodą prasowania błonek, c) przetworzonego metodą wtrysku.

FIG.1. DSC curves of PLDL: a) unprocessed, b) processed by prepregs compression, c) processed by injection moulding.

	σ[MPa]	ε <sub>Fmax</sub> [%]	E [GPa]
(PLDL) <sub>p</sub>	33,24±0,87	7,43±0,90	1,42±0,06
(PLDL) <sub>w</sub>	22,23±2,23	2,11±0,47	1,45±0,08

TABELA 1. Właściwości mechaniczne polimeru PLDL w zależności od metody jego przetwarzania. TABLE 1. Mechanical properties of PLDL depending on processing method.

struktury i powstanie niewielkich obszarów krystalicznych. Wyższa temperatura wtrysku może powodować częściowa degradację polimeru, czemu również towarzyszy wzrost stopnia krystaliczności [4].

Proces przetwórstwa PLDL wpłynął także na różnice w temperaturze Tg badanych polimerów. Temperatura ta jest wyższa dla próbki otrzymanej metodą prasowania błonek

350

300

50

0

0

wtrysku i prasowania.

10

pregs compression methods.

worthic

é Ľ 100

a)

i wynosi 58,6°C. Natomiast temperatura zeszklenia próbki otrzymanej metodą wtrysku wynosi 55,6°C.

Przeprowadzone badania wykazały, że polimer przetworzony metodą wtrysku charakteryzował się gorszymi właściwościami mechanicznymi w porównaniu do otrzymanego poprzez prasowanie prepregów (TAB.1). Jest to związane z degradacją polimeru już w czasie uplastyczniania polimeru w procesie wtrysku. Wskazuja na to spękania powierzchni tego materiału (RYS.2). Polimer otrzymany metodą prasowania prepregów posiadał natomiast większą odkształcalność.

Proces przetwórstwa wpływa również na różnice w zachowaniu się badanego po-

limeru w symulowanym środowisku biologicznym. Polimery przetworzone metodą prasowania prepregów charakteryzowały się szybszą degradacją, o czym świadczy szybsza zmiana pH i przewodnictwa płynu inkubacyjnego (Rys. 3,4). Może to być związane z łatwiejszą dyfuzją płynu po pozostałych granicach rozdziału między poszczególnymi prepregami.



RYS. 2. Obraz SEM powierzchni próbek PLDL otrzymanych metodą: a) prasowania błonek, b) wtrysku.

FIG. 2. SEM photography of PLDL samples obtaining by: a) prepregs compression, b) injection moulding method.



RYS.3. Zmiany pH wody desty- RYS.4. Zmiany przewodnictwa lowanej w funkcji czasu inkuba- wody destylowanej w funkcji cji PLDL otrzymanego metodą czasu inkubacji PLDL otrzymanego metodą wtrysku i FIG.3. pH changes of distilled prasowania.

water in a function of incuba- FIG.4. Conductivity changes tion time of PLDL obtained by of distilled water in a function injection moulding and pre- of incubation time of PLDL obtained by injection moulding and prepregs compression methods.

The performed study revealed worse mechanical properties of polymers processed by injection moulding in comparison with materials obtained by prepregs compression (TABLE 1). It is connected to polymer degradation during plasticizing process in injection moulding method. Polymer degradation is evidenced by the presence of cracks on its surface (FIG.2). Samples obtained by compression are characterized by greater elongation.

Polymers processing has an influence on their behaviour in simulated biological environment. Faster degradation is observed for samples processed by prepregs compression. It is indicated by earlier changes of pH and conductivity of distilled water (FIG.3,4). It may be connected with easier penetration of solution through the borders between particular prepregs.

ш 🗰

# Wnioski

Metoda przetwórstwa wyraźnie wpłynęła na właściwości badanego polimeru. Zmiany nastąpiły już w strukturze polimeru i były związane z niewielkim wzrostem krystaliczności, przy czy wzrost ten był bardziej zauważalny dla polimeru przetworzonego metodą wtrysku. Ponadto, metoda wtrysku spowodowała degradację polimeru już w czasie trwania procesu, co objawiło się obniżeniem wytrzymałości. Dopracowania wymaga ustalenie optymalnych parametrów wtrysku, tzn. temperatury i czasu uplastyczniania. Zbyt długi czas przebywania polimeru w strefie grzewczej może sprzyjać degradacji.

Polimery otrzymane metodą prasowania prepregów uległy znacznie szybszej degradacji w porównaniu do polimerów otrzymanych metodą wtrysku. Przyczyną tego mogła być łatwiejsza dyfuzja płynu po pozostałych granicach rozdziału między poszczególnymi prepregami.

#### Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Nr 0408/R/2/T02/06/01, ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

### Piśmiennictwo

 L.-T. Lima, R. Aurasb, M. Rubinob: Processing technologies for poly(lactic acid), Progress in Polymer Science, 33, 2008.
 B. Łączyński, Metody przetwórstwa tworzyw sztucznych, Wydawnictwa Naukowo Techniczne, Warszawa 1973.

#### Conclusion

The studies revealed that PLDL properties were influenced by processing methods. Polymer structure changes were evidenced by increase of crystallinity. However, these changes were more significant for samples processed by injection moulding. Moreover, injection moulding caused polymer degradation during processing and it was indicated by strength decrease. Too long time of polymer staying under the influence of high temperature in heating zone may cause degradation process. Therefore, optimization of moulding parameters (temperature, plasticizing time) is required. The degradation time in distilled water was significantly longer for samples, which were processed by prepregs compression. It was caused by the presence of borders between particular prepregs and easier penetration of solution into the material.

# Acknowledgement

This research was financially supported by Polish Ministry of Science and Higher Education, the project No 0408/R/2/T02/06/01.

#### References

[3] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H.: Synthesis of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with L-Lactide Initiated by Zr(Acac)4. Macromolecules 34, 2001, 5090-5099.
[4] Grizzi I., Garreau H., Li S., Vert M.: Hydrolytic degradation of

devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence, Biomaterials 16, 1995, 305-311.

•••••

# MIKRONARZĘDZIA OKULISTYCZNE -KOMPOZYTOWE RETRAKTORY TĘCZÓWKI

 $\begin{array}{l} \textbf{E.Stodolak}^1, \textbf{S.Błażewicz1}, \textbf{J.Kawala}^1, \textbf{W.Gregorczyk}^1, \\ \textbf{R.Leszczyński}^2 \end{array}$ 

<sup>1</sup>Akademia Grniczo-Hutnicza, Katedra Biomateriałow, Al.Mickiewicza 30, 30-059 Krakow, Polska <sup>2</sup>Slaski Uniwersytet Medyczny, Katedra Okulistyki ul.Ceglana 35, 40-952 Katowice, Polska

#### Streszczenie

Przedstawione w pracy wyniki badań dotyczą kompozytów polimerowo-włoknistych, które służyć maja jako mikronarzędzia okulistyczne – refraktory tęczówkowe. Otrzymano serię materiałów kompozytowych, w których fazą ciągłą stanowiły nanokompozytowe włókna: syntetyczne (PAN) lub naturalne (CA). W osnowę włókien na etapie wytwarzania wprowadzono Nanocząstki modyfikatora którym dla włókien PAN były nanorurki węglowe (CNT) a dla włókien biopolimerowych CA były nanocząsteczki krzemionki. Do wytwo-

# OPHTHALMOLOGIC MICRO-TOOLS – COMPOSITE IRIS RETRACTORS

<sup>1</sup>AGH – University of Science and Technology, , Department of Biomaterials, 30 Mickiewicz av.,30-059 Cracow, Poland <sup>2</sup> Medical University of Silesia, Department of Ophthalmology, 30 Ceglana str., 40-952 Katowice, Poland

#### Abstract

Results of investigations presented in the work concern polymer-fibrous composites which can be used as ophthalmologic micro-tools – iris retractors. A series of composite materials was produced in which a continuous phase consisted of synthetic (PAN) or natural (CA) nanocomposite fibres. The fibres matrix was modified with filler nanoparticles such as carbon nanotubes (CNT) for PAN and silica for biopolymer fibres CA respectively. The matrix of elastic micro-tools based on the nanocomposite fibres consisted of epoxy

rzenia elastycznych mikronarzędzi na bazie włókien nanokompozytowych zastosowano osnowę z żywicy epoksydowej (E 57). Sprawdzono ich właściwości fizykochemiczne, a także użytkowe w porównaniu z dostępnym produktem handlowym. Celem nadania kompozytom odpowiedniej gładkości i podwyższenia ich biozgodności narzędzia pokryto warstwą biozgodnego polimeru (PCL). Przeprowadzono ocenę mikroskopową powierzchni kompozytów (mikroskop stereoskopowy, mikroskop optyczny), zbadano ich parametry fizyczne (długość, średnica, kąt zakrzywienia) a także stabilność wytworzonych materiałów (1m-sc/370C/H2O). W końcowej części eksperymentu przeprowadzono badania poręczności retraktorów zakładając je na gałki oczne świni (badania in vitro).

Słowa kluczowe: kompozyty, narzędzia okulistyczne, refraktory tęczówki

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 221-226]

# Wprowadzenie

Mikronarzędzie okulistyczne do których należą refraktory tęczówek należą do grupy implantów czasowych, wprowadzanych do gałki ocznej w celu ułatwienia bądź umożliwienia zabiegu. Po wykonaniu operacji są usuwane z oka. Operacje wykonywane przez źrenicę (czasowego lub zupełnego usunięcie zaćmy i wprowadzenie implantu, metoda witrektomii) wymagają jej maksymalnego rozszerzenia podczas trwania zabiegu.

Optymalne rozszerzenie źrenicy osiągane może być na drodze farmakologicznej jest ono jednak nietrwałe a czasem niebezpieczne dla dalszej cześci zabiegu. Maksymalne rozszerzenie źrenic ma miejsce podczas początkowej fazy operacji, w późniejszej fazie zabiegu wskutek uwalniania prostaglandyn z tęczówki może dochodzić do zwężenia źrenicy [1]. W celu zapewnienia dobrych i stabilnych warunków prowadzenia operacji stosuje się retraktory tęczówkowe. Narzędzia te umożliwiają równomierne napięcie i rozciągniecie źrenicy przez cały czas zabiegu (rys 1b). Wprowadzenie refraktorów do chirurgii gałki ocznej pozwoliło na rezygnację z przecięcia tęczówki, nawet przy bardzo wąskiej i zarośniętej źrenicy, podczas zabiegów okulistycznych [2]. Typowy retraktor kształtem przypomina hak, na którego dłuższym ramieniu zamocowany jest ruchomy dysk. Zadaniem dysku jest zablokowanie retraktora przy maksymalnym naprężeniu źrenicy (RYS.1a).

Komercyjne refraktory tęczówki wykonane z tworzyw

sztucznych, głównie nylonu. Ich podstawową wadą jest duża sztywność główki, będąca przyczyna wielu powikłań pooperacyjnych takich jak uszkodzenie zwieracza tęczówki, czy powodująca dysfunkcję tęczówki tzw. anonię (brak reakcji tęczówki na zmianę natężenia światła). Drugą grupę materiałów, z których wytwarza się haki okulistyczne należą materiały metaliczne takie jak złoto czy tytan. Łatwiejsze w nadaniu odpowiedniego kształtu bywaja niebezpieczne ze względu na ostre zakończenia, które mogą stać się przyczyną przerwania tęczówki, przerwania torebki soczewki lub uszkodzenia śródbłonka rogówki [3-4]. W jednym jak i drugim przypadku stosowania materiałów polimerowych jak i metalicznych jako mikronarzędzi jest wysoka cena. Jednorazowo w trakcie zabiegu lekarz okulista posługuje minimum 4 retraktorami.

ruchomy stoper ramię prowadzące (rękojeść) rozciągnięta źrenica a b



resin (E 57). Their physicochemical properties and usability were compared with commercially available products. In order to provide proper smoothness of the composites surface and to increase their biocompatibility the micro-tools were covered with a layer of biocompatible polymer (PCL). Surface of the micro-tools was observed and evaluated using an optical microscope and a stereoscope. Their physical parameters such as length, diameter and inflection angle, and stability in in vitro conditions (1 mth/37oC/H2O) were determined. The last part of experiments consisted of studies of practical application of the micro-tools in rabbit's eye balls (in vitro studies).

*Key words:* composite, ophthalmologic tool, iris retractors,

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 221-226]

# Introduction

Ophthalmologic micro-tools, to which group belong iris retractors, are a part of a group of temporary implants which are introduced into an eye ball in order to enable, or facilitate an operation. They are removed from the eye after the operation. Operation performed through a pupil (temporal or permanent removal of cataract and introduction of an implant, vitrectomy) require its maximal widening during the treatment. The optimal widening of a pupil can by accomplished by pharmacology means, but it is non stable and sometimes even dangerous for the further course of the operation. The maximal pupil widening take place during an initial phase of the operation, and in subsequent phases due to secretion of prostaglandines form an iris the pupil may shrink [1]. In order to ensure proper, and stable conditions of the operation iris retractors are applied. These tools make possible even tension and stretching of the pupil during the whole time of the treatment (Fig 1b). Introduction of the retractors to the eye ball surgery enabled to resign from iris cutting during ophthalmologic treatments even in a case of very narrow and atretic pupil [2]. A typical retractor resembles a hook on which long arm a moving disc is attached. The aim of the disc is to fix the retractor at the maximal tension of an iris (FIG.1a).

Commercially available iris retractors are made of plastics, mainly nylon. Their main drawback is high stiffness of a head, which is a cause of many after-surgery complications such as damage of an iris constrictor or an iris dysfunction (lack of reaction of an iris on light intensity changes). A

> second group of materials from which the retractors are made are metals such as gold or titanium. They are more easily shaped, but may by dangerous because of sharp tips, which can by a cause of an iris rupture, lens capsule rupture or damage of cornea endhotelium [3-4]. Other drawback of both kinds of the commercial retractors is their high cost. During the operation a surgeon uses at least four retractors.

Due to the popularity of affections in which treatments requiring



Ze względu na popularność schorzeń, przy których stosuje się techniki z wykorzystaniem retraktorów tęczówki prowadzone są badania nad nowymi biozgodnymi materiałami, które z jednej strony zapewniłby komfort pracy lekarzy operujących, a z drugiej minimalizowały ryzyko powikłań pooperacyjnych. W pracy zaproponowano, wykonano i wstępnie oceniono układy kompozytowe złożone z fazy włóknistej zestalonej żywicą epoksydową. Schemat refraktora wraz z wizualizacją jego zastosowania przedstawia RYS.1.

### Materiały i metody

Włókniste tworzywa kompozytowe wytworzono z nanokompozytowych włókien na bazie polimeru syntetycznego jakim był poliakrylonitryl (PAN, Zoltec, Węgry) modyfikowany 3% i 5% udziałem wag nanorurek węglowych (CNT, NanoCraft Inc. USA). Druga grupę materiałów kompozytowych stanowiły mikronarzędzia wytworzone z naturalnego biopolimeru – alginianu wapnia (CA, Protanal 60/40, Norwegia) modyfikowanego nanometryczna krzemionką (S, Sigma Aldrich). Materiały włókniste wykorzystane w pracy zastały wykonane w Katedrze Włókien Sztucznych, Wydziału Inżynierii i Marketingu Tekstyliów na Politechnice Łódzkiej. Jako środka usztywniającego (matryca kompozytu) zastosowano żywice epoksydowe: Epidian® 57 produkcji Zakładów Chemicznych "Organika-Sarzyna" S.A. w Nowej Sarzynie. Do pokrycia przygotowanych narzędzi zastosowano biozgodny poliester alifatyczny - polikaprolakton o masie cząsteczkowej 60 kDa, (Aldrich Chemical Co).

Materiały przygotowano w analogiczny sposób: włókna długie naprężono, a następnie nasączano żywicą epoksydową. Po 15 minutach włókna nawijano na płytki metalowe o grubości: 1.5 mm pozostawiono do całkowitego usieciowana żywicy na 48h. Następnie odcinano haczyki i pokrywano je polimerem bioresorobowalnym (PCL) pozostawiając dodatkowo na 24 h celem odparowanie rozpuszczalnika (aceton, POCh Gliwice). Dyski (tzw. stoper) do retraktorów wytworzono z uniwersalnej pasty silikonowej SILPASTA® (Zakład Chemiczny "Silikony Polskie" Sp. z o.o.). Przed nałożeniem dysków na rękojeści refraktorów szlifowano zakończenia główki mikronarzędzia. W przedstawiony powyżej sposób otrzymano serię polimerowo włóknistych nanokompozytów różniących się charakterem i właściwościami fazy włóknistej:

- włókno z alginianu wapnia CA z 3% wag SiO<sub>2</sub> w osnowie żywicy E57 + PCL (CAS3);

- włókno z alginianu wapnia CA z 5% wag SiO<sub>2</sub> w osnowie żywicy E57 + PCL (CAS5);

- włókno z poliakrylonitrylu PAN z 3% wag CNT w osnowie żywicy E57 + PCL (PC3);

 włókno z poliakrylonitrylu PAN z 5% wag CNT w osnowie żywicy E57 + PCL (PC5);

Jako materiał porównawczy zastosowano komercyjne retraktory nylonowe firmy Rayner Iris Retractor® UK. Wytworzone materiały poddano obserwacjom mikroskopowym. Mikroskop optyczny zaopatrzony został w oprogramowanie pozwalające na pomiar średnicy elementów składowych mikrourządzenia (rekojeść, prowadnica, zakrzywienie główki), kata zakrzywienia. W trakcie obserwacji mikroskopowych oceniano mikrostrukturę powierzchni mikronarzedzi i porównywano ją z powierzchnia oryginalnego refraktora nylonowego. Nowy materiał kompozytowych uformowany w postaci haków poddano ocenie stabilności. Czas trwania testu trwałości materiału został maksymalnie wydłużony aby uzyskać pełniejsze informacje na temat jonów mogących przejść do medium immersyjnego. Narzędzia inkubowano w wodzie destylowanej, w temperaturze 37oC/1 m-sc, monitorując zmiany przewodnictwa wody (test trwałości in viro).

use of the iris retractors are applied investigations on novel, biocompatible materials are carried out. Such materials should facilitate the operation for surgeons and minimise the risk of post-treatment complications.

In the present work composite systems consisting of a fibrous phase bonded with epoxy resin were proposed, produced and preliminary evaluated. FIG.1 presents a drawing of the retractor together with a scheme of its application.

#### Materials and methods

Fibrous composite micro-tools were produced using nanocomposite fibres based on synthetic polymer – polyacrylonitrile (PAN, Zoltec, Hungary) modified with 3 and 5wt.% of carbon nanotubes (CNT, NanoCraft Inc., USA). A second group of the micro-tools was made of natural polymer – calcium alginate (CA, Protanal 60/40, Norway) modified with nanometric silica (S, Sigma Aldrich). The fibrous materials used in the work were fabricated in the Department of Man-Made Fibres of the Faculty of Material Technologies and Textile Design of Technical University of Lodz. The composites matrix was made of epoxy resin: Epidian® 57 (Z.Ch. "Organika-Sarzyna" S.A., Poland). The micro-tools were covered with biocompatible aliphatic polyester – polycaprolactane with molecular weight 60 kDa (Aldrich Chemical Co.).

The micro-tools were prepared in the following way: long fibres of chosen type were stretched, and then soaked with the epoxy resin. After 15 min they were wound on metal plates of 1.5mm thickness, and left for 48h for complete setting of the resin. Then the hooks were cut off and covered with bioresorbable polymer (PCL) and left for 24h in order to evaporate a solvent (acetone, POCh Gliwice, Poland). Discs (so called stoppers) for the retractors were made of universal silicone paste SILPASTA® (Z.Ch. "Silikony Polskie" sp. z o.o., Poland). Tips of the micro-tools were ground before mounting the disk on the tools grips. The above presented method was used to produce a series of micro-tools containing various types of the nanocomposite fibrous phase with different properties:

- calcium alginate fibre CA with 3wt.% SiO<sub>2</sub> in E57 resin matrix + PCL (CAS3);

- calcium alginate fibre CA with 5wt.% SiO<sub>2</sub> in E57 resin matrix + PCL (CAS5);

 polyacrylonitril fire PAN with 3wt.% CNT in E57 resin matrix + PCL (PC3);

- polyacrylonitril fire PAN with 5wt.% CNT in E57 resin matrix + PCL (PC5);

As the reference material a commercially available nylon retractors (Rayner Iris Retractor®, UK) were used. The fabricated micro-tools were observed using optical microscope equipped with programme enabling geometrical measurements i.e. diameter, inflection angle of the microtools components such as grip, guide, and head. During the microscopic observations the surface microstructure of the micro-tools was evaluated and compared with the surface of the reference commercial nylon retractor. Stability of the produced retractors was evaluated by their incubation for one month in distilled water at 37oC and monitoring of its conductivity changes (in vitro stability test). The test duration was maximally elongated in order to obtain more complete information about ions which may migrate to the immersing medium.

Usability of the micro-tools was investigated using a test which consisted in pricking of eye membranes and stretching of an iris. The tests were performed on an eye of New Zealand rabbit.

# 224 Dyskusja wyników

Otrzymane retraktory posiadają postać elastycznych haczyków o grubości ok. 0.35-0.4mm, część zakrzywiona (główka) jest elementem o mniejszej średnicy wynoszącej odpowiednio 0.25-0.3 mm. Zakrzywienie główki ma postać lekko spłaszczoną o wymiarach 0.2 x 0.3mm. Cała długość retraktora wynosi ok. 15 mm i jest dłuższa od narzędzia komercyjnego (Rayaner) o ok. 5mm. Celem wydłużenia rękojeści refraktora było zwiększenie jego poręczności podczas zabiegu napinania tęczówki. Zestawione wyniki pomiarów średnic otrzymanych materiałów kompozytowych wskazują, że włókna syntetyczne PAN modyfikowane 3 i 5% udziałem nanorurek węglowych są narzędziami o mniejszych średnicach w porównaniu do mikronarzędzi wytworzonych na bazie CA. Materiał włóknisty nasączany żywicą epoksydową (PC+ER, CAS+ER) a nastepnie pokrywany warstwą biozgodnego polimeru (PCL) powoduje wzrost średnicy narzędzia o ok. 20 (dla włókien CAS+ER) i ok. 70% (dla włókien PC+ER) (RYS.2). Grubość warstwy można regulować poprzez zmiane steżenia polimeru resorbowalnego. Zastosowane stężenie PCL zostało zoptymalizowane tak by naniesiona warstwa mogła wygładzić i ujednorodnić powierzchnię mikronarzędzia. Częścią narażona na częste deformacje mikronarzędzia jest element ruchomy refraktora tzw. przegięcie (RYS.1). Wady elementu spowodowane są najczęściej niedokładną penetracja żywicy usztywniajacej włókna kompozytowe mikronarzędzie. Odpowiednia technologia nanoszenia żywicie oraz częściowe jej usieciowanie przed uformowaniem kształtu powoduje ze testy poręczności (polegające na odginaniu główki refraktora) nie prowadziły do zniszczenia mikronarzędzia. Dodatkowym elementem zabezpieczającym przed złamaniem była warstwa elastycznego polimeru resorbowalnego, PCL.

Wcześniejsze nasze badania nad wytworzeniem poręcznych elastycznych haków okulistycznych dowiodły, że

#### Results and discussion

The fabricated refractors had a form of elastic hooks with diameter of 0.35 to 0.40mm, which curved part (a head) had smaller diameter of about 0.25-0.30mm. The head inflection place was slightly flat with dimensions of 0.20 x 0.30 mm. The retractor length was c.a. 15 mm, which was about 5 mm longer than in a case of the commercial micro-tool (Rayaner). The aim of elongation of the retractor's grip was to facilitate stretching of an iris during the operation. The micro-tools based on PAN fibres had smaller diameters that the ones fabricated form calcium alginate fibres CA. The biopolymer (PCL) cover layer increased the mean diameter of the micro-tools of about 20% and 70% for CAS and PC materials, respectively (FIG.2). Thickness of the layer may be controlled by concentration of the bioresorbable polymer. PCL concentration was optimised in order to cover the micro-tool in a way leading to an even and homogeneous surface. A part of the retractor which is subjected to frequent deformations is its mobile part so called bent (FIG.1). Defects of this part are mainly caused by inaccurate penetration of the resin which stiffens the fibres. The proper method of the resin spread and its partial setting before final shaping of the retractor resulted in higher strength of the retractor bend. Test consisted in bending out of the retractor's head did not lead to its damage. Additional protection of the microtool against breaking was the layer of elastic bioresorbable polymer PCL.

Our previous investigations concerning fabrication of more usable iris retractors indicated, that the very important parameters of the micro-tool are its surface (the smoother it is, the less irritations is present within the pricked area of the eye membranes) and mobility of the stopper inserted on the grip (FIG.1) [5]. Observations of the surface of fibrous composites before their covering with PCL layer indicated increased surface roughness with visible single fibres



RYS.2. Wymiary elementów retraktora okulistycznego na różnych etapach jego otrzymywania (włókna nasączane żywicą-ER, włókna nasączane żywica ER i pokrywane PCL).

FIG.2. Size of retractor elements during different stages of fabrication process (ER- fiber with epoxy resin, ER+PCL fibers with epoxy resin covered with PCL).

bardzo ważnym elementem mikronarzędzia jest powierzchnia retraktora (im bardziej gładka tym mniej podrażnień można spodziewać się w obrębie nakłucia błon oka) oraz mobilność stopera nakładanego na rękojeść (służącego jako blokada, RYS.1) [5]. Obserwacje powierzchni kompozytów włóknistych przed pokryciem ich warstwa polimery PCL wykazuja zwiększoną chropowatość powierzchni, z widocznymi często pojedynczymi włóknami odstającymi od powierzchni. Obróbka mechaniczna mikronarzędzia a także warstwa resorbowalnego PCL prowadza do wygładzenia powierzchni mikronarzędzi (RYS.3a, c, d). Efekt ten jest najsłabszy w momencie gdy włóknem bazowym był nanokompozytowe włókno z 5% wag udziałem CNT. Chropowatość powierzchni, liczne pory powierzchniowe i defekty widoczne były nawet po kilkakrotnym pokrywaniu narzędzia warstwa polimeru (RYS.3b). Stwierdzono, że materiały kompozytowe oznaczone jako PC3, CAS3, CAS5 wykazują powierzchnię gładką podobna do materialu odniesienia.



RYS.3. Morfologia otrzymanych refraktorów okulistycznych. FIG.3. Morphology of the manufactured iris retractors.

Zastosowany test trwałości prowadzony w warunkach symulujących żywy organizm (in vitro) wykazał, że żaden z otrzymanych materiałów kompozytowych nie zmienia jonowego przewodnictwa wody destylowanej (RYS.2). Dodatkowo nie stwierdzono żadnych zmian powierzchniowych (np. wzrostu chropowatości, rozwarstwiania się) na inkubowanych refraktorach. Materiały można uznać za kompozyty stabilne chemicznie. Pozwala to przypuszczać, że materiały te, ze względu na swój czasowy kontakt z tkanką ludzką nie będą prowadziły do stanów zapalnych.

Do oceny poręczności in vitro wybrano materiały kompozytowe: CAS3, CAS5, PC3 oraz komercyjny refraktor, który stanowił próbkę odniesienia (Rayaner). Założenie refraktora na model badawczy (gałkę oczną królika) wykazało, że zwiększenie długości refraktora ułatwia pracę chirurga prowadzącego zabieg. Elastyczne przegięcie główki (możliwość regulacji kąt rozwarcia) ułatwia wprowadzenie retraktora do przestrzeni gałki ocznej. Mała średnica włókna (kompozyt PC3) poprawia wprowadzenie mikronarzędzia protruding of the surface. Machining of the micro-tool and PCL layer led to smoothing of the retractor surface (FIG.3 a, c, d). This effect was weakest in the case of the retractor based on PAN fibres containing 5 wt.% of CNT. High surface roughness, numerous surface pores and other defects were visible even after repeated covering with PCL layer (FIG.3b). Composite materials PC3, CAS3 and CAS5 were characterised by smooth surface similar to the one of the reference material.

The stability test carried out in conditions similar to the natural organism (in vitro) showed that neither of the fabricated composite materials altered ionic conductivity of distilled water (FIG.2). Additionally, no changes such as increase of roughness or delamination of the incubated retractors surfaces were observed. The materials can be regarded as chemically stable, which enables to assume, that because of their only temporary contact with the human tissue, they would not lead to inflammations.

In vitro usability of the retractors was tested on PC3, CAS3, CAS5 micro-tools and on the commercial reference

retractor. Installation of the retractors in the eye model (an eve ball of a rabbit) showed, that elongation of the retractor's length facilitates the operation. Elastic bend of the head (ability to control the opening angle) made easier introduction of the retractor into the eye ball space. The smallest diameter of the retractor based on PC3 fibres facilitated introduction of the micro-tool into an iris, which made this material the most suitable for further studies. In order to produce retractors with repeatable characteristics it is necessary to optimise the method of shaping of fibres soaked with resin.

do źrenicy (przebicie błon oka), materiał ten wydaje sie być na obecnym poziomie pracy najodpowiedniejszym bazowym materiałem do otrzymywania refraktorów tęczówki. Optymalizacji wymaga proces formowania włókna nasączonego żywicą tak by można było uzyskiwać tą drogą powtarzalne materiały o niskim rozrzucie statystycznym..





FIG.4. Stability of the micro-tools in in vitro conditions. Changes of ion conductivity of distilled water with time.

# Podsumowanie

Przeprowadzona analiza porównawcza materiałów kompozytowych polimerowo-włoknistych przeznaczonych na narzędzia okulistyczne: retraktory tęczówki wykazała, że wytworzone materiały charakteryzują się elastycznością, parametrami geometrycznymi i powierzchnią pozwalające na wykorzystanie ich jako mikronarzędzi chirurgicznych. Stabilność materiałów (miesięczny czas inkubacji) wskazuje, że otrzymane refraktory mogą być wykorzystane jako mikronarzędzia przeznaczone do krótkoterminowego kontaktu z tkankami organizmu żywego. Badania poręczności prowadzone w warunkach in vitro, na gałkach zwierzęcych, pozwoliły na wstępną ocenę poprawności doboru składników kompozytu (rodzaj fazy włóknistej i osnowy: żywica epoksydowa, polimer resorobowalny). Uzyskane retraktory kompozytowe charakteryzują się podobną gładkością i sprężystością, co komercyjne refraktory nylonowe, nadal dalszych badań wymaga kształt główki i poprawa jej właściwości wytrzymałościowych.

### Podziękowania

Praca wykonana w ramach grantu Ministerstw Szkolnictwa Wyższego nr N518 028 32/1769.

Ewa Stodolak jest stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach prgramu START w 2009 roku.

# Piśmiennictwo

[1] LD. Nichamin, Enlarging the pupil for cataract extraction using flexible nylon iris retractors, J Cataract Refract Surg. 1993, 19 (6) 793-796

[2] TA Oetting, MD Luis, C Omphroy; Modified technique using flexible iris retractors in clear corneal cataract surgery; J Cataract Refract Surgery 2002, 28 (12) 596-598

[3] T Yugutchi, T. Osika, S. Sawagucgi; Pupillary functions after cataract surgery using flexible iris retractor in patients with small pupil, Jnp. J Ophthalmol 1999 43 (10) 20-23

### Summary

The comparative analysis of polymer-fibrous composite materials destined for ophthalmologic tools i.e. iris retractors indicated, that the fabricated materials were characterised by elasticity, and geometrical and surface parameters which enabled them to be applied for the micro-tools. Stability of the materials (one month of incubation) indicated, that the produced retractors can be used as tools for short-termed contact with living tissues. Test of usability carried out in in vitro conditions, on rabbit's eye balls, enabled preliminary evaluation of selection of components of the materials i.e. type of fibres and matrix: epoxy resin, resorbable polymer. The fabricated composite retractors were characterised by similar smoothness and elasticity as the commercial nylon retractors. Further studies concerning a shape of the head and improvement of its strength are necessary.

### Acknowledgements

This work was supported by The Ministry of Science and Higher Education, grant No. N518 028 32/1769. Ewa Stodolak is a beneficent of program START of the Foundation for Polish Science in 2009.

### References

[4] D Tognetto, G. Agolini, G. Grandi, G. Ravalico; Iris alteration using mechanical iris retractors; J Cataract Refract Surgery; 2001 27 (11) 1703-1705

[5] E. Stodolak, S. Błażewicz, R. Leszczyński, T. Gumuła, Preliminary study on composite iris retractors, Composites, 2 2008 (8:2) 164-168

• • • • • • • • • • • • • • • • •

# NANOKOMPOZYTY PVA/(HAp OR SiO<sub>2</sub>)/PCL JAKO MEMBRANY DO STEROWANEJ REGENERACJI KOŚCI (GBR)

 $\label{eq:bound} \begin{array}{l} \textbf{E}. \textbf{S} \textbf{todolak}^1, \textbf{M}. \textbf{B} \textbf{ogun}^2, \textbf{A}. \textbf{K} \textbf{olawa-Koziol}^1, \textbf{M}. \textbf{B} \textbf{lazewicz}^1, \\ \textbf{T}. \textbf{M} \textbf{ikolajczyk}^2 \end{array}$ 

<sup>1</sup>Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, al. Mickiewicza 30, 30-059 Krakow, Polska <sup>2</sup>Politechnika Łódzka, Wydział Technologii Materiałowych i Wzornictwa Tekstyliów, ul. Zeromskiego 116, 50-952 Lodz,Polska

### Streszczenie

Przedmiotem pracy są nanokompozytowe materiały membranowe wytworzone na bazie resorobalnych włókien z polialkoholu winylowego modyfikowanego nanocząstkami ceramicznymi HAp lub SiO2. Materiały scharakteryzowano pod względem fizykochemicznym (chropowatość, zwilżalność), mikrostrukturalnym (wielkość porów, porowatość), strukturalnym (DSC). Uwzględniając aplikacje materiału zbadano również kinetykę uwalniania bioaktywnych nanocząstek które stymulować mogą nukleację apatytu na powierzchni membrany. Wykazano ze dodatek nanokompozytowych włókien wpływa na obniżenie hydrofobowości powierzchni i wzrost jej chropowatości. Zmiany ilościowe tych parametrów powierzchni zależą od rodzaju wprowadzonej fazy nanokompozytowej. Obecność włókien PVA/SiO2 i PVA/HAp zmienia mikrostrukturę a także strukturę matrycy polimeru.

Słowa kluczowe: nanokompozyty, bioaktywność, techniki GTR/GBR

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 227-231]

# Wprowadzenie

Sterowana regeneracja tkanki kostnej (GBR) jest skuteczną techniką leczenia ubytków kości. Zasada metody polega na stworzeniu optymalnych warunków regeneracji tkanki kostnej poprzez wprowadzenie materiału który pełnił będzie role separującej bariery. Główną ideą sterowanej regeneracji kości jest wykorzystanie membrany rozdzielającej dwie tkanki: zdefektowaną tkankę kostną od otaczającej tkanki łącznej. Membrana GBR ma za zadanie z jednej strony: ochronę ubytku kostnego i indukcję w jego wnętrzu procesów adhezji, proliferacji i różnicowania się komórek tkanki kostnej. Z drugiej strony powinna stanowić barierę dla napływających komórek fibroblastycznych do miejsca defektu. Efektem obecności fibroblastów w miejscu uszkodzenia jest pojawienie się otoczki łącznotkankowej, co spowalnia procesy osteoindukcji i osteointegracji [1]. Membrany GBR muszą charakteryzować otwartą porowatościa, pozwalającą na migracje składników niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek oraz obecnością w warstwach powierzchniowych fazy, która wspomagać będzie odbudowę tkanki kostnej [2]. Biomateriał powinien zatem charakteryzować się kontrolowaną porowatością, odpowiednio przygotowana powierzchnia, biofunkcyjność membrany a więc odpowiednią wytrzymałością i elastycznością materiału a także poręczność medyczna (prosta sterylizacja, możliwość formowania dowolnych kształtów)

# NANOCOMPOSITES PVA/(HAp OR SiO<sub>2</sub>)/PCL AS MEMBRANES FOR THE GUIDED BONE REGENERATION (GBR)

E.Stodolak<sup>1</sup>, M.Bogun<sup>2</sup>, A.Kolawa-Koziol<sup>1</sup>, M.Blazewicz<sup>1</sup>, T.Mikolajczyk<sup>2</sup>

 <sup>1</sup>AGH–University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials,
 30 Mickiewicz av., 30-059 Cracow, Poland
 <sup>2</sup>Technical University of Lodz, Faculty of Material Technologies and Textile Design, Department of Man-Made Fibres,
 116 Zeromski, 50-952 Lodz, Poland

# Abstract

Aim of the work is investigations on nanocomposite membrane materials based on resorbable fibres of polyvinyl alcohol modified with ceramic nanoparticles of HAp or SiO<sub>2</sub>. The materials were characterised in terms of their physicochemical properties (roughness, wettability), microstructure (porosity, pore size) and structure (DSC). Taking into consideration a possible application of the materials the kinetics of release of bioactive particles which may stimulate nucleation of apatite on a membrane surface was investigated. It was shown, that addition of the nanocomposite fibres lead to decrease of hydrophobicity of the surface and increase of its roughness. Quantitative changes of these parameters depend on the type of the introduced nanocomposite phase. The presence of PVA/SiO<sub>2</sub> and PVA/HAp fibres changes microstructure of the composite and structure of the polymer matrix PCL.

Key words: nanocomposite, bioactivity, GTR/GBR technique

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 227-231]

#### Introduction

Guided bone tissue regeneration (GBR) is an effective method of treatment of bone tissue losses. A principle of the method consists in creation of optimal conditions of bone tissue regeneration by an introduction of a material which will play a role of a separating membrane. The main idea of the guided bone regeneration is utilisation of a membrane separating two tissues i.e. defected bone tissue and connective tissue. On one hand, the purpose of the GBR membrane is to protect the bone loss and to induce inside it adhesion. proliferation and differentiation of bone tissue cells. On the other hand, the membrane should act as a barrier for fibroblast cells inflowing into the defect area. The presence of fibroblasts in the defect area leads to the appearance of cartilage areola which slows down osteoinduction and osteointegration processes [1]. The GBR membranes should by characterised by open porosity, which enables migration of components necessary for proper activity of cells, and by the presence in their superficial layers of a phase which would assist reconstruction of bone tissue [2]. Thus, the biomaterial should have controlled porosity, properly prepared surface, and biofunctionality of the membrane which means proper strength and elasticity of the material and also medical usability (simple sterilisation, ability to form any shapes) [3]. The main problem concerning fabrication of membrane materials is not only a control of the separation process (sub[3]. Podstawowym problemem, dotyczącym wytwarzania materiałów membranowych jest nie tylko kontrola procesu rozdziału (substancji, komórek), ale przede wszystkim ich trwałość i bioaktywność w środowisku in vivo [4]. Materiały stosowane na membrany należeć mogą do grupy stabilnych polimerów (PTFE, e-PTFE,) lub polimerów biodegradowalnych (PGLA, PLLA, PCL). Z ta ostatnia grupą materiałów wiąże się wiele nadzieji spowodowanych możliwością licznych modyfikacji a także czasem ich degradacji i brakiem konieczności ponownej interwencji chirurgicznej. Wprowadzenie do osnowy resorbowalnego PLA nanohyroskyapatytu wpływa na osteokonduktywność kompozytu ale obniża jego wytrzymałość [5].

Nowym rozwiązaniem w dziedzinie sterowanej regeneracji kości było zastosowanie materiałów membranowych przygotowywanych tuz przed implantacja tzw. membran in situ. Powierzchnię kompozytów PLA/n-HAP lub PLA/β-TCP pokrywano tuż przed implantacją czynnikami wzrostu kości (BGF) lub nanoszono na nią płytki krwi połączone z czynnikiem BGF (ang. bone growth factor) [6, 7]. Niska powtarzalność metod nanoszenia bioaktywnych cząstek na powierzchnie powoduje ze nadal szuka się skuteczniej metody modyfikacji membran GBR. W tym zakresie korzystne wydaja się złożone kompozyty oparte o matryce bioresorbowalnych polimerów, w których jako fazy modyfikującej zastosować można resorbowalne włókna krótkie, które na etapie wytwarzania zostały wzbogacone w bioaktywne nanocząstki. Przykładem takich materiałów sa kompozyty otrzymane w ramach ninieiszei pracy: gdzie w osnową bioresorbowalnego polimeru, wprowadzano fazę modyfikującą w formie nanokompozytowych włókien krótkich modyfikowanych bioaktywnymi nanocząstkami ceramicznymi SiO<sub>2</sub> i HAp.

# Materiały i metody

Jako polimer który poddano modyfikacji włóknami nanokompozytowymi wybrano polikaprolakton (Sigma Aldrich) o masie cząsteczkowej 60 000Da. Włókna nanokompozytowe otrzymane w Katedrze Włókien Sztucznych na Wydziale Technologii Materiałowej i Wzornictwa Tekstyliów Politechniki Łódzkiej. Nanokompozyty włókniste otrzymano metodą na mokro stosując 3% wagowych nanododatku. Zastosowano dwa rodzaje nanonapełanicza: naturalny HAp o rozmiarze cząstek (d<sub>m</sub>)~40nm, oraz nanocząstki krzemionki SiO<sub>2</sub> (d<sub>m</sub>~5-10nm) (wielkości cząstek oznaczono metodą DLS). Kompozyty polimerowo włókniste otrzymano metoda odlewania, mieszając wcześniej rozdrobnione włókna PVA/HAp i PVA/SiO2. Wielkość krótkich włókien nanokompozytowych wynosiła odpowiednio: HAp ok. 200-400 nm, SiO<sub>2</sub> ok. 350-400nm (oznaczone na podstawie obserwacji mikroskopowych). Zastosowano stały udzial włókien nanokompozytowych w osnowie PCL, który wynosił 5%wag. Skutecznośc membrany sprawdzono w teście przepuszczalności - mierząc zmiany przewodnictwa jonowego cieczy przechodzącej przez membranę kompozytową. Zmiany strukturalne po wprowadzeniu fazy włóknistej badano stosując metody termicznej kolorymetrij różnicowej (DSC). Zmiany fizykochemiczne powierzchni kompozytów określano na podstawie badań zwilżalności powierzchni (DSA 10 KRUSS) i zmian chropowatości powierzchni (Hommel Tester T1500). Porowatość materiału otrzymywano poprzez wypłukiwanie rozpuszczalnej w wodzie fazy włóknistej: PVA/HAp, PVA/SiO2.Kinetykę uwalniania nanocząstek bioaktywnych zbadano po inkubacji przez 7dni w SBF wykonując oznaczenia jonów wapnia fosforu lub krzemionki metodą ASA-ICP (ICP HP 4500). Mikrostrukturę powierzchni wielkość porów jak i porowatość powierzchni materiału określono na stances, cells), but above all their durability and bioactivity in in vivo conditions [4]. Materials used for membranes may belong to a group of stable polymers (PTFE, e-PTFE) or biodegradable polymers (PGLA, PLLA, PCL). The latter group is particularly promising because of its capability of various modifications, their degradation time and lack of necessity of a repeated surgery. Introduction of nano-hydroxyapatite into resorbable matrix of PLA influences osteoconductivity of the composite, but decreases its strength [5]. The novel solution in the field of guided bone regeneration was application of membrane materials prepared just before their implantation so called membranes in situ. Surface of PLA/n-HAp or PLA/β-TCP composites was covered just before the implantation with bone growth factors (BGF) or it was covered with blood platelet linked with BGF [6,7]. Low repeatability of the method of spreading of bioactive molecules on the surface is a reason of a continuous search for an effective method of GBR membranes modification. In this respect, complex composites based on bioresorbable polymer matrix, filled with short resorbable fibres containing bioactive nanoparticles seem to be beneficial. An example of such materials is composites fabricated in this studies which consisted of a bioresorbable polymer matrix filled with short nanocomposite fibres modified with bioactive ceramic nanoparticles such as SiO<sub>2</sub> and HAp.

# Materials and methods

Polycaprolactone (PCL, Sigma-Aldrich) with molecular weight 60 000 Da was chosen as a composite matrix. The polymer matrix was modified with nanocomposite fibres made of polyvinyl alcohol containing 3 t.% of a nano-additive. The fibres were prepared using a wet method. Two types of nano-additives were used; HAp with a mean particle size (dm) ~ 40nm, and SiO<sub>2</sub>, dm ~ 5-10nm) (DLS method). Before introduction into the matrix the nanocomposite PVA fibres were mechanically ground in a vibration ball mill. The final form of the modifier was a mixture of two fractions; short fibres, particles of the fibres and the nano-additive, which were products of the nanocomposite fibres fragmentation. The mean size of the fibres fragmentation products (biopolymer particles, nano-additives) was between 220 and 300 nm (DLS method, optical microscope). The polymer - fibres nanocomposites (5wt.% of nanocomposite fibres) were prepared using a casting method. The open porosity was obtained by washing out the PVA fibres in water. Permeability of the membranes was characterised by changes of ionic conductivity of salt solution passing through the membranes. The produced materials were subjected to thermal (DSC) and physicochemical investigations. Wettability of surface of the nanocomposite materials was determined by direct measurements (DSA 10 KRUSS). Roughness of the composite surface was determined by the surface profilometry technique (Hommel Tester T1500). The kinetics of release of bioactive nanoparticles was determined by incubation of the membranes for 7 days in SBF and measuring concentration of calcium and phosphate ions and silica with the ASA-ICP method (ICP HP 4500). Microstructure of the membranes surface, their porosity and pore size was determined on the basis of SEM observations (Joel 5400). A pure PCL foil was used as a reference material.

# **Results and discussion**

Introduction of the short nanocomposite fibres and products of their fragmentation increased roughness of the materials surface. The mean roughness profile was higher on the side of exposed fibres, than on the bottom side (FIG.1).



RYS.1. Chropowatość powierzchni membran kompozytowych: 5%wag. PVA/SiO<sub>2</sub> w matrycy PCL i 5%wag. PVA/Hap w matrycy PCL.

FIG.1. Roughness of the surface of composite membranes: 5 wt.% PVA/SiO<sub>2</sub> in PCL matrix and 5 wt.% PVA/Hap in PCL matrix.

podstawie obserwacji mikroskopowych SEM (Joel 5400). Materiałem referencyjnym wykorzystanym do badań była folia PCL.

## Dyskusja wyników

Wprowadzenie nanokompozytowych włókien krótkich oraz produktów ich defragmentacji prowadzi do wzrostu chropowatości powierzchni tworzyw. Średni profil chropowatości wyższy jest od strony wyeksponowanych włókien (góra próbki) niż od strony spodniej materiału (FIG.1). Polimer pozbawiony fazy włóknistej charakteryzuje się powierzchnia gładką R<sub>a</sub>~1,1µm. Dodatek włókien do syntetycznej osnowy powoduje obniżenie kata zwilżenia w porównaniu z czystym polimerem (O~75,5°). Wynosi on odpowiednio dla kompozytu PVA z 5% wag. SiO<sub>2</sub> w PCL ok. 700 a dla kompozytu PVA z 5% wag HAp w PCL ok. 720. Wzrost hydrofiowości powierzchni wiąże się z charakterem chemicznym fazy włóknistej; również silnie hydrofilowej (Θ~15°), która w dłuższym kontakcie z wodą ulega szybkiej resorpcji. Efektem biodegradacji włókien i cząstek zdefragmentownych włókien jest porowata powierzchnia kompozytu. W warunkach in vitro z litego dotąd tworzywa powstaje materiał porowaty którego średni rozmiar porów jest w zakresie ok. 10-40µm (FIG.2). Ze względu na funkcje jaka ma pełnić otrzymany materiał (membrana separująca i selektywnie przepuszczająca substancje) przeprowadzono również testy przepuszczalności tworzywa w układzie woda/membrana/sól. W trakcie pracy membrany stwierdzono ze wyższą przepuszczalnością charakteryzuje się membrana PVA z 5% wag HAp w PCL, która stabilność pracy osiąga już po 5s (FIG.3). Inkubując badane materiały w warunkach in vitro (7 dni/37°C) zaobserwowano zmiany stężenia jonów odpowiedzialnych za nukleację apatytu (jony wapniowe Ca2+, jony fosforanowe PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Zmiany stężenia jonów wskazywać mogły kierunek migracji: przechodzenie modyfikatorów włókien (SiO<sub>2</sub>, HAp)

do roztworu (osocza) a możliwy spadek stężenia jonów wapniowych i fosforanowych wskazywal by na gromadzenie się tych jonów na powierzchni tworzywa. Medium immersyjne (SBF), w którym przetrzymywane były próbki został poddany analizie ICP (FIG.4). Po 7 dniach inkubacji tworzyw

The polymer without the fibrous phase had smooth surface with R<sub>a</sub>~1.1 µm. Addition of the fibres to the polymer matrix decreased wetting angle comparing to the pure polymer ( $\Theta \sim 75.5^{\circ}$ ). Wetting angle of the composite containing PVA fibres modified with 5wt.% SiO<sub>2</sub> was c.a. 70°, and of 72° for the material containing PVA fibres with 5 wt.% HAp, respectively. Increase of the surface hydrophility was related to the chemical character of the fibrous phase, which was also highly hydrophilic (O~15°), which underwent quick resorption in a long-term contact with water. The effect of biodegradation of the fibres and products of their fragmentation was porous surface of the composites. In in vitro conditions bulk and non-porous material become porous with mean pore sizes from 10 to 40µm (FIG.2). The composite materials were designed to act like separating membranes with selective permeability so their permeability was tested in a water/membrane/salt system. The higher permeability was observed in the case of the membrane containing PVA fibres with 5wt.% HAp, which reached stable work conditions just after 5s (FIG.3). During incubation of the materials in in vitro conditions (7





FIG .2. Surface morphology of the composite membranes: 5 wt.% PVA/SiO<sub>2</sub> in PCL matrix (a), and 5 wt.% PVA/Hap in PCL matrix (b).



RYS .3. Przeszpuszczalnośc membran kompozytowych: 5%wag. PVA/SiO<sub>2</sub> w matrycy PCL i 5%wag. PVA/Hap w matrycy PCL FIG.3. Perameability of the composite membranes: 5 wt.% PVA/SiO<sub>2</sub> in PCL matrix and 5 wt.% PVA/Hap in PCL matrix.

days/37°C) changes of concentration of ions responsible for apatite nucleation, i.e. calcium ions  $Ca^{2+}$ , and phosphate ions  $PO_4^{3-}$ , were observed. Changes of the ions concentrations might indicate direction of their migration; in the case of the fibres modifiers i.e. SiO<sub>2</sub>, HAp, into the solution (serum), 230

we wszystkich wyciągach stwierdzono spadek jonów Ca2+. Ubytek steżenia wynosił ok. 40-50% w stosunku do stężenia jonów wapnia w referencyjnym (przetrzymywanym w tych samych warunkach) SBF, co można tłumaczyć faktem, że jony obecno immersyjnym adsorbują się 🧧 na powierzchni materiału kompozytowego. Podobne zachowanie stwierdzono w stosunku do jonów fosforanowych PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Spadek stężenia po 7 dniach (o ok. 40-45% w stosunku do zawartości początkowej tych jonów w SBF).

Obecność nanokompozytwych włókien, które odpowiedzialne sa za bioaktywność membran kompozytowych wpływa również na strukturę matrycy. Otrzymane materiały poddane analizie termicznej wskazuja, że dodatek fazy włóknistej wpływa nie tylko na zmianę stopnia krystaliczności (TABELA 1) ale także zmieniają położenie temperatury T<sub>m</sub> i T<sub>a</sub>. Szczególnie ta ostatnia ulega przesunieciu nawet do 200 w przypadku kompozytu PVA z 5%



RYS.4. Zmiany stężenia jonow odpowiedzialnych za nukleacje apatytu.

FIG 4. Changes of concentration of ions responsible for apatite nucleation

	T <sub>g</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	∆H <sub>m</sub> [J/g]	[%]
PCL	32.5	60.9	66.3	42.2
PCL + 5% wag. PVA z HAp	39.4	37.2	68.2	43.4
PCL + 5% wag. PVA z SiO <sub>2</sub>	38.9	57.8	69.2	44.1

TABELA 1. Zmiany parametrow termicznych ( $T_m$ ,  $T_g$ ,  $\Delta H$  a także zmiany stopnia krystyalicznosci) otrzymanych materialow membranowych. TABLE 1. Characteristic temperatures of the fabricated composite polymer membranes ( $T_m$ ,  $T_g$ ,  $\Delta H$  and degree of crystallinity).

wag HAp w PCL. Otrzymane wyniki świadczą o możliwych oddziaływaniach powstałych na granicy faz osnowa faza modyfikująca.

# Podsumowanie

Chropowata i hydrofilowa membrana z porogenem włóknistym w postaci PVA modyfikowanego nanocząstką (HAp, SiO<sub>2</sub>) może stanowić dogodny nośnik substancji bioaktywnych może przyspieszyć regenerację uszkodzonej tkanki. Badania próbek z ceramicznymi nanododatkami, które były inkubowane w SBF świadczą o gromadzeniu się fosforanów na powierzchni tworzyw, co może doprowadzić do lokalnego przesycenia czego skutkiem będzie krystalizacja apatytu. Tworzywo może stanowić zatem atrakcyjne podłoże dla adherujących komórek kostnych. Wytworzone materiały mogą zatem pelnic funkcje membran separujących i stymulujących regenerację ubytków kostnych w technikach GBR. Dalsze badania nad wytworzonym materiałem powinny dotyczyć odpowiedzi komórkowej na powierzchnie materiału kontaktowanego bezpośrednio z ostobastami i fibroblastami.

# Podziękowania

Praca wykonana w ramach grantu Ministerstw Szkolnictwa Wyższego nr N50804932.

Ewa Stodolak jest stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach prgramu START w 2009 roku. and possible decrease of concentration of calcium and phosphate ions might indicate their accumulation at the materials surface. The immersion medium (SBF) was subjected to ICP analysis (FIG.4). After 7 days of the materials incubation all remaining immersion solutions exhibited decrease of Ca<sup>2+</sup> concentration. The concentration decrease was about 40-50% comparing to a reference SBF solution kept in the same conditions, which might be explained by calcium ions adsorption at the composite mate-

rial surface. Similar behaviour was observed in the case of phosphate ions  $PO_4^{3\cdot}$  i.e. decrease of the concentration after 7 days of about 40-50% comparing to their initial concentration in SBF solution.

The presence of nanocomposite fibres which were responsible for bioactivity of the composite membranes affected also the composite matrix structure. Thermal analysis studies of the composite materials indicated that introduction of the fibrous phase influenced not only degree of crystallinity (TABLE 1), but also changed  $T_m$  and  $T_n$  temperatures. Especially the last

one was altered even for 20°C in the case of the composite containing PVA fibres with 5wt.% HAp. The results indicated the presence of possible interactions on polymer/modifying phase interfaces.

# Summary

Rough and hyrophilic membrane with fibrous porogene i.e. PVA modified with ceramic nanoparticles (HAp, SiO<sub>2</sub>) may be a convenient carrier of bioactive substances accelerating regeneration of defected bone tissue. Results of investigations of samples with ceramic nanoadditives which were incubated in SBF indicated accumulation of phosphates on the materials surface, which may lead to local oversaturation of the solution and in turn to crystallisation of apatite. Such materials may be attractive support for adhering osteoblasts. The produced materials may play role of membranes which separate and stimulate regeneration of bone losses in GBR method. Further investigations on the nanocomposite membrane materials directly contacted with osteoblasts and fibroblasts.

# Acknowledgements

This work was supported by The Ministry of Science and Higher Education, grant No. N50804932. Ewa Stodolak is a beneficent of the programme START of Foundation for Polish Science in 2009.

Folish Science

# Piśmiennictwo

#### References

[1] Aslan M. Simsek G. Dayi E. Guided Bone Regeneration (GBR) on healing bone defects: a histological study in rabbits, J. Contemp Dent Pract 5 (2004) 1-7

[2] A. Piattelli, A. Scarano, M. Paolantonio, Bone formation inside the material interstices of e-PTFE membranes: a light microscopical and histochemical study in man, Biomaterials 17 (1996) 1725-1731

[3] K. Fuijhara, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers, Biomaterials 26 (2005) 4139-4147

[4] S. Zhao, E. M. Pinholt, J. E. Madsen, K. Donath, Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats, J Cranio-Maxillofacial Surg 28 (2000)116-122 [5] J. A. Jansen J. E. de Ruiter, P.T. M. Jansen, Y. G. Paquay Histological evaluation of biodegradable PLA/HAp membrane, Biomaterials 16 (1995) 819-827

[6] C. Durucan, P. W. Brown, Low temperature formation of calcium deficient hydroxyapatite-PLA/PGLA composite, J Biomed Res 51 (2000) 717-725

[7] S. J. Lee, Y. J. Park, S. N. Park, Y. M. Lee, Y. J. Seol, Y. Ku, C. P. Chung, Molded porous poly (L-lactide) membrane for guided bone regeneration with enhanced effect by controlled growth factor release, J Biomed Res 55-3 (2001) 295-303

. . . . . . . . . . . . . . . . .

# PROBLEMATYKA LOKALNEGO LECZENIA FARMACEUTYCZNEGO I IMPLANTOWEGO W PRZECIWIEŃSTWIE DO GLOBALNYCH METOD MEDYCZNYCH

#### MARIUSZ WÓJCIK

Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków MAILTO: wojmar@uci.agh.edu.pl

#### Streszczenie

W artykule podjęto próbę dyskusji nad interpretacją procesów farmakokinetycznych stosowanych leków odniesionych do różnych modeli stosowanych w praktyce, zwracając uwagę na brak w tych modelach opisów za pomocą cząstkowych równań różniczkowych (metoda pól).

Zaprezentowano nowe podejście do problematyki leczenia implantowego zawierającego aktywną substancję o określonym potencjale oddziaływania na pole chorego organu. Nowa metoda analizy zagadnienia oparta jest na wariacyjnym problemie ekstremali dla całki o funkcji podcałkowej (Hamiltonian) będącej aproksymatą rozkładu Gaussa dla nośnika ograniczonego. Jest nim w omawianym przypadku tzw. rozkład beta, traktowany jako przybliżenie Boltzmanowskiej entropii. Przeanalizowano problem wnikania leku w tkankę kostną, inicjowanego z prostokątnej płaskiej płytki, pozostającej w kontakcie ze wspomnianą tkanką. Stwierdzono, że zasadne i istotne jest podjęcie badań nad wyprodukowaniem specyficznej generacji leków z wybiórczą pamięcią leczenia konkretnego narządu powiązanego z jego dysfunkcją i określoną jednostka chorobową. Program sterowania inicjacją leku jest ważnym wyzwaniem dla laboratorium chemicznego i przemysłu farmaceutycznego.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 231-237]

# PROBLEMS OF LOCAL PHARMACEUTICAL AND IMPLANT TREATMENT IN CONTRARY TO GLOBAL MEDICAL METHODS

#### MARIUSZ WÓJCIK

AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS 30 MICKIEWICZ AV., 30-059 CRACOW, POLAND MAILTO: WOJMAR@UCI.AGH.EDU.PL

#### Summary

The trial of discussion over interpretation of pharmacokinetics processes of applied medicine related to different model used in practice was undertaken in paper. Attention was paid on the lack of partial differential equations in descriptions of these models (field method).

The new approach of problem of implant treatment with active substance characterizing in definite active potential influencing on a field of ill organ was presented in the paper. New method of analysis question is based on the variation problem of an extremal for integral where sub integral function (Hamiltonian) is an approximation of Gauss's distribution for limit carrier. In this case "beta" distribution treated as an approximation of Boltzmann's entropy is that function. The problem of penetration of medicine into the osseous tissue, initiated from rectangular flat plate of implant being in contact with mentioned tissue was analyzed. It was certify that undertaking investigations over construction of new implant composites including an active structures with new generation of medicines related with selective memory of treatment of organ related with their dysfunction and definite an individual sickness is legitimate, essential and is an important challenge for material engineering. The program of steering of an initiation of medicine is also the serious challenge for chemical laboratory as well as pharmaceutical industry.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 231-237]

W ostatniej dekadzie lat początku XXI wieku obserwuje się olbrzymi rozwój przemysłu farmaceutycznego, ale za tym nie idzie proporcjonalny rozwój teorii i praktyki farmakologicznej. Istnieje bardzo duża grupa specjalistów, reprezentujących różne kierunki studiów, którzy muszą posługiwać się farmakokinetyką przy opracowywaniu nowych leków. Są to nie tylko lekarze ale także absolwenci politechnik, którzy na studiach nie mieli okazji zapoznać się z farmakokinetyką. Odczuwa się brak przykładów interpretacji procesów farmakokinetycznych konkretnych, stosowanych współcześnie w lecznictwie leków, ponieważ opisy dotyczą równań różniczkowych zwyczajnych, a powinny cząstkowych [1,2]. Ponadto pojawiają się nowe wymagania dla bardziej elementarnego naświetlenia zagadnień farmakokinetycznych pod kątem wykorzystania ich do optymalizacji farmakoterapii. W szpitalach coraz częściej stosuje się terapeutyczne monitorowanie leków w celu optymalizacji ich dawkowania, co wymaga również znajomości farmakokinetyki. Problematyka dotycząca szybkości procesów wchłaniania leków (absorpcji) i dyspozycji (dystrybucji) leków w organizmie człowieka nabiera ostatnio istotnego znaczenia zwłaszcza w sytuacji bardzo zaawansowanych technik medycznych z zastosowaniem implantów zawierających leki do bezpośredniego oddziaływani na żywą tkankę ustroju człowieka lub zwierzęcia.

W wielu przypadkach okazuje się, że skuteczność jakiegoś leku podawanego pacjentowi w celu wyleczenia jakiejś choroby, zależy przede wszystkim od czasu, drogi transportu i co najważniejsze, właściwości środowiska przez który lek przechodzi. Procesy absorpcji i dyspozycji decydują więc o losach leków i ich metabolitów w organizmie żywym. Dyspozycja leku w organizmie żywym oraz eliminacja z niego przez wydalanie lub metabolizm nabiera w takim przypadku istotnego znaczenia. Problematyka ta jest ważna nie tylko w procesie tradycyjnego leczenia opartego na podawaniu leku w sposób dożylny lub pozanaczyniowo, ale także podczas operacji chirurgicznych, gdzie stosuje się różne implanty zawierające w swojej strukturze różne modyfikatory lub określoną ilość leku. Wiadomo, że leki podane dożylnie ulegają bezpośrednio dyspozycji, ponieważ bezpośrednio docierają do krwioobiegu, natomiast te podane drogą pozanaczyniową podlegają najpierw absorpcji w miejscu wchłaniania, np. w soku żołądkowym, jelitowym, w ślinie i innym płynie ustrojowym, a następnie wchłaniane są do krwi. Wchłanianie leku do krwi jest podstawowym warunkiem jego działania ogólnoustrojowego. Dopiero po jego wchłonięciu do krwi, może on dotrzeć do receptorów i w ten sposób wykazać swoje ogólnoustrojowe działanie lecznicze.

W tym celu w prowadzonych w klinikach badaniach farmakokinetycznych ustala się nie tylko wpływ czasu na losy leku w żywym organizmie, lecz także wpływ na nie drogi podania leku i dawki. Dzięki temu ustala się czy mamy do czynienia z procesami liniowymi lub nieliniowymi. Badania pozwalają obliczyć różne parametry farmakokinetyczne, np. stałe szybkości procesu absorpcji, eliminacji, objętość dystrybucji, klirens, biologiczny okres półtrwania (t<sub>0.5</sub>), średnie czasy wchłaniania (MAT) i przebywania leku w organizmie (MRT), pole pod krzywą stężenie-czas (AUC), stałą Michaelisa (K<sub>m</sub>), i inne. Obliczone parametry charakteryzują losy leku w organizmie w sposób ilościowy i są one niezbędne do rejestracji nowych leków. Parametry farmakokinetyczne są również wykorzystywane w tzw. terapeutycznym monitorowaniu leków (TDM), które pozwalają optymalizować dawkowanie na podstawie znajomości t<sub>0.5</sub>, oraz wymaganego stężenia terapeutycznego leku w stanie stacjonarnym

# Pharmacokinetics – analysis of a problem of global treatment

The gigantic development of pharmaceutical industry was observed in the last decade of years of beginning XXI age, but the proportional development of theory as well as the pharmacological practice does not go simultaneously. There are very large group of experts, representing different directions studies, which have to use pharmacokinetics when working out with new medicines. They are not only doctors but also engineering graduates colleges, which had not the opportunity to acquaint with pharmacokinetics. The lack of examples of interpretation processes was felt during application of contemporary medicines in medical care, because the descriptions concern the differential ordinary equations but they should of partial ones [1,2].

Moreover new requirements appear for more elementary exposing the pharmacokinetics questions in their use for utilization in optimization of pharmacokinetics. Therapeutic monitoring of medicines is used more frequently in the aim of their dosage optimization, what requires also an acquaintance of pharmacokinetics. Problems of the relation of speed of processes of an absorption and disposition of medicines gathers recently an essential meaning especially in situation of very advanced medical techniques with use of implants including the medicines to direct affect on alive tissue of the man's as well as animal system.

In many cases turns out, that passed effectiveness of some medicine of patient in the aim of curing some disease depends first of all from the time, way of transportation and from properties of environment through medicine crosses what is most important. Hence, processes of absorption and disposition decide about fates of medicines and their metabolites in alive organisms. The disposition of medicine in alive organism as well as the elimination from him by an excretion as well as metabolism gathers an essential meaning in such case. Problems are important not only in the traditional process of the practice treatment based on passing the medicine in intravenous way or extravascular, but also during surgical operations where it complies different implants including in one's structure different modifiers or the definite quantity of medicine. It is well known, that medicines passed intravenously undergo directly disposition because they grind in to the blood circulation directly, however those passed with extravascular road undergo the place absorption e.g. stomachic, intestinal, juice in saliva and in different constitutional fluid and then be absorbed to blood. Absorption of medicine into blood is the basic condition of his systemic working. It can reach receptors and in this way shows one's systemic healing activity after his absorbing into blood really. In this aim, it has been established not only influence of time in alive organism, but also the influence on the road of application of medicine and the dose in pharmacokinetics investigations guided in clinics. Thank to them it can be determined if we have to deal with linear or non - linear processes.

Investigations permit to count the different pharmacokinetics parameters e.g. the velocity constants of absorption as well as elimination processes, volume of distribution, clearance, semi-durable biological period ( $t_{0,5}$ ), averages times of absorption (MAT) and resident time of medicine in the organism (MRT), the field under the curve of concentration and time (AUC), Michael's constant ( $K_m$ ) and others. The counted parameters characterize the history of medicine in the organism quantitatively and they are indispensable to registration of new medicines. The pharmacokinetics parameters are used in so called the therapeutic monitoring of medicines (TDM), which permits to optimize the dosage w osoczu lub surowicy krwi. Badania farmakokinetyczne pozwalają także modyfikować strukturę substancji o spodziewanym działaniu leczniczym, aby osiągnąć wymagane wartości parametrów farmakokinetycznych.

Nasuwa się tu myśl, ze powinno się jednak zadbać, aby specyficzny lek miał także określone właściwości w punkcie do którego ma dotrzeć, a nie tylko ogólnoustrojowe działanie. To wywołuje potrzebę sterowania farmakokinetyką tego leku. Powstaje wobec tego kolejna sytuacja, gdy dwa niedaleko siebie leżące punkty chorobowe powinny uzyskiwać rożne leki. Wówczas leczący musi dysponować lekarstwem, które wywoła właściwe skutki w odpowiednich punktach. A to oznacza konieczność sterowania już polem skutecznego działania leku. Obecnie obowiązująca wiedza zawarta w literaturze farmakokinetyki leku dotyczy głównie podejścia globalnego czyli oddziaływania na cały organizm, który w modelach matematycznych traktowany jest jako jeden lub kilka tzw. kompartmentów. W tym ogólnym modelu przyjmuje się, że dochodzący do leczonego organu lek musi przejść przez skomplikowany układ narządów oddziaływujących na niego, gdzie jest eliminowany lub rozkładany w wyniki reakcji chemicznych. Zatem aktywność i skuteczność leku zależeć będzie od pola tych struktur anatomicznych. Istotne jest zatem podjęcie badań nad wyprodukowaniem specyficznej generacji leków z wybiórczą pamięcią leczenia konkretnego narządu powiązanego z jego dysfunkcją i określoną jednostka chorobową. Wadą istniejących obecnie modeli matematycznych jest to, że kompartmenty nie zawsze pokrywają się ze strukturami anatomicznymi organizmu. Ponadto pojęcie kompartmentu nie zawsze dotyczy stanu fizycznego substancji leczniczej, która znajduje się w określonym miejscu w organizmie, lecz jej różnych form w organizmie. W sytuacji gdy lek występuje w układzie biologicznym w kilku rozróżnialnych formach lub miejscach organizmu i jeżeli przechodzi z jednej formy lub miejsca w inna forme lub do innego miejsca z mierzalna szybkościa, to wtedy każda forma lub miejsce musi być traktowane jako oddzielne kompartmenty.

Powyższą problematykę krótko omówimy na modelach opisanych w literaturze [3]. Najprostszym modelem farmakokinetycznym jest otwarty model jednokompartmentowy, który zakłada natychmiastowe i homogeniczne mieszanie leku w krażących płynach i tkankach organizmu. Analizowana objętość płynu ustrojowego zawiera określoną ilość leku, która jest w każdej chwili procesu farmakokinetycznego proporcjonalna do stężenia leku w każdym dostępnym płynie ustrojowym lub w każdej liczącej się tkance. Model nazywa się otwarty, ponieważ do organizmu wprowadza się lek różnymi drogami (dożylnie lub pozanaczyniowo), a ponadto jest on z niego eliminowany natychmiast także różnymi drogami np. przez nerki z moczem czy przewód pokarmowy z kałem. Oba procesy wchłaniania i eliminacji zachodzą z różnymi prędkościami przy czym najczęściej wchłanianie jest szybsze od eliminacji. Jest to bardzo korzystna sytuacja w procesie leczenia, ponieważ w sytuacji odwrotnej należałoby zwiększyć dawkę. Ilościowy opis transportu leku w organizmie realizuje się najczęściej za pomocą zwyczajnych liniowych równań różniczkowych. Zakładając stacjonarność modelu przyjmuje się, że stałe szybkości procesów wchłaniania i eliminacji są niezależne od czasu. Na przykład, w modelu przy jednorazowej dożylnej

dawce leku ( $X_0 \rightarrow X \xrightarrow{k_e} X_u$ ) rozwiązanie równania różniczkowego pokazuje, iż ilość leku we krwi jest malejącą funkcją wykładniczą (1).

 $X = X_0 e^{-i\Omega}$  (1) gdzie:

X-masa leku we krwi w czasie t,

of medicine basing on information of  $t_{0.5}$  parameter as well as of required rigor concentration in stationary state of the therapeutic medicine in plasma or the serum of blood. Pharmacokinetics investigation also permits to make the structure modification of substance about expected treatment activity to reach the required values of pharmacokinetics parameters.

However it bring to mind here, that should oneself take care where the specific medicine shows specific activity properties in definite point to which it has to be reached but not only systemic working. This calls out the need of pharmacokinetics steering of this medicine. The next situation comes into being in the face when two near lying sick points should get various medicines. In that time doctor have to ones disposal to administer with medicine which will cause the proper results in suitable points in the sick organ. Hence this means the necessity of steering of the field of an effective activity of medicine already.

At present valid knowledge contained in pharmacokinetics literature of medicine concerns mainly the global approach where there is an influence on the whole organism which is usually treated as one or several compartments in mathematical models. It takes place that medicine coming to treated organ has to passage by compiled arrangement of organs interacted on him where it is eliminated or decomposed as results of chemical reactions in this general model. Therefore the activity and the effectiveness of medicine will depend on fields of these anatomical structures. Also, it is essential to undertaking such investigations over the production of the specific generation of medicines with selective memory for treatment of the definite organ combining with his dysfunction and definite the individual sickness. The weakness of an existing mathematical models is that compartments not always agree with anatomical structures of organism. Moreover the conception of compartment not always concerns the physical state of healing substance, which exist in the definite place in organism but concerns its different forms in organism. In situation when the medicine steps out in biological arrangement in several differentiation forms or organism places and if it crosses from one form or the place into different ones with measured velocity then every form or the place has to be treated as a separate compartment.

We will talk over above mentioned problems on models described in literature briefly [3].

The simplest pharmacokinetics model is the open single compartment pattern, which founds immediate and the homogeneous mixing of medicine in circulating fluids and tissues of organism. The analyzed volume of constitutional fluid contains the definite quantity of the medicine, which is proportional to concentration of medicine in fluid in every moment of pharmacokinetics process in every accessible constitutional fluid or in every mattering tissue. Model be calls open, because medicine can be introduce into organism in different roads (intravenous or extravascular), and moreover, it can be eliminated immediately also in different roads e.g. by kidney with urine or by alimentary tract with feces. Both processes draw ahead with a different velocity but what is most often the absorption is faster from elimination. It is very profitable situation in treatment process, because it an opposite situation it would be necessary to enlarge dose.

The quantitative description of medicine transportation in organism was mostly realized with the help of an ordinary linear differential equations. Basing on the stationary of model it is assumed that the velocity constants of an absorption as well as an elimination processes are matches independent from a time. In example, in model with a single intravenous 234

 $X_0$ -masa leku podana dożylnie jednorazowo,  $X_u$ -masa leku wydalona do moczu w czasie t,

K, k<sub>e</sub>-stałe szybkości eliminacji leku.

Przy jednorazowej dawce pozanaczyniowej otwarty model jednokompartmentowy jest bardziej skomplikowany, ponieważ należy uwzględnić zmiany stężeń leku w czasie zarówno w żołądku jak i w moczu. W tym modelu

 $(X_s \xrightarrow{k_a} X \xrightarrow{k_b} X_u)$  mamy do rozwiązania równanie różniczkowe drugiego rzędu w

następującej postaci:

$$\frac{d^2 X}{dt^2} + \left(k_a + k_e\right)\frac{dX}{dt} + k_a k_e X = 0$$
<sup>(2)</sup>

gdzie:

X-masa leku we krwi w czasie t,

 $X_{\rm s}$  –masa leku podana pozanaczyniowo (żołądek) jednorazowo,

X<sub>u</sub>-masa leku wydalona do moczu w czasie t,

k<sub>a</sub>, k<sub>e</sub>-stałe szybkości wnikania i eliminacji leku. Rozwiązaniem równania (2) jest funkcja w postaci:

$$X = \frac{k_{a}X_{s_{0}}}{k_{a} - k_{e}} \left( e^{-k_{e}t} - e^{-k_{e}t} \right)$$
(3)

Ilustrację zmian stężeń leku w organizmie w czasie t po pozanaczyniowym podaniu jednorazowej dawki w modelu jednokompartmentowym pokazuje RYSUNEK 1.

Opisane wyżej modele jednokompartmentowe są jednak niewystarczające dla procesów dyspozycji wielu leków, które kumulują się w takich narządach jak nerki, wątroba, serce, leki toksyczne dla określonych tkanek lub narządów a także leki kumulujące się w mózgu [4]. Do takich opisów stosuje się przepływowe fizjologiczne modele farmakokinetyczne uwzględniające budowę anatomiczną i funkcje fizjologiczne określonych narządów [5]. W świetle farmakokinetyki fizjologicznej organizm składa się z licznych kompartmentów, którym odpowiadają konkretne struktury anatomiczne połączone ze sobą układem krążenia i są one uszeregowane w przepływowy diagram pokazany na RYSUNKU 2.

Modele te opisuje się za pomocą równań różniczkowych na szybkość zmian ilości leku w każdym kompartymencie, które charakteryzują transport, akumulację i eliminacje leku. Uwzględniając natężenie przepływu strumienia krwi do

określonego narządu można wyznaczyć masową szybkość transportu leku do tego narządu. Zastosowanie szczegółowego modelu fizjologicznego u ludzi jest bardzo trudne, ponieważ zachodzi konieczność wyznaczenia stężeń leku w poszczególnych tkankach lub narządach. Wtedy zachodzi konieczność wykonania badań in



RYSUNEK 1. Krzywe zmian stężeń leku w organizmie w czasie t po pozanaczyniowym podaniu jednorazowej dawki w modelu jednokompartmentowym.

FIGURE 1. Curves of fluctuations of medicine concentration in organism in time t after extravascular administration of a single dose in a single compartment model.

dose of medicine (  $X_0 \rightarrow X \xrightarrow{k_e} X_u$  ) the solution of differential equation shows, that the quantity of medicine in blood is as diminishing exponential function (1).

$$X = X_0 e^{-x}$$
(1)

where:

X-mass of medicine in blood in time t,

X<sub>0</sub>-mass of medicine administrated once intravenously,

X<sub>u</sub>-mass of medicine expelled to urine in time t,

K, ke-velocity constants of elimination of medicine.

The open single compartment model is more compiled in the single extravascular dose, because it should be considered that concentration of medicine in stomach as well as in urine have been changed. In this model

 $(X_s \xrightarrow{k_a} X \xrightarrow{k_b} X_u)$  we have to found the solution of differential equation of second order in following figure:

 $\frac{d^2X}{dt^2} + \left(k_a + k_e\right)\frac{dX}{dt} + k_a k_e X = 0$ (2)

where:

X-mass of medicine in blood in time t,

 $X_{\rm s}\text{-mass}$  of medicine administrated once extravascular (stomach),

X<sub>u</sub>-mass of medicine expelled to urine in time t,

 $k_{\rm a}$  ,  $k_{\rm e}\text{-velocity}$  constants of absorption and elimination of medicine

The solution of equation (2) is a function as follows:

$$X = \frac{k_a X_{S_0}}{k_a - k_e} \left( e^{-k_e t} - e^{-k_b t} \right)$$
(3)

The illustration of fluctuations of medicine concentration in organism in time t after extravascular administration of a single dose in a single compartment model shows FIG-URE 1.

Described above the single compartment models are however insufficient for characterization of the processes of disposition of many medicines, which was accumulated in such organs as kidney, liver, heart, the toxic medicines for definite tissues as well as organs and also accumulating in brain [4]. The physiology flow pharmacokinetics model are used for such description which complies anatomic structure

and physiological functions of definite organs [5]. In the light of physiological pharmacokinetics organism consists from numerous compartments, which correspond with suitable anatomical structures joint together with circulation system with an arrangement in flow diagram showed in FIGURE 2.

These models are described with the aim of differential equations characterizing the velocity of changes of medicine quantity in every compartment, showing transportation, accumulation and the elimination of medicine. A mass transportation velocity of such medicine into this organ can be calculated taking into account the intensity of flow of stream blood into definite organ. The use of detailed physiological model for humans is very difficult, because it is necessary to point out the concentration of medicine in an individual tissues or an organs. Then it is need to carry out investigations in vitro or

vitro lub na zwierzętach.

Należy w tym miejscu także wspomnieć o niezależnym od opisywanych modeli podejściu do zagadnień farmakokinetyki, w którym przyjmuje się zasade momentów statystycznych. Przyjmuje się, że zmiany stężenia leku badane jako funkcja czasu, można uważać za proces podlegajacy prawom prawdopodobieństwa i statystyki, ponieważ nie wiadomo, która czasteczka ulega biotransformacji lub wydalaniu. Krzywe stężenia leku we krwi w funkcji czasu mają cechy krzywych rozkładu prawdopodo-



RYSUNEK 2. Schemat farmakokinetycznego modelu fizjologicznego, w którym Q oznacza prędkość przepływu krwi przez dany narząd, a wątroba i nerki są kompartymentami eliminującymi. FIGURE 2. Schema of physiology pharmacokinetics model where Q is a velocity of blood flow through given organ and liver and kidney are eliminating compartments.

bieństwa, a czas przebywania leku w organizmie cechy zmiennej losowej [6].

W świetle opisanych wyżej modeli pojawia się więc pytanie o możliwość ich aplikacji dla celów leczenia tkanek lub narządów za pomocą implantów zawierających leki, które mogą być dla nich w czasowej dyspozycji zależnie od postawionej diagnozy lekarskiej. Wkraczamy w tym miejscu w zagadnienia budowy struktury różnych rodzajów implantów przeznaczonych do różnych celów leczniczych, czym nie będziemy się tutaj zajmować lecz spróbujemy podejść do tego zagadnienia w sposób inny a do tej pory nie rozważany w literaturze. Jaka będzie ich skuteczność leczenia o tym oczywiście zadecydują szczegółowe badania i eksperymenty zarówno medyczne jak i technologiczne dotyczace parametrów stosowanych materiałów i metod produkcji implantów. Dla pewnego jednak opisu procesu oddziaływania leku ostatecznie będą potrzebne równania cząstkowe, dotyczące opisu pełnych pól transportu tych leków.

# Nowe podejście do problemu wnikania leku w tkankę kostną

W artykule zaprezentowano nowe podejście do problematyki leczenia implantowego zawierającego aktywną substancję o określonym potencjale oddziaływania na chory organ. Nowa metoda analizy zagadnienia oparta jest na wariacyjnym problemie ekstremali dla całki o funkcji podcałkowej (tzw. hamiltonianie) będącej aproksymatą rozkładu Gaussa dla nośnika ograniczonego [7,8]. Jest nim w omawianym przypadku tzw. rozkład beta, traktowany jako przybliżenia Boltzmanowskiej entropii. Analiza wariacyjna znalazła już swoje zastosowanie w wielu dziedzinach techniki [9]. Autor zaproponował tą metodykę w analizie zagadnień dotyczących sterowania właściwościami kompozytów węglowych i wytrzymałości włókien węglowych zawierających nanocząstki magnetytu [10,11], przy omawianiu transportu masy w implantologii bioceramicznej w zagadnieniach syntezy tkanki kostnej [12], a także stosując tę metodę rozwiązał zagadnienie znalezienia najlepszej trajektorii cząstki w zestalającej się masie polimeru tworzącego

on animals.

One should be mention in this place about an approach which is independent from described model to questions of pharmacokinetics where it takes the principle of statistical moments. It is assume, that the concentration of medicine studied as a function of time can be treated as a process coming under the rights of probability and statistics, because it is not known which particle undergoes the biotransformation or elimination. The curves of medicine concentration in blood as a function of time have attributes of curves of probability distribution while the passing time of medicine in organism exhibited attributes of random variable [6]

In the light of described above models some questions appear concerning the possibility of their application for aims of treatment of tissues or

organs using implants including the medicines. They can be useful in temporary disposition depending on establish medical diagnosis. We enter in this place in question of building of structure of different kinds of an implants designed to different treatment aims, what will not discussed here but we are going to approach to this question in different way which was not considered in literature. What will be their effectiveness of treatment it can be obviously decide after the detailed investigations and experiments both medical as well as technological relating the parameters of applied materials and methods of production of an implants. However it will be necessary to used the partial equations for specification of a process of the medicine response, giving the description of full transportation field in space of these medicine at last.

# New approach to problem of penetration of medicine into the osseous tissue

The new approach of problem of implant treatment with active substance about definite active potential was presented in the paper. New method of analysis question is based on the variation problem of an extremal for integral where sub integral function (Hamiltonian) is an approximation of Gauss's distribution for limit carrier [7,8]. In this case "beta" distribution treated as an approximation of Boltzmann's entropy is that function. Variation analysis was already applied in many branches in techniques [9]. Author proposed this method in steering problem of magnetic properties of carbon composites and strength of carbon fibres containing magnetic nano particles [10,11], in discussing the questions of mass transport with bio ceramic implantation in tissue osteosynthesis problems [12] as well as solved the problem of finding of the best trajectory of particle in crystallized mass of polymer during production of polymer fibers using this method [13].

In following considerations author will analyze the problem of penetration of medicine into the osseous tissue, initiated from rectangular flat plate of implant being in contact with mentioned tissue. 236

#### włókno polimerowe [13].

W poniższych rozważaniach autor przeanalizuje problem wnikania leku w tkankę kostną, inicjowanego z prostokątnej płaskiej płytki, pozostającej w kontakcie ze wspomnianą tkanka.

Ponieważ płaski (jednorodny) rozkład inicjacji przy jego impulsie początkowym niezależnym od punktu inicjacji (uważamy płytkę za lokalnie dużą) implikuje (dla tkanki kostnej uważanej za jednorodną) stałą wartość impulsu w płaszczyznach równoległych do płytki impulsowej, zatem dla wyznaczenia trajektorii leku w tkance wystarczy nam tylko jedno różniczkowe równanie Eulera (powstałe na bazie wariacyjnego problemu dla całki), postaci:

$$\delta \int_{0}^{t} h(x(t), \dot{x}(t)) dt = 0 \tag{4}$$

gdzie h=E(1-E), (zakładamy, że największa wartość energii jest jedynką), oraz:

$$E = x + \varphi(x, x) \tag{5}$$

Przyjmijmy x=s jako zmienna ortogonalna do płaszczyzn implantu. Podstawiając "hamiltonian" do równania Eulera - dostaniemy (6):

to równoważne zużyciu leku na drodze wewnątrz kostnego

5

Euler's equation (4) based on variation problem for integral is sufficient to point out the trajectory of medicine in a tissue when we assume that flat (homogeneous) distribution of medicine initiation with a initial impulse independent from the initiation point (plate is locally large) implies into osseous tissue (homogeneous) a constant value of an impulse in parallel planes to this plate.

$$\delta \int_{0}^{t} h(x(t), \dot{x}(t)) dt = 0 \tag{4}$$

where: h=E(1-E), E is energy We assumed its maximal value E<sub>max</sub>=1 and

$$E = \dot{x}^2 + \varphi(x, \dot{x}) \tag{5}$$

(We omit the coefficient "). We take x=s as the orthogonal variable to the plane of the implant. Substituting "Hamiltonian" to Euler's equation (wide theory of variation columns) we will get (6):

by the assumption that .

 $\varphi\left(x,x\right) = \varphi(s,s)$ 

the way inside of an osseous tissue in the following form:

albo:

$$\ddot{s} = \frac{-3cs - c^2s + \frac{c}{2}}{6s^2 + 6cs - 1}$$
(8)

Równanie to m my nie poszukując ale metody postep pokażemy, że istnieje rozwiązanie postaci:

$$s(t) = a_1 t^2 + a_2 t + a_3 \tag{9}$$

Poszukajmy takiego s(t), dla którego:

Wobec powyższego, rozpisując

ośrodka), równania postac (7):

$$\frac{-3cs^{2} - c^{2}s + \frac{c}{2}}{c^{2} + c - 1} = \alpha$$
(10)

6s + 6cs - 1

MATERIALS

ш

w związku z czym 
$$\tilde{s} = \alpha$$

$$s(t) = -\alpha t^2 + a_2 t + a_3 \tag{11}$$

(można sprawdzić, że istnieje takie  $\alpha$ ), bo (12):

$$3c(-2\alpha t + a_2)^2 - c^2(-\alpha t^2 + a_2 t + a_3) + \frac{c}{2} = \alpha [6(-2\alpha t + a_2)^2 + 6c(-\alpha t^2 + a_2 t + a_3) - 1]$$

 $s = \frac{2}{6s^2 + 6cs - 1}$ (8)

This equation we can solve numerically, however we do not look the specific technical solution but the procedure over solution of the question and we will show, that such configuration exists in the following formula:

$$s(t) = a_1 t^2 + a_2 t + a_3$$
(9)

Let's found such s(t) for which:

$$\frac{-3cs^{2} - c^{2}s + \frac{c}{2}}{\frac{c^{2}}{6s^{2} + 6cs - 1}} = \alpha$$
(10)
Therefore  $\underset{\text{and: } S = \alpha}{\overset{\infty}{=}}$ 

$$s(t) = -\alpha t^2 + a_2 t + a_3 \tag{11}$$

We can verify that exists that  $\alpha$ , because (12):

In accordance of above we write Euler's equation with assumption

$$\frac{-3cs - c^2s + \frac{c}{2}}{6s + 6cs - 1}$$
(8)  
nożna rozwiązać numerycznie, jednak  
konkretnego rozwiązania technicznego  
owania nad rozwiązaniem zagadnienia,

 $\varphi\left(x,x\right) = \varphi(s,s)$ 

Problem polega jak widać na doborze stałych.

Przeanalizujmy teraz zagadnienie wnikania leku w system kostny.

Ustalmy głębokość wnikania H. Zatem s = H daje nam czas wnikania T, po którym  $\varphi(H)=0$  .

Zapiszmy więc:

$$\varphi = c \left( -\alpha t^2 + a_2 t + a_3 \right) \tag{13}$$

Ponieważ potencjał ten jest związany z możliwością emisji leku, możemy znaleźć wydatek leku dla dowolnej chwili, jako:

$$\int_{0} \varphi(s(t)) dt \tag{14}$$

Wydatek ten będzie malał do zera dla t $\rightarrow$ T .

Emisja między chwilami  $t_{0}\text{-}\Delta t ~~ \text{oraz} ~ t_{0}$  będzie dana wartością:

$$\int_{t_o-\Delta t}^{t_o} \varphi(s(t)) dt = W(t_o)$$
(15)

Uzyskana funkcja jest wielkością wypływającego leku. Problemem będzie dobranie takiego potencjału aby na przykład  $W(t_o)$  nie zależało od  $t_o$ .

#### Podsumowanie

Przedstawiona dyskusja problematyki farmakokinetyki w leczeniu globalnym oraz zaproponowana metodyka analizy leczenia lokalnego implantami zawierającymi aktywne substancje leczące skłania do refleksji, że program sterowania inicjacją leku jest ważnym wyzwaniem dla laboratorium chemicznego i przemysłu farmaceutycznego. Jest także wyzwaniem dla inżynierii materiałowej w zakresie konstrukcji nowych kompozytów implantowych, o aktywnych strukturach, zawierających nową generację leków z wybiórczą pamięcią leczenia konkretnego narządu, powiązanego z jego dysfunkcją i określoną jednostką chorobową. Żądanie na przykład aby impuls pochodzący od działania leku zawartego w takim implancie miał postać solitonu (szczególnie wartościowa postać dla procesu leczenia) zmusza do dalszej analizy postawionego zagadnienia. Problem depends on the selection of constants as it can be visible.

Let's analyze the question of medicine penetration into an osseous system. We establish the depth of penetration the H. Therefore s = H gives us the time of penetration T, for w hich  $\varphi(H) = 0$ 

We can write:  

$$\varphi = c \left(-\alpha t^2 + a_2 t + a_3\right)$$
(13)

Because this potential is connected with the possibility of a medicine emission, hence we are able to found the medicine expenditure for any time as follows:

$$\int_{0}^{\infty} \varphi(s(t))dt \tag{14}$$

The medical expenditure will lower to zero for t $\rightarrow$ T. Emission have the following form between moments t<sub>0</sub>- $\Delta$ t and t<sub>0</sub>:

$$\int_{a-\Delta t}^{b} \varphi(s(t)) dt = W(t_o)$$
(15)

Above function represents the intensity of flow of medicine from implant into the treated osseous tissue. The main question appears in this consideration how we can fit such medicine potential where for instance  $W(t_o)$  do not depends on  $t_o$ .

#### Summary

The presented discussion of pharmacokinetics problems in global treatment as well as proposed methodology of analysis of the local one including active treating substances comes to reflection, that the program of steering of an initiation of medicine is a serious challenge for chemical laboratory and pharmaceutical industry. It is also an important challenge for material engineering in range of construction of new implant composites including an active structures with new generation of medicines related with selective memory of treatment of organ related with their dysfunction and definite an individual sickness. For instance, the demand where an impulse coming from the medicine activity contained in such implant should have the soliton form, which is particularly valuable for a treatment process, forces to further analysis of an established problem.

#### Piśmiennictwo

[1] S.Bielawski, Modele farmakokinetyczne, Wydawnictwa Komunikacji i Łączności, Warszawa 1989

[2] A.Danek, Farmakokinetyczne metody leków, Wyd. Akcyd. Warszawa 1979

[3] T.W.Hermann, Farmakokinetyka, Teoria i praktyka, WL PZWL, Warszawa 2002

[4] M.Rowland, T.N.Tozer, Clinical Pharmacokinetics: concepts and application. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1989

[5] J.Szymura-Oleksiak, Fizjologiczne podstawy farmakokinetyki. Far.Pol.1989,45,217-224

[6] M.Gibaldi, D.Perrier, Pharmacokinetics, Marcel Dekker, New York 1982

[7] I.M.Gelfand, S.W.Fomin, Rachunek wariacyjny, PWM Warszawa 1970 [8] L.E.Elsgolc, Variacionnyje isczislenia, Moskwa, 1956
 [9] G.Rakowski, Metoda Elementów Skończonych-Wybrane Problemy, Oficyna Wyd. Polit. Warsz., Warszawa 1996

[10] M.Wójcik, Analysis of a dependence of the strength of carbon fibre from the magnetic nanostructure, KARBO, 4/2007

[11] M.Wojcik, Steering of a new magnetic properties of carbon composites, International Conference on Fine Particle Magnetism, ICFPM-2007, Rome, Italy

[12] M.Wójcik, Mass Transport with Bio Ceramic Implantation in Tissue Osteosynthesis Problems, Conference Biomaterials in Medicine and Veterinary, Rytro 2008

[13] M.Wójcik, Problems of Increasing of Mechanical Properties of Polymer Fibres as Steering and Controlling Study of Variation Process, FH Munster-Steinfurt, 17th June 2009 - Socrates-Erasmus Programme

References

# ANALIZA ZMĘCZENIOWA TRANSPEDIKULARNEGO STABILIZATORA KRĘGOSŁUPA

#### M.KIEL\*, J.MARCINIAK, M.BASIAGA, J.SZEWCZENKO

Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18a, 44-100 Gliwice, Polska \*MAILTO: marta.kiel@polsl.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 238-240]

# Wprowadzenie

W ostatnich latach zaznacza się wzrastająca tendencja schorzeń i dysfunkcji kręgosłupa, wynikających z małej aktywności ruchowej społeczeństwa, urazów komunikacyjnych, aktywności sportowej, a w szczególności w sferze sportów ekstremalnych. Do tej kwestii wliczyć można także zwiększającą się liczbę osób starszych w populacjach. Statystyki medyczne wskazują, że główną przyczyną niesprawności u osób szczególnie po 45 roku życia jest ból kręgosłupowy. Z tego powodu cierpi około 70–80% ludności [1].

Najbardziej obciążonym i narażonym na zmiany zwyrodnieniowe odcinkiem kręgosłupa jest odcinek lędźwiowy. Na jego wysokości znajduje się środek ciężkości ciała ludzkiego. W nim też występują największe siły działające na kręgi oraz krążki międzykręgowe. Szacuje się, że ok. 62% przypadków patologicznych zmian w układzie kręgi – krążek międzykręgowy dotyczy właśnie segmentu L3 – L4 [2, 3].

Od początku lat 80-tych obserwuje się coraz to szersze zastosowanie śrubowych systemów transpedikluarnych w leczeniu kręgosłupa. Wielu producentów oferuje własne rozwiązania konstrukcyjne stabilizatorów, różniące się między sobą rodzajem śrub oraz ich montażem. System transpedikularnej stabilizacji kręgosłupa umożliwia leczenie piersiowego, piersiowo-lędźwiowego i lędźwiowego odcinka kręgosłupa z dostępu operacyjnego tylnego. Typorozmiary poszczególnych implantów stosowanych w leczeniu kręgosłupa, pozwalają leczyć wszystkie grupy wiekowe pacjentów [1,4].

Naukowcy coraz częściej prowadzą badania doświadczalne weryfikując je symulacjami numerycznymi lub korzystają tylko z samej analizy numerycznej stosując metodę elementów skończonych.

# Materiał i metodyka badań

Do badań wytypowano transpedikularny stabilizator kręgosłupa wykonany ze stali Cr-Ni-Mo. W skład stabilizatora kręgosłupowego wchodzą śruby transpedikularne, łącznik i pręty nośne. Skład chemiczny oraz stopień umocnienia biomateriału metalowego odpowiadał stopowi D z normy PN–ISO 5832/1 [5,6]. Stabilizator został zamocowany na pręcie z tworzywa sztucznego w sposób oddający warunki rzeczywistej stabilizacji na odcinku lędźwiowym kręgosłupa – RYS.1. Układ poddany analizie został zamocowany w uchwytach systemu badawczego wyposażonego w maszynę wytrzymałościową MTS 858 do badań dynamicznych.

Obciążenie układu stabilizator transpedikularny – pręt PCV było wynikiem założonego przemieszczenia maszyny o 1,5 i 2 mm. Przemieszczenie zostało dobrane w taki sposób, aby generować 50% wartości siły ściskającej niszczącej kręgi lędźwiowe. Zespolenie poddano 100 000 cykli.

Zespolenie poddawano badaniom dla dwóch ustawień

# FATIGUE ANALYSIS OF TRANSPEDICULAR STABILIZER ON LUMBAR PART OF SPINE

M.KIEL\*, J.MARCINIAK, M.BASIAGA, J.SZEWCZENKO

INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, SILE-SIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 18A KONARSKIEGO STR., 44-100 GLIWICE, POLAND \*MAILTO: MARTA.KIEL@POLSL.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 238-240]

# Introduction

Increasing tendency of affections and dysfunctions of spine which result from little mobile activity of society, accident injuries, sport activity, especially in extreme sports, has been observed in the last years. The increase of elder people in population is also important factor. Medical statistics indicate, that the main reason of inefficiency in people after 45 years old is spine pain. About 70–80% of population suffers from this reason [1].

The most vulnerable part of spine is a lumbar segment. There is located human's center of gravity and there also maximum forces loading vertebras and intervertebral discs are observed. About 62% of pathological changes in the vertebra – intervertebral disc system refers to the L3 - L4segment [2,3].

From the beginning of 80's the wide use of transpedicular screw systems is observed. Many producers of spine implants offer their individual solutions that differ in screw types and their assembly. The transpedicular stabilization system of spine enables treatment of thoracic, thoracic – lumbar and lumbar segment of spine. Geometric features of stabilizers' elements match individual anthropometric features of patients [1,4].

Scientists much more often carry out numerical simulations in order to verify results of experimental investigations or use only numerical analysis by means of finite element method.

# Material and method

The spine's transpedicular stabilizer made of stainless steel (Cr-Ni-Mo) was investigated. This type of stabilizer consist of transpedicular screws, contact arm and supporting rods. Chemical constitution and degree of strain hardening were adequate with D alloy from PN–ISO 5832/1 standard [5,6]. Stabilizer was installed on PVC rod according to real stabilization on lumbar part of spine – FIG.1. Analyzed system was installed in holder of testing machine MTS 858.

Transpedicular stabilizer – PVC rod system load was result of displacement foundation testing machine about 1,5 and 2mm. Displacement was selected in order to generated 50% value of compressive force destructive for lumbar vertebras. 100 000 cycles were applied to the system.

Two different install settings was analyzed. First install method was presented on FIG.1. In second install method system was moved about 90°. For the first install method a torque equal to 10 and 12Nm was applied. For the second install method, 12Nm torque was applied.

Requirements of fatigue research:

- I install method for 10 Nm and 12Nm torque:
  - range of traverse displacement 2mm,
  - changing load in time sinusoidal course,
  - 100 thousand load cycles with 0,65Hz frequency,

różniących się sposobem mocowania w maszynie wytrzymałościowej. Pierwszy sposób mocowania został przedstawiony na RYS. 1. W drugim sposobie mocowania zespolenie obrócono o kąt 90° w stosunku do osi maszyny. Dla pierwszego sposobu mocowania zastosowano moment dokręcający śrub 10 i 12Nm. Dla drugiego sposobu mocowania badania wykonano dla momentu dokręcającego śruby 12Nm.

Warunki przeprowadzenia badań zmęczeniowych:

 I sposób mocowania dla momentu dokręcającego śruby 10Nm i 12Nm:

- zakres przemieszczenia trawersy – 2mm,

 obciążenie zmienne w czasie – przebieg sinusoidalny,

 100 tys. cykli obciążeń z częstotliwością 0,6 Hz,

 Il sposób mocowania dla momentu dokręcającego śruby 12Nm:

- zakres przemieszczenia trawersy – 1,5 mm,

- obciążenie zmienne w czasie – przebieg sinusoidalny,

 100 tyś. cykli obciążeń z częstotliwością 0,65 Hz.

### Wyniki badań

Przy tak zadanych warunkach w stabilizatorze generowane były złożone stany naprężeń ściskająco – rozciągająco – zginających. Zakres momentów zginających działających w płaszczyźnie strzałkowej wynosił:

 I sposób mocowania dla momentu skręcającego śruby 10Nm – 28Nm dla ruchu fleksyjnego – zginanie oraz 76m dla wyprostu – RYS.2.,

 I sposób mocowania dla momentu skręcającego śruby 12 m – 6 Nm dla ruchu fleksyjnego – zginanie oraz 52Nm dla wyprostu – RYS.3. Po 57 000 cykli złamaniu uległ jeden pręt. Złamanie zlokalizowane było powyżej lewej dolnej śruby transpedikularnej. Było to spowodowane nierównomiernym rozkładem naprężeń generowanych w prętach podczas obciążania. W celu eliminacji nierównomiernego rozkładu naprężeń w prętach zastosowano drugi sposób mocowania stabilizatora w maszynie wytrzymałościowej oraz zmniejszono zakres przemieszczenia trawersy do 1,5 mm.

 II sposób mocowania dla momentu dokręcającego śruby 12Nm–48Nm dla ruchu fleksyjnego – zginanie oraz 32 m dla wyprostu – RYS.4.

#### Podsumowanie

Badania zmęczeniowe zostały przeprowadzone w celu określenia wytrzymałości stabilizatora na działanie siły ściskającej, rozciągającej oraz momentu gnącego i stabilności połączeń elementów suwliwych.

Stabilizacja w przeprowadzonych badaniach zmęczeniowych okazała się wytrzymałą pod działaniem 100 000 cykli złożonego stanu obciążenia. Uszkodzeniu uległ jedynie pręt wykonany ze stali Cr-Ni-Mo przy momencie dokręcającym śrub 12Nm po liczbie 57 000 cykli. Zakres momentów zginających działających w płaszczyźnie strzałkowej, przy których doszło do uszkodzenia wynosił: 68Nm dla ruchu fleksyjnego – zginanie oraz 52Nm dla wyprostu. Uszkodzenie miało związek z niesymetrycznym obciążeniem prętów stabilizatora, co wynikało z zamocowania zespolenia w uchwytach maszyny. Dlatego też zdecydowano o zmianie ustawienia próbki w stosunku do osi maszyny.

Podczas badań zaobserwowano poślizg elementu mocowania w stosunku do prętów stabilizujących. Poślizg wpływał



RYS.1. Układ stabilizator transpedikularny – pręt PCV zamocowany w uchwtyach maszyny wytrzymałościowej MTS Insight 10 kN.

FIG.1. Transpedicular stabilizer – PVC rod system was installed in holder of testing machine MTS Insight 10 kN.

- Il install metod for 12 Nm torque:
  - range of traverse displacement 1,5mm,
  - changing load in time sinusoidal course,
  - 100 thousand load cycles with 0,65Hz frequency.

#### Results

In the stabilizer complex states of compression – tension – bending stresses were generated. The range of the obtained torques in sagittal plane was:

• I install method for 10Nm torque – 28Nm for inflexional motion – bending and 76m for extension – FIG.2.

• I install metod for 12Nm torque – 68Nm for inflexional motion – bending and 52Nm for extension – FIG.3. After 57 000 cycles one of rod was brake. Break place wasabove left lower transpedicular screw. It was caused by non-unifrom stresses distribution during loading. In order to elimination these stresses and reduced range of traverse displacement to 1,5mm the second install method was applied.

• Il install method for 12Nm torque – 48Nm for inflexional motion – bending and 32Nm for extension – FIG.4.

# Conclusion

Fatigue analysis was carried out to determine strength of stabilizer on compression and tension forces, torques and stability of elements' connections.

The stabilization sustained 100 000 cycles. Only one rod made of stainless steel (Cr-Ni-Mo) was damaged after 57 000 cycles and 12Nm torque. Range of bending torque in sagittal plane was there 68 Nm for inflexional motion – bending and 52Nm for extension. This damage was connected with asymmetrical rod load what was result of the applied install method. That's why the install metod was changed.

Slide between fixation element and stabilization rods was observed during the research. The slide influenced the bending torques. The sidle was reduced with increase of the applied torque (increase of friction force). The higher value of slide increased the bending torques analogous to extension.

 na wartość momentów gnących. Wraz ze wzrostem momentu dokręcenia śrub (zwiększającego siły tarcia) poślizg ulegał zmniejszeniu. Większy poślizg powodował wzrost momentów zginających analogicznych do wyprostu.



RYS.2. Przebieg siły: a) w pierwszych 10 cyklach, b) w cyklach 50000 – 50058, c) w ostatnich cyklach próby zmęczeniowej dla I mocowania przy momencie dokręcającym śrub 10Nm FIG.2. Course of force: a) in first 10 cycles, b) in 50000 – 50058 cycles, c) in last cycles of fatigue analysis for 10Nm torque.



RYS.3. Przebieg siły: a) w pierwszych cyklach, b) w środkowych cyklach, c) w ostatnich cyklach próby zmęczeniowej dla I mocowania przy momencie dokręcającym śrub 12Nm. FIG.3. Course of force: a) in first cycles, b) in middle cycles, c) in last cycles of fatigue analysis for I 12Nm torque.



RYS.4. Przebieg siły: a) w pierwszych cyklach, b) w środkowych cyklach, c) w ostatnich cyklach próby zmęczeniowej dla II mocowania przy momencie dokręcającym śrub 12Nm. FIG.4. Course of force: a) in first cycles, b) in middle cycles, c) in last cycles of fatigue analysis for II 12Nm torque.

# Piśmiennictwo

[1] Ciupik L., Maciejczak A., Pieniążek J., Radek A., Zarzycki D.: Stabilizacja międzywyrostkowa, lędźwiowa: kompromis pomiędzy wypełnianiem funkcji leczniczych a wyborem materiału i rozwiązania konstrukcyjnego implantu. Zielona Góra: Spondyloimplantologia zaawansowanego leczenia kręgosłupa, 2005, s. 67–74.

[2] Będziński R.: Biomechanika i inżynieria rehabilitacyjna, t. V, EXIT, Warszawa 2004.

#### References

[3] Marciniak J., Szewczenko J., Walke W., Basiaga M., Kiel M., Mańka I.: Biomechanical analysis of lumbar spine stabilization by means of transpedicular stabilizer. Information Technologies in Biomedicine, Springer 2008, ASC 47, pp. 529–536 (rozdział w monografii)

[4] Nałęcz M.: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Tom V. Warszawa, EXIT, 2004.

[5] Marciniak J.: Biomateriały. Gliwice, Wyd. Pol. Śl., 2002.

[6] PN – ISO 5832/1 – 1997: Wszczepy dla chirurgii Materiały metalowe – Stal nierdzewna do przeróbki plastycznej.

# ODPORNOŚĆ KOROZYJNA STOPU Co-Cr-W-Ni (L605) W WYBRANYCH PŁYNACH FIZJOLOGICZNYCH

#### W.KAJZER\*, J.MARCINIAK

INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, 44-100 GLIWICE, POLSKA \*MAILTO: WOJCIECH.KAJZER@POLSL.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 241-243]

#### Wprowadzenie

Wiele lat doświadczeń klinicznych i ocen reakcji organizmu na implanty wykonane z biomateriałów metalowych stało się podstawą do modyfikacji zarówno jakościowej i ilościowej ich składu chemicznego i fazowego. Wybrano nieliczne stopy charakteryzujące się bardzo dobrymi własnościami fizykochemicznymi powierzchni, które z powodzeniem są stosowane w produkcji implantów. Odporność korozyjna biomateriałów metalowych przeznaczonych do produkcji implantów decyduje o ich reaktywności w środowisku tkanek i płynów ustrojowych co wiąże się z silną zależnością pomiędzy odpornością korozyjną, a biokompatybilnością biomateriałów metalowych. Dobrą biokompatybilnością charakteryzują się biomateriały metalowe o wysokim potencjale anodowym [1,2].

Produkty korozji infiltrują tkanki proces ten nosi nazwę metalozy [7]. Zmiany patomorfologiczne zależą od typu i koncentracji mikroelementów znajdujących się w bliskim kontakcie pomiędzy implantem, a otaczającą tkanką. Zmiany histopatologiczne obserwowane są również w organach detoksykacyjnych takich jak: wątroba, nerki, śledziona [1].

# Metodyka

Do badań wytypowano stop Co-Cr-W-Ni (L605) przeznaczony do produkcji implantów długotrwałych. Badania przeprowadzono na próbkach wykonanych z pręta o średnicy d=5mm i długości I=15mm. Zarówno pod względem struktury, składu chemicznego i własności mechanicznych wytypowany biomateriał spełniał stawiane biomateriałom implantacyjnym wymagania.

Badania przeprowadzono na próbkach o powierzchni polerowanej elektrolitycznej i pasywowanej chemicznie w warunkach opracowanych przez autorów oraz na próbkach polerowanych elektrolitycznie i pasywowanych chemicznie poddanych procesowi sterylizacji. Sterylizację przeprowadzono przy pomocy autoklawu Mocom Basic Plus. Badane próbki charakteryzowały się chropowatością R<sub>a</sub>≤0,16µm.

Badania odporności na korozję wżerową przeprowadzono metodą potencjodynamiczną polegającą na rejestrowaniu krzywych polaryzacji anodowej. Zastosowano potencjostat VoltaLab® PGP 201[4]. Badania przeprowadzono w temperaturze 37±1 °C w elektrolitach symulujących płyny ustrojowe człowieka - TABLICA 1. Zastosowano sztuczny mocz (pH=6+6,4), sztuczne osocze (pH=7,2+7,6) oraz roztwór fizjologiczny Tyrodea (pH= 6,8+7,4).

# Wyniki

Porównanie wartości średnich wyników badań odporności korozyjnej stopu Co-Cr-W-Ni (L605) wybranych płynach fizjologicznych zależne od sposobu przygotowania

# CORROSION RESISTANCE OF Co-Cr-W-Ni (L605) ALLOY IN SIMULATED BODY FLUIDS

W.KAJZER\*, J.MARCINIAK

INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 44-100 GLIWICE, POLAND \*MAILTO: WOJCIECH.KAJZER@POLSL.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 241-243]

#### Introduction

Long-term clinical experiences and evaluation of an organism's reaction to implants made of the metallic biomaterials have been the basis for modifications of their chemical and phase compositions, both quantitative and qualitative. Some alloys were chosen, that may be safely employed for implants within a given time span, stipulating additionally for the particular physical and chemical properties of the implants surfaces. The corrosion resistance of a biomaterial decides the reactivity of implants in the environment of tissues and organism fluids. There is a strong correlation between the corrosion resistance and the biocompatibility. Good biocompatibility is observed for metal and alloys with the high anode potential [1,2].

Corrosion products infiltrate tissues. This process is called metalosis [7]. Pathomorphological changes, dependent on the type and concentration of elements, occur in tissues close to implant. Histopathological changes are observed in detoxication organs (liver, kidneys, spleen) [1].

#### Material and methods

The corrosion resistance of Co-Cr-W-Ni (L605) alloy intended for implants was tested. The tests were carried out on samples in the form of a rod of diameter d=5mm and length equal to I=15mm. The tested material met implantation requirements concerning the chemical composition, the structure and mechanical properties.

The tests were carried out on samples of the following surfaces: electropolished and chemically passivated (average roughness  $R_a \leq 0,16\mu$ m) in conditions worked out by the authors and electropolished and chemically passivated after sterilization process. For sterilization the Mocom Basic Plus autoclave was applied. In order to measure the roughness the Surtronic 3+ surface analyzer was applied.

The pitting corrosion tests were realized by recording of anodic polarization curves. The VoltaLab® PGP 201 system for electrochemical tests was applied [4]. The tests were carried out in electrolytes simulating urine (pH=6÷6,4), plasma (pH=7,2÷7,6) and Tyrode's physiological solution (pH=6,8÷7,4) at the temperature of  $37\pm1^{\circ}C$  – TABLE 1.

# Results

. . . . . . . . . .

Comparison mean value of corrosion tests results of the Co-Cr-W-Ni (L605) alloy in different simulated body fluids, depending on surface preparation were presented in TA-BLE 2 and FIGURE 1a (for electrochemically polished and chemically passivated samples) and FIGURE 1b (for electrochemically polished and chemically passivated samples after sterilization process).
Sztuczny mocz Roztwór Tyrode'a Sztuczene osocze Artificial urine Tyrode sphysoologicalsoul-Artificial plasma (A : B= 1:1) tion g/ dm<sup>3</sup> wody g/dm<sup>3</sup> wody g/dm<sup>3</sup> wody g/ dm<sup>3</sup> wody Składniki A Składniki B Składniki Składniki destylowane destylowanej destylowane destylowanej Ingredients A Ingrediends B Ingredients Ingredients distiled water distiled water distiled water distiled water j CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O 1,80 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O 2,65 NaCl 6,80 NaCl 8,00 4,70 0,90 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> CaCl<sub>2</sub> 0,20 CaCl<sub>2</sub> 0,20  $MgSO_47H_2O$ 1,50 Na<sub>3</sub>Cit·2H<sub>2</sub>O 1,20 KCl 0,40 KCl 0,22 NH₄CI 4.65 NaCl 13,55 MgSO. 0,10 NaHCO 1,00 KCL 12,10 NaHCO<sub>3</sub> 2,20 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,12 MgCl<sub>2</sub> 0,20

### TABLICA 1. Wybrane płyny fizjologiczne [3, 5÷8]. TABLE 1. Simulated body fluids [3, 5÷8.].

Elektrolit Electrolyte	Sposób przygotowania powierzchni Surface preparation method	Potencjał korozyjny Corrosion potential E <sub>corr</sub> , [mV]	Potencjał transpasywacji Transpasivation potential E <sub>tr</sub> , [mV]	Opór polary- zacyjny, Polarization resistance, R <sub>p</sub> , [kΩcm²]	Szybkość korozji Polarization resistance, C, [µm/year]
Sztuczny mocz Artificial urine	Polerowanie i pasywacja Electropolished and passivated	-9,9	790,2	2604	0,10
	Polerowanie i pasywacja po sterylizacji Electropolished and passivated after sterylization	-7,9	804,3	3060	0,09
0-1	Polerowanie i pasywacja Electropolished and passivated	-131,2	813,4	2720	0,09
Artificial plasma	Polerowanie i pasywacja po sterylizacji Electropolished and passivated after sterylization	-126,9	850,7	2010	0,10
Roztwór Tyrode'a Tyrode's physiologi- cal solution	Polerowanie i pasywacja Electropolished and passivated	-79,2	665,9	1990	0,12
	Polerowanie i pasywacja po sterylizacji Electropolished and passivated after sterylization	-114,8	683,5	2300	0,12

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,02

TABLICA 2. Wyniki badań korozyjnych stopu Co-Cr-W-Ni (L605) w wybranych płynach fizjologicznych. TABLE 2. Corrosion resistance of Cr-Ni-Mo steel in simulated body fluids.





FIG.1. Example anodic polarization curves in different simulated body fluids: a) electrochemically polished and chemically passivated samples, b) electrochemically polished and chemically passivated samples after sterilization process.

powierzchni przedstawiono w TALBICY 2 i na RYSUNKU 1a (próbki o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i pasywowanej chemicznie) i RYSUNKU 1b (próbki i powierzchni polerowanej elektrolitycznie i pasywowanej chemicznie po procesie sterylizacji).

Zarejestrowane krzywe polaryzacji anodowej - RYS.1 a i b. charakteryzowały sie niskimi wartościami gęstości The recorded curves of the anodic polarization – FIG.1a and 1b, were characterized by lower values of the anodic current density in the range of potentials occurring in human body (0÷400mV). The lowest value of the anodic current density was recorded for the samples tested in the artificial urine. However the highest values were recorded for the samples tested in the artificial plasma for electropolished

#### Podsumowanie

Podsumowując przeprowadzone badania odporności korozyjnej stopu Co-Cr-W-Ni (L605) przeznaczonego do produkcji implantów długotrwałych dla chirurgii rekonstrukcyjnej, jak i do produkcji stentów wieńcowych oraz urologicznych można stwierdzić, iż skład chemiczny płynu fizjologicznego wpływa na zachowanie korozyjne.

Największe wartości potencjałów transpasywacji zaobserwowano dla próbek badanych w środowisku sztucznego osocza. Jednakże próbki te charakteryzowały się również najwyższymi wartościami gęstości prądu anodowego w analizowanym zakresie. Wysokie wartości gęstości prądu wskazują na zwiększoną aktywność powierzchniową biomateriału metalowego co z kolei prowadzi do zmniejszenia biokompatybilności w określonym ośrodku symulującym płyny ustrojowe człowieka.

Najmniejsze wartości potencjałów transpasywacji zarówno dla próbek nie poddanych sterylizacji jak i sterylizowanych zanotowano w badaniach przeprowadzonych w roztworze fizjologicznym Tyrodea, również parametr szybkości korozji, który dla tych próbek był największy świadczy o największej agresywności tego ośrodka.

Przeprowadzone badania stopu Co-Cr-W-Ni (L605) podobnie jak wcześniejsze badanie tego typu przeprowadzone przez autorów, a dotyczące stosowanej na implanty krótkotrwałe stali Cr-Ni-Mo (AISI 316L) [9] miały charakter porównawczy i potwierdziły, że istnieje wpływ ośrodka korodującego na odporność korozyjną badanego biomateriału. Podobne badania porównawcze należało by przeprowadzić dla innych biomateriałów metalowych takich jak stopy tytanu oraz stopy Ni-Ti w celu lepszego poznania i opisania zjawisk korozyjnych w różnych środowiskach symulujących płyny ustrojowe człowieka. Tym samym badania umożliwią lepszy dobór biomateriałów metalowych na poszczególne typy implantów.

# Piśmiennictwo

[1] J. Marciniak: Perspectives of employing of the metallic biomaterials in the reconstruction surgery. Engineering of Biomaterials, 1, December 1997, pp.12-20.

[2] S. Steinemann: Corrosion of surgical implants – in vivo, in- vitro tests in "Advances in Biomaterials". Wintenet al John Viley Sons, Chirchester 1980, pp.1-4.

[3] W. Kajzer, W. Chranowski, J. Marciniak: Corrosion resistance of Cr-Ni-Mo steel intended for urological stents. 11th International Scientific Conference on Contemporary Achievements in Mechanics, Manufacturing and Materials Science, Gliwice – Zakopane 2005 pp. 444-449.

[4] Z. Paszenda, J. Tyrlik-Held: Corrosion resistance of coronary stents made of Cr-Ni-Mo steel. Proceedings of the 10th Jubilee International Scientific Conference "Achievements in Mechanical and Materials Engineering 2001", Gliwice-Kraków-Zakopane, 2001, pp. 453-460. and chemically pasivated samples and artificial plasma and Tyrode's physiological solution for the samples after • sterilization.

### Conclusions

To sum up the performed corrosion tests of the Co-Cr-W-Ni (L605) alloy intended for long-term implants used in reconstructive surgery, cardiology (coronary and vascular stents), urology (urethral and ureteral stents), it can be stated that chemical composition of physiological fluid influences corrosion resistance.

The highest values of transpasivation potentials were observed for the samples tested in the artificial plasma. However these samples were also characterized by the highest values of the anodic current density in the passive range. High values of the anodic current density indicate the high surface activity in the medium. Contemporaneously it indicates less biocompatibility of Co-Cr-W-Ni alloy in the mentioned medium.

The lowest values of transpasivation potentials, both for the electropolished samples end electropolised and sterilizated samples, were observed in the Tyrode's physiological solution (with respect to the artificial plasma and urine). Also the value of corrosion intensity C in this solution was the highest. That indicates that the applied environment was the most aggressive.

The comparison tests showed similar as previous test [9] the influence of the corrosive medium on the corrosion resistance of the tested biomaterial. Similar study should be performed for other metallic biomaterials, e.i. titanium alloys and Ni-Ti alloys in order to better understand corrosion phenomena in simulated body fluids.

# References

[5] M. Multanen, M. Talja, S. Hallanvuo, A. Siitonen, T. Valimaa, T.L.J. Tammela, J. Seppala, P. Tormala: Bacterial adherence to ofloxacinblended polylactone- coated self- reinforced – lactic acid polymer urological stents. BJU International, 86, 2000, pp. 966-969.

[6] T. Valimaa, S. Laaksovirta: Degradation behaviour of self- reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro. Biomaterials 25 (2004), pp.1225-1232.

[7] Marciniak J.: Biomaterials. Edit by Silesian University of Technology (Wyd Pol. Śląskiej), Gliwice 2001, pp. 83, 212.

[8] Standard PN - EN ISO 10993-15.

[9] W. Kajzer, A. Krauze, W. Walke J. Marciniak: Corrosion resistance of Cr-Ni-Mo steel in artificial body fluids. Journal of Achievements in Material and Manufacturing Engineering, Vol 18, Issue 1-2, September October 2006, pp.115-118.

243

• • • • • • • • • • • • • • • • • • •

# ADHEZJA KOMÓREK STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS NA POWIERZCHNI STOPU Ti6AI4V MODIFIKOWANYCH WARSTWAMI BIOCERAMICZNYMI

BELCARZ A.<sup>1\*</sup>, BIENIAŚ J.<sup>2</sup>, SUROWSKA B.<sup>2</sup>, GINALSKA G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093, Lublin,
<sup>2</sup>Katedra Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska, ul. Nadbystrzycka 36, 20-618 Lublin,
MAILTO: anna.belcarz@umlub.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 244-246]

# Wstęp

Tytan i jego stopy, jako materiał do produkcji implantów, jest odporny na korozję, niealergizujący i stosunkowo nietoksyczny, natomiast dość podatny na zużycie ścierne. Pokrywanie ich powierzchni warstwa azotku tytanu powoduje zwiększenie jego oporności na ścieranie i nie wywołuje efektów alergicznych [1]. Jednakże na powierzchni zarówno tytanu jak i powierzchni modyfikowanych azotkiem tytanu obserwuje się znaczącą adhezję komórek bakteryjnych [2] co może spowodować powstanie biofilmu bakteryjnego. Postepowanie w przypadku opanowanego przez biofilm implantu wiąże się z jego usunieciem, z agresywna kuracją ogólnosystemową przy użyciu silnych antybiotyków, a czasem nawet z koniecznością amputacji kończyny. W celu zapobieżenia infekcjom bakteryjnym, podejmowane są próby modyfikacji powierzchni implantów tytanowych substancjami o aktywności antybakteryjnej takimi jak antybiotyki [3] lub warstwami zmniejszającymi ryzyko adhezji bakteryjnej [4,5].

W prezentowanej pracy przetestowano implanty ze stopu tytanu Ti6Al4V modyfikowane warstwami TiN, SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> oraz hydroksyapatytu (HAp). HAp zwiększa bioaktywność układu, a warstwa tlenków stabilizuje ich przyczepność do implantu. Celem pracy było określenie, czy tak wprowadzone modyfikacje stopów tytanowych sprzyjają czy też zapobiegają adhezji bakteryjnej i tworzeniu biofilmu przez szczep S. epidemidis.

# Materiały i metody

Przedmiot badań stanowiły warstwy TiN, SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> i HAp na stopie tytanu Ti6Al4V (ASTM-grade 5) wytwarzane metodą hybrydową. Warstwę TiN nałożono techniką azotowania jarzeniowego (temp. 800°C, ciśnienie 4hPa, czas procesu 3h). Następnie próbki dwukrotnie pokryto warstwą SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> techniką zol-żel (obróbka cieplna warstwy w temp. 500°C). Warstwę zewnętrzną stanowił hydroksyapatyt (Chema-Elektromet Co, Rzeszów) naniesiony metodą elektroforezy i wygrzewany w 750°C.

Oceny adhezji komórek bakteryjnych i tworzenia biofilmu dokonano na odtłuszczonych płytkach (12x7mm) wysterylizowanych tlenkiem etylenu. Płytki inkubowano przez 72h (37°C) w warunkach stacjonarnych z 15 ml sterylnego podłoża Mueller-Hinton z dodatkiem 100µl inokulatu S. epidermidis ATCC 12228 (10<sup>8</sup>cfu/ml). Następnie płytki przemyto10-krotnie PBS, a komórki pozostałe na powierzchni płytek

# ADHESION OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS CELLS ON TI6AI4V TITANIUM ALLOY SURFACES MODIFIED BY BIOCERAMIC LAYERS

BELCARZ A.1\*, BIENIAŚ J.<sup>2</sup>, SUROWSKA B.<sup>2</sup>, GINALSKA G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Lublin,
1 Chodźki str., 20-093, Lublin, Poland
<sup>2</sup>Department of Materials Engineering, Lublin University of Technology,
36 Nadbystrzycka str., 20-618 Lublin, Poland MAILTO: anna.belcarz@umlub.pl

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 244-246]

### Introduction

Titan and its alloys, as materials for production of implants, are corrosion-resistant, non-allergenic and relatively non-toxic; however, it is quite susceptible to abrasion. Modification of its surfaces by titanium nitride increases its abrasion resistance and allows to avoid allergenic effects [1]. However, on both titanium alloy and titanium nitride-modified surfaces, a massive bacterial adhesion tends to appear [2] which may result in bacterial biofilm formation. A removal of infected implant is combined with its replacement, systemic aggressive antibiotic therapy and sometimes results even with limb amputation. To avoid such a risk, titanium implant surfaces can be modified with substances of antibacterial activity (as antibiotics) [3] or by layers decreasing the risk of bacterial adhesion [4,5].

In presented work, Ti6ÅI4V titanium alloy implants modified by layers of TiN, SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> and hydroxyapatite (HAp) were tested. HAp increases bioactivity of substrate and oxides stabilize hydroxyapatite attachment to the implant surface. The aim of the work was to test whether the titanium implants modifications favour or prevent S. epidermidis adhesion and biofilm formation.

# Materials and methods

TiN, SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> and HAp layers on Ti6Al4V titanium alloy (ASTM-grade 5) produced by hybrid method were investigated. TiN layer on Ti6Al4V was manufactured by glow-discharge, assisted by nitriding in pure nitrogen atmosphere (at a temperature 800°C and 4hPa pressure for 3h). Next, the specimens were twice precovered with the SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> sol-gel layer (heat treated of the layer at 500°C). Finally, hydroxyapatite (Chema-Elektromet Co, Rzeszów) produced by electrophoresis method was deposited and annealed at 750°C.

Estimation of bacterial adhesion and biofilm formation was prepared on clean plates (12x7 mm) sterilized by ethylene oxide. Plates were incubated for 72h (37°C) under stationary conditions with 15 ml sterile Mueller-Hinton medium containing 100µl S. epidermidis ATCC 12228 (10<sup>8</sup>cfu/ml) inoculate. Then, the plates were washed 10x with PBS, and remaining bacterial cells were incubated for 15 minutes in darkness with 50µl 0.9% NaCl containing 3µl/ml fluorescent dye (Live/Dead® BacLightTM Kit). Stained bacterial cells were observed in fluorescence microscope (Olympus BX41 inkubowano 15 minut w ciemności z 50µl 0,9% NaCl zawierającego 3µl/ml barwnika fluorescencyjnego (Live/Dead® BacLightTM Kit). Wybarwione komórki bakteryjne obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym (Olympus BX41 z kamerą UC Soft Imaging System). Obecność biofilmu bakteryjnego wykrywano przy użyciu fioletu krystalicznego [3].

Materiał Material	Kod próbki sample code	kombinacja description	with UC Soft Imag- ing System camera).
	S1p	polerowany/polished	of bacterial
	S1g	szlifowany/ground	biofilm was
TICALAN	S2	Ti6Al4V+SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub>	detected
110AI4V	S3	Ti6Al4V+TiN	using crys-
	S4	$Ti6AI4V+TiN+SiO_2-TiO_2$	tal violet
	S5	Ti6Al4V+TiN+SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> +HAp	[0].

TABELA 1. Opis testowanych próbek. TABLE 1. Description of tested samples



RYS.1. Komórki S. epidermidis na powierzchni modyfikowanych płytek ze stopu tytanowego. Mikroskopia fluorescencyjna, Live/Dead Kit, powiększenie 1000x.

FIG.1. S. epidermidis cells on modified titanium alloy surfaces. Fluorescent microscopy, Live/Dead Kit, mag. 1000x.



RYS.2. Ilość komórek S. epidermidis na modyfikowanych powierzchniach ze stopu tytanowego. FIG.2. Amount of S. epidermidis cells on modified titanium alloy surfaces. RYS.3. Tworzenie biofilmu przez S. epidermidis na powierzchniach ze stopów tytanowych jako funkcja absorbancji wykazywanej przez rozwór wyekstrahowanego fioletu krystalicznego na mm<sup>2</sup> powierzchni; ilość dla niemodyfikowanej powierzchni stopu tytanu S1p przyjęto za 100%.

FIG.3. S. epidermidis biofilm formation on Ti alloy surfaces. Biofilm formation was presented as a function of extracted crystal violet absorbance (570 nm) per mm<sup>2</sup>; value for non modified titanium alloy S1p was taken as 100%. BI MATERING OF

Badanie modyfikowanych powierzchni tytanowych (TABELA 1) wykazało, że obecność warstwy SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> na powierzchni próbki minimalizuje stopień adhezji komórek S. epidermidis (RYS.1). Azotek tytanu jako czynnik modyfikujący powierzchnie tytanowe pełni rolę wzmacniającą odporność tytanu na ścieranie, ale nie zabezpiecza przed adhezja bakterii. Natomiast jego pokrycie dodatkową warstwą SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> znacznie zmniejsza ilość komórek bakteryjnych przylegających do podłoża. W przypadku, kiedy warstwa SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> jest dodatkowo powleczona warstwą hydroksyapatytu, ilość komórek bakteryjnych zaadsorbowanych do powierzchni próbek jest również nieznaczna, mimo, że hydroksyapatyt pokrywa bazową warstwę tlenków (RYS.1,2) oraz że warstwa tlenków jest niejednorodna i spękana. Powierzchnie polerowanego stopu tytanu charakteryzują się bardzo nierównomierną adhezją komórek bakterii (RYS.1). Zjawisko to może być wytłumaczone faktem, że w skład zawiesiny do polerowania płytek wchodził SiO2 oraz diament. Zarówno diament, jak i SiO<sub>2</sub> (obserwacje własne) hamują adhezję bakterii, więc pozbawione komórek fragmenty powierzchni na tych próbkach mogą być rezultatem działania pozostałości zawiesiny polerskiej wbitej w powierzchnię tytanu.

Obecność biofilmu wytwarzanego przez S. epidermidis odnotowano głównie na powierzchniach tytanowych niemodyfikowanych i pokrywanych TiN, zaś powierzchnie modyfikowane SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> pozostawały praktycznie wolne od biofilmu (RYS.3).

### Wnioski

Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowane modyfikacje płytek oparte na wykorzystaniu SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> jako warstwy wzmacniającej stabilność połączenia pomiędzy stopem tytanu Ti6Al4V a warstwą hydroksyapatytu ograniczają ryzyko adhezji bakterii i powstawania biofilmu bakteryjnego.

#### Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2009 jako projekt badawczy nr 3T08C05430.

### **Results and discussion**

Tests of modified titanium alloy samples (TABLE 1) showed that presence of SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> layer on sample surface minimized the ratio of S. epidermidis adhesion (FIG.1). TiN layer as a factor modifying titanium alloy surfaces increases its abrasion resistance but does not prevent bacterial adhesion. However, when its is additionally covered with SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> layer, the bacterial adherence decrease. In case when SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> layer is additionally covered with hydroxyapatite layer, the amount of adhered cells is also insignificant, although the hydroxyapatite covers the sublayer of oxides (FIG.1,2) and despite that oxide layer is cracked and uneven. Surfaces of polished titanium alloy underwent very irregular bacterial cells adhesion (FIG.1). Such phenomenon may be explained by fact that polishing suspension is composed of SiO<sub>2</sub> and diamond powder. Both these compounds inhibit bacterial adhesion; therefore, the fragment of this sample may be free of bacterial cells due to the presents of leftovers of polishing suspension incorporated to titanium alloy surface.

Presence of bacterial biofilm was observed mainly on titanium alloy surfaces non-modified and modified with TiN, while  $SiO_2$ -TiO\_2-modified surfaces remained practically biofilm-free (FIG.3).

# Conclusions

The results suggest that the modifications of titanium alloy surfaces tested in presented study, based on SiO2-TiO2 use as an interlayer increasing the stabilization of hydroxyapatite layer on Ti6Al4V alloy, limit the risk of bacterial adhesion and bacterial biofilm formation.

#### Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education: grant 3 T08C 054 30.

# Piśmiennictwo

 Niinomi M. Mater. Sci. Eng. A243 (1998) 231-236.
 Yoshinari M., Oda Y., Kato T., Okuda K., Hirayama A. J. Biomed. Mater. Res. 52 (2000) 388-394.
 Antoci V., Adams Ch.S., Parvizi J., Davidson H.N., Composto R.J., Freeman T.A., Wickstrom E., Ducheyne P., Jungkind D., Shapiro I.M., Hickok N.J. Biomaterials 29 (2008) 4684-4690.

. . . . . . . . .

[4] Jakubowski W., Bartosz G., Niedzielski P., Szymanski W, Walkowiak B. Diamond Rel. Mater. 13 (2004) 1761-1763.
[5] Harris L.G., Tosatti S., Wieland M., Textor M., Richards R.G. Biomaterials 25 (2004) 4135-4148.

References

# BADANIA IN VITRO SZCZELINY BRZEŻNEJ W WARSTWIE WIERZCHNIEJ SYSTEMU BIOMECHANICZNEGO ZĄB – WYPEŁNIENIE KOMPOZYTOWE

Daniel Pieniak<sup>1</sup>, Agata Niewczas<sup>2</sup>, Jarosław Bieniaś<sup>3\*</sup>, Krzysztof Pałka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Szkoła Główna Służby Pożarniczej (SGSP)w Warszawie, ul. Słowackiego 52/54, 01-629 Warszawa;
<sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Karmelicka 7, 20-081 Lublin;
<sup>3</sup>Katedra Inżynierii Materiałowej, Politechnika Lubelska, ul. Nadbystrzycka 36, 20-608 Lublin;
\*MAILTO:j.bienias@pollub.pl

#### Streszczenie

Celem badań była ocena ilościowa szczeliny brzeżnej systemu biomechanicznego ząb - wypełnienie kompozytowe z wykorzystaniem symulatora żucia w warunkach in vitro. Do badań wykorzystano: przedtrzonowe i trzonowe zeby ludzkie (preparowano ubytki klasy I wg Blacka) oraz materiał kompozytowy (ELS, Saremco AG). Testy zużycia przeprowadzono na oryginalnym trójosiowym symulatorze żucia (siła zgryzowa 400N, zaprogramowana trajektoria żucia wg. Batesa) przy 0, 30, 60 oraz 100 tys. cyklach żucia. Wykazano że: (1) szczelina brzeżna utworzona przez skurcz polimeryzacyjny pozostaje na niezmienionym poziomie w zakresie od 0 do 30000 cykli żucia, po przekroczeniu tego zakresu następuje znacząca rozbudowa szczeliny, co może prowadzić do degradacji wypełnienia w sensie klinicznym, (2) wykorzystanie symulatora żucia do badań in vitro rozwoju szczeliny brzeżnej umożliwia efektywną, przyśpieszoną ocenę degradacji czynnościowej wypełnień stomatologicznych.

*słowa kluczowe:* materiały kompozytowe, symulator żucia, szczelina brzeżna,

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 247-249]

### Wprowadzenie

Degradacja systemu biomechanicznego zab - wypełnienie kompozytowe postępuje głównie poprzez rozwój szczeliny w obszarze granicznym wypełnienia kompozytowego i tkanek zęba. Jedną z przyczyn powstawania szczeliny brzeżnej oraz inicjacji mikroprzeciekania brzeżnego jest skurcz polimeryzacyjny [1-5]. Naprężenia własne (resztkowe) w materiale wypełnienia oraz w tkankach twardych zęba powodują ugięcie - wyboczenie guzków [6-9]. Zaistniały stan naprężenia wywołuje oddziaływanie sił skierowanych przeciwnie do sił adhezyjnych materiału wiążącego, tkanek zęba i wypełnienia, powodując odrywanie się poszczególnych warstw na powierzchni rozdziału ząb wypełnienie kompozytowe. Proces ten jest kontynuowany podczas aktu żucia i innych czynności fizjologicznych jamy ustnej prowadząc w konsekwencji do ostatecznej degradacji fizyczno-biologicznej wypełnienia.

Celem badań była ocena ilościowa szczeliny brzeżnej systemu biomechanicznego ząb - wypełnienie kompozytowe z wykorzystaniem symulatora żucia w warunkach in vitro.

# IN VITRO EXAMINATION OF THE MARGINAL GAP IN THE SURFACE AREA OF THE TOOTH-COMPOSITE FILLING BIO-MECHANICAL SYSTEM

Daniel Pieniak<sup>1</sup>, Agata Niewczas<sup>2</sup>, Jarosław Bieniaś<sup>3\*</sup>, Krzysztof Pałka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The Main School of Fire Service (SGSP), 52\54 Slowacki str., 01-629 Warszawa, Poland <sup>2</sup>Medical University of Lublin 7 Karmelicka str., 20-081 Lublin, Poland <sup>3</sup>Department of Materials Engineering, Lublin University of Technology, 36 Nadbystrzycka str., 20-608 Lublin, Poland

# Abstract

The aim of the study was quantitative evaluation of the restorative composite bio-mechanical system performed with the use of the mastication simulator in in vitro conditions. Human premorals and morals (defects of class 1 according to Black's classification were prepared ) and composite material (ELS, Saremco AG) were used in the examination. Wear tests were carried out on the original three-axis mastication simulator (occlusion force 400 N, programmed chewing trajectory - according to Bates) at 0, 30, 60 and 100,000 chewing cycles. It was proved that: (1) the marginal gap formed by a polymerization shrinkage remains at the same unchanged level in the range from 0 to 30000 chewing cycles, after this range is exceeded a considerable expansion of the gap occurs, which may lead to the degradation of the filling in the clinical sense, (2) the use of mastication simulator in in vitro examination of the development of marginal gap enables effective and faster assessment of functional degradation of dental fillings.

Key words: restorative composite materials, mastication simulator, marginal gap

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 247-249]

### Introduction

. . . . . . . . . . .

Degradation of the tooth-composite filling bio-mechanical system progresses mainly through the development of the gap in the border area of composite filling and tooth tissues. Polymerization shrinkage is one of the reasons of formation the marginal gap and initiation of marginal micro-leakage [1-5]. Residual stresses in the filling material and hard tissues of the tooth cause deflection – buckling of cusps [6-9]. The occurred state of stresses causes the activity of forces directed in the opposite direction in the relation to adhesive forces of bonding material, hard tissues and the filling, resulting in detachment of individual layers at the interface between tooth and composite filling complex. This process is continued during chewing and other physiological activities in the oral cavity, in consequence leading to the eventual physical and biological degradation of the filling.

The aim of the study was quantitative evaluation of the marginal gap of the tooth-composite filling bio-mechanical system with the use of mastication simulator in in vitro conditions.

Do badań wykorzystano usunięte zęby ludzkie przedtrzonowe i trzonowe, w których preparowano ubytki klasy I wg Blacka o głębokości 3mm. Ubytki wypełniono materiałem kompozytowym ELS (Saremco AG) zgodnie ze wskazaniami producenta. Tak przygotowane próbki zębów zostały poddane testom zużycia na trójosiowym symulatorze żucia [10], pracującym przy stałej sile zgryzowej 400N oraz zaprogramowanej dla każdej pary próbek trajektorii żucia symulującej fizjologiczny tor ruchu żuchwy wg. Batesa [4,11]. Do analizy mikrostruktury, morfologii powierzchni żucia i pomiarów szczeliny brzeżnej wykorzystano elektronowy mikroskop skaningowy (LEO 1430VP) oraz metody komputerowej analizy obrazu (Image-Pro Plus, Media Cybernetics). Wyniki badań analizowano statystycznie stosując test ANOVA z post hoc HSD Tukey'a (Statistica , StatSoft Inc.).

# Wyniki i dyskusja

# Materials and methods

In the investigation human molars and premorals were used in which the defects of class I according to Black's classification were prepared (3mm deep). The defects were next filled with ELS (Saremco AG) composite material according to manufacturer's instructions. The specimens prepared in this way underwent wear tests on the three-axis mastication simulator [10], working at the constant occlusion force 400N and trajectory simulating physiological path of the mandible according to Bates [4,11] programmed for each pair of specimens. LEO 1430VP electron scanning microscope and methods of computer image analysis (Image-Pro Plus, Media Cybernetics) were used in the analysis of microstructure, morphology of chewing surface and measurements of the marginal gap. The results were statistically analyzed by means of ANOVA test with Tukey's post hoc HSD (Statistica, StatSoft Inc.).

# **Results and discussion**



RYS.1. Morfologia powierzchni żucia po przeprowadzonych testach zużycia: (a) 0 cykli żucia, (b) 30 000 cykli, (c) 60 000 cykli, (d) 100 000 cykli, (1–szkliwo, 2–wypełnienie kompozytowe, 3–szczelina brzeżna, 4–makropęknięcie).

FIG.1. Morphology of mastication surface after the performance of wear tests: (a) 0 cycles of chewing, (b) 30 000 cycles, (c) 60 000 cycles, (d) 100 000 cycles, (1-enamel, 2-composite filling, 3-marginal gap, 4-macro-crack).



#### RYS.2. Szereg rozdzielczy uzyskanych wyników pomiarów szczeliny brzeżnej. FIG.2. The distribution series of the marginal gap measurements.

Powierzchnię żucia w obszarze ząb-wypełnienie kompozytowe po przeprowadzonych badaniach zużycia przedstawiono na RYSUNKU 1. Analiza mikroskopowa wykazała obecność szczeliny brzeżnej zarówno w próbkach poddanych testom zużycia, jak i w próbkach świadkach (nie poddanych testom). W próbkach świadkach powstanie szczeliny brzeżnej, związane jest z oddziaływaniem skurczu polimeryzacyjnego podczas utwardzania materiału kompozytowego. Po 30, 60 i 100 tyś. cyklach zaobserwowano znaczący rozwój szczeliny brzeżnej na powierzchni rozdziału tkanka zęba (szkliwo)/wypełnienie kompozytowe. Odnotowano także obecność pęknięć bocznych oraz makropęknieć w materiale wypełnienia. Chewing surface in the area tooth-composite filling after wear tests is presented on FIG.1. Microscope analysis revealed the presence of the marginal gap in the specimens which underwent wear tests and the witness specimens (which did not undergo any tests). In the witness specimens the formation of the marginal gap is connected with the reaction of polymerization shrinkage during curing of composite material. After 30,000, 60,000 and 100,000 cycles, a considerable development of the marginal gap on the bordering line between the enamel and composite material was observed. The presence of lateral cracks and macro cracks in the filling material was also revealed.

Mean values and statistics of width of the marginal gap

Wartości średnie oraz parametry rozproszenia statystycznego pomiarów szerokości szczeliny brzeżnej przedstawiono w TA-BELI 1, natomiast szereg rozdzielczy uzyskanych wyników przedstawiono na histogramie (RYS.2).

Π	iczha cykli	l iczha no-	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch std	me
	żucia	miarów N	[μ <b>m</b> ]	[μ <b>m</b> ]	[μ <b>m</b> ]	[μ <b>m</b> ]	se
	0	21	4,8	2,7	12,1	3,0	
	30 000	45	5,6	0,4	28,5	7,5	se
	60 000	75	10,6	0,4	27,4	7,8	(F
	100 000	50	11,9	1,5	30,0	6,2	l`

TABELA 1. Parametry statystyczne pomiarów szerokości szczeliny brzeżnej na powierzchni żucia. TABLE 1. Mean values and statistics of width of the marginal

gap measurements on the chewing surface.

Analiza statystyczna nie wykazała różnic istotnych statystycznie między wyni-

kami z grup 0 cykli i 30000 cykli (p=0,9741) oraz pomiędzy wynikami z grupy 60000 cykli a wynikami z grupy 100000 cykli (p=0,7312). Stwierdzono natomiast istotne różnice pomiędzy wynikami po 30000 cykli żucia, a wynikami uzyskanymi w wyższych przedziałach obciążenia dla grupy 60000 cykli (p=0,00085) i dla grupy 100000 cykli (p=0,00069). Istotne różnice wykazano również porównując grupę próbek nie poddawanych obciążeniu z grupą po 60000 cykli i 100000 cykli (odpowiednio p=0,0043, p=0,00055).

#### Podsumowanie

Przeprowadzone badania in vitro zużycia układu biomechanicznego ząb – wypełnienie kompozytowe wykazały, że szczelina brzeżna utworzona przez skurcz polimeryzacyjny pozostaje na niezmienionym poziomie w zakresie od 0 do 30000 cykli żucia. Po przekroczeniu tego zakresu następuje znacząca rozbudowa szczeliny (prawie 2-krotne powiększenie szerokości), co może prowadzić do degradacji wypełnienia w sensie klinicznym.

Wykorzystanie symulatora żucia do badań in vitro rozwoju szczeliny brzeżnej, z odpowiednim odwzorowaniem fizjologicznych warunków żucia, umożliwia efektywną, przyśpieszoną ocenę degradacji czynnościowej wypełnień stomatologicznych, nawet przy relatywnie małej liczności badanej próby.

# Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008-20011 jako projekt badawczy.

#### Piśmiennictwo

[1]. Calheiros C.F., Sadek F.T., Boaro L.C.C., Braga R.R., Polymerization stress related to radiant exposure and its effect on microleakage of composite restorations, Journal of dentistry (2007) 35, p.946–952.

[2]. Rosin M., Urban A.D., Gartner C., Bernhardt O., Spleith C., Meyer G., Polymerization shrinkage-strain and microleakage in dentin – border cavites of chemical and light-cured restorative materials, Dental Materials 18 (2002) p.521–528.

 Wilder Jr. A.D., Swift Jr. E.J., May Jr. K.N., Thompsona J.Y., McDougal R.A., Effect of finishing technique on the microleakage and surface texture of resin-modified glass ionomer restorative materials, Journal of Dentistry (2000) 28, p.367–373.
 Fleminga G.J.P., Halla D.P., Shortalla A.C.C., Burkeb F.J.T,

[4]. Fleminga G.J.P., Halla D.P., Shortalla A.C.C., Burkeb F.J.T, Cuspal movement and microleakage in premolar teeth restored with posterior filling materials of varying reported volumetric shrinkage values, Journal of Dentistry (2005) 33, p.139–146.

[5]. Piemjaia M., Watanabeb A., Iwasakib Y., Nakabayashib N., Effect of remaining demineralised dentine on dental microleakage accessed by a dye penetration: how to inhibit microleakage?, Journal of Dentistry (2004) 32, p.495–501. measurements are presented in TABLE 1, the distribution series of the obtained results are presented in the histogram (FIG.2). 249

Analysis did not reveal any statistically significant differences between the results from the groups 0 and 30000 cycles ( p=0,9741) and

between the results from the group 60 000 and 100 000 cycles (p=0,7312). However, statistically significant differences were observed between the results after 30 000 chewing cycles and the results obtained in higher ranges of loading for the group 60 000 cycles (p=0,00085) and the group of 100 000cycles (p=0,00069). Significant differences were also observed when the group of specimens which were not subject to loading tests was compared with the groups of 60 000 and 100 000 cycles (p=0,0043, p=0,00055 respectively).

#### Summary

Conducted in vitro investigation of wear of the restorative material bio-mechanical system revealed that the marginal gap formed by polymerization shrinkage remains on the unchanged level at the rate from 0 to 30 000 chewing cycles. After exceeding of this level, a considerable expansion of the gap occurs (it becomes almost twice bigger), which may lead to the clinical degradation of the filling.

The use of mastication simulator in in vitro investigation of the development of the marginal gap, with a proper reflection of physiological conditions of chewing enables effective and accelerated assessment of functional degradation of dental fillings even at a relatively small number of investigated specimens.

# Acknowledgements

Presented work was financed from the scientific funds in the years 2008-2011 as a research project.

#### References

[6]. Bragaa R.R., Boaroa L.C.C., Kuroeb T., Azevedoc C.L.N., Singerc J.M., Influence of cavity dimensions and their derivatives (volume and 'C' factor) on shrinkage stress development and microleakage of composite restorations, Dental Materials (2006) 22, p.818–823.

[7]. Fleminga G.J.P., Carab R.R., Palin W.M., Burkec F.J.T., Cuspal movement and microleakage in premolar teeth restored with resin-based filling materials cured using a 'soft-start' polymerisation protocol, Dental Materials (2007) 23, p.637–643.

[8]. Palina W.M., Fleminga G.J.P., Nathwania H., Burkeb F.J.T., Randallc R.C., In vitro cuspal deflection and microleakage of maxillary premolars restored with novel low-shrink dental composites, Dental Materials (2005) 21, p.324–335.

[9]. Cara R.R., Fleming G.J.P., Palin W.M., Walmsley A.D., Burke F.J.T., Cuspal deflection and microleakage in premolar teeth restored with resin-based composites with and without an intermediary flowable layer, Journal of Dentistry (2007) 35, p.482–489.

[10]. Hunicz J., Niewczas A., Kordos P., Pieniak D., Experimental test stand for analisis of composite dental fillings degradation, Maintenance and Realiability, (2007) 2, p.37–43.

[11]. Grosfeldowa O., Fizjologia narządu żucia, PZWL, Warszawa 1981.

• • • • • • • • • • • • • • • •

# ANALIZA BIOMECHANICZNA ZESPOLENIA KOŚĆ ŚRÓDSTOPIA I – ŚRUBY DWUWCHODOWE

#### A. ZIĘBOWICZ\*, A. KAJZER, W. KAJZER, J. MARCINIAK

Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Wydział Mechaniczny Technologiczny, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18a, 44-100 Gliwice, \*MAILTO: anna.ziebowicz@polsl.pl

#### [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009),250-252]

# Wprowadzenie

Budowa stopy ludzkiej jest złożona \_ składa się ona z kości, mięśni, ścięgien i innych tkanek miękkich. Podzielona jest na trzy części: stęp, śródstopie i palce (19 kości). Złamania kości śródstopia są dość powszechne, a ich przyczyną najczęściej jest uderzenie ciężkiego przedmiotu albo skręcenie. Złamania tego typu podzielono na trzy sekcje – I, V i II-IV. Kość śródstopia I jest krótsza i szersza od pozostałych kości śródstopia. Ponieważ nie posiada także wiązadeł łączących ją z kością II, umożliwia jej to niezależne ruchy. Jest ona także najbardziej obciążoną kością stopy (1/3 masy ciała) [1÷5]. Dlatego jakakolwiek oznaka braku stabilności w złamaniach kości śródstopia I wymaga leczenia chirurgicznego, obecnie np. poprzez zastosowanie śrub kompresyjnych [6].

Celem pracy była analiza biomechaniczna układu kość śródstopia I – prototypowa śruba dwuwchodowa do leczenia złamań kości drobnych. Zakres pracy obejmował analizę wartości przemieszczeń odłamów kostnych, w charakterystycznych punktach modelu metodą numeryczną oraz doświadczalną.

# BIOMECHANICAL ANALYSIS OF THE 1<sup>ST</sup> METATARSAL - COMPRESSION SCREWS SYSTEM

#### A. ZIĘBOWICZ\*, A. KAJZER, W. KAJZER, J. MARCINIAK

INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 18A KONARSKI STR., 44-100 GLIWICE, POLAND \*MAILTO: ANNA.ZIEBOWICZ@POLSL.PL

#### [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 250-252]

# Introduction

The structure of human foot is complex, consisting of bones, muscles, tendons, and other soft tissues. Of the 26 bones in foot, 19 are toe bones (phalanges) and metatarsal bones (the long bones in the midfoot). Metatarsal fractures are common and usually caused by the blow of a heavy object dropped onto the forefoot or by a twisting injury. They are divided into three sections – 1st, 5th, and 2nd – 4th. First metatarsal is shorter and wider than the other metatarsals, it also has a lack of interconnecting ligaments between itself and the second metatarsal. This allows for independent motion. The head of the 1st metatarsal is thought to bear one third of body weight  $[1\div5]$ . That's why any evidence of instability requires operative fixation. The present-day alternative is the canullated compression screws [6].

The aim of this work was biomechanical analysis of the 1st metatarsal - compression screw system used for small bone treatment. The paper presents results of bone fractures in characteristic points obtained from experimental and numerical methods.

# Methodology

# Metodyka

Do badań doświadczalnych układu kość śródstopia I - dwie śruby dwuwchodowe wykorzystano maszynę do badań wytrzymałościowych Zwick/Roell Z100/SN5A. W celu przeprowadzenia próby ściskania model doświadczalny umieszczono pomiędzy trawersami maszyny wytrzymałościowej. Pomiaru wartości

przemieszczeń do-



In the experimental research of the 1st metatarsal bone - compression screws system (anatomical fracture simulated) the universal testing machine Zwick/Roell Z100/SN5A was applied. The experimental model was placed between crossbeams in order to making compressing test.

RYS.1. Model doświadczalny – próba: a) ściskania, b) zginania. FIG.1. Experimental model and compressing test - a), bending test - b).

konano w kierunku osi z – RYS.1a. Natomiast wartości przemieszczeń w próbie zginania rejestrowano w kierunku osi y – RYS.1b.

- Dobrane parametry obciążeń były następujące:
  - szybkość obciążania: 0,5mm/min,
  - siła wstępna: 1 N,
  - górna granica siły: 3000N.

Dodatkowo dla badanego modelu określono stan przemieszczeń i naprężeń z wykorzystaniem metody elementów Measurement of the displacements values were done in z axis direction – FIG.1a. Whereas measurement of the displacements values during the bending test were registered in y axis direction – FIG.1b.

- load steps: 0,5mm/min,
- initial force: 10N.
- the maximum force: 3000N.

Additionally, the 1st metatarsal – compression screws system was analyzed with the use of the finite element

skończonych. Dla potrzeb obliczeń przyjęto:

 $\hfill\square$  własności materiałowe kości (E=1860 MPa,  $\nu$ =0,3),

 własności materiałowe odpowiadające stali Cr-Ni-Mo (E=20000MPa, v=0,33) [7,8].

Szczegółowe warunki brzegowe i wyniki analizy numerycznej przedstawione zostały w pracy [9].

### Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że charakter przemieszczeń modeli w warunkach badań doświadczalnych i numerycznych był zbliżony – RYS.2. method (displacements and stresses were calculated). In order to carry out the analysis the material properties were as follows:

□ bone (E=18600MPa, v=0,3),

stainless steel (E=200000MPa, v=0,33) [7,8].

Detailed information about initial, boundary conditions and results of that analysis were presented in the paper [9].

### Results

On the basis of the performed analyses it can be stated that the displacements characteristics of the 1st metatarsal bone – compression screws system in the experimental and



RYS.2. Porównanie przemieszczeń uzyskanych w badaniach doświadczalnych i numerycznych. FIG.2. Comparison of displacements for experimental and numerical analysis

Obserwacje modelu doświadczalnego po przeprowadzonej próbie ściskania na maszynie wytrzymałościowej wykazały zerwanie jednej ze śrub dwuwchodowych. numerical conditions were similar – FIG.2.

Observations of the experimental model after compression test revealed that one of the compression screws is bro-

Miejsce zniszczenia odpowiada maksymalnym wartościom naprężeń w śrubie uzyskanych w badaniach przeprowadzonych metodą elementów skończonych – RYS.3.

Analogicznie analiza stanu naprężeń wytypowanego modelu wykazała, że maksymalne wartości naprężeń powstałych w wyniku przyłożonych sił zginających zlokalizowane także były w miejscu przewężenia śruby – RYS.4.





ken. Damage localization corresponded with the maximum values of stresses obtained from the numerical analysis – FIG.3.

Analogous, stress analysis of the numerical model revealed that the maximum values of stresses obtained from the bending loads were localized in the place of screw narrowing – FIG.4.

Analiza stanu przemieszczeń wykazała, że podczas ściskania i zginania maksymalne przemieszczenia odłamów kostnych nie przekraczały wartości odpowiednio - 0,22 mm i 0,15 mm. Natomiast uzyskane wartości przemieszczeń w badaniach doświadczalnych wynosiły: 0,23 mm dla ściskania i 0,19 mm dla zginania.



for the metatarsal bone - compression screws system for both tests: compression and bending revealed, that maximum values did not exceed 0,22mm and 0,15mm respectively. Whereas displacements obtained from the experimental analysis were equal to 0,23mm for compression and 0,19mm for bending test.

The obtained

displacements

RYS.4. Miejsce największego wytężenia śruby (badania doświadczalne) – a), maksymalna wartość naprężeń zredukowanych (badania numeryczne) - b) FIG.4. The place of the maximal screw effort (experimental analysis) - a), reduced stresses distribution (numerical analysis) - b)

. . . . . . . . . . . . . .

# Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że:

charakter przemieszczeń modeli w warunkach badań doświadczalnych i numerycznych był zbliżony,

maksymalne wartości naprężeń w śrubie uzyskanych w badaniach przeprowadzonych metodą elementów skończonych potwierdzają miejsce zniszczenia śruby dwuchodowej podczas badań doświadczalnych,

badania doświadczalne oraz z wykorzystaniem mechaniki komputerowej założonego modelu zespolenia śrubami dwuwchodowymi kości śródstopia I (jej trzonu) stanowiły podstawę do zdeterminowania własności użytkowych biomateriału metalowego i cech geometrycznych implantu.

### Conclusions

On the basis of the obtained results it can be stated that:

□ the displacements characteristics of the 1st metatarsal bone – compression screws system received with the use of the experimental method showed good correlation with the numerical results,

□ the maximum values of the screw stresses obtained from the numerical method confirm the damage localization of the canullated compression screw observed during the experimental analysis,

□ the obtained results are the basis for selection of the structure and mechanical properties of the metallic biomaterial and geometrical features of the implant, it can be also applied in selection of stabilization methods of the metatarsals fractures.

# Piśmiennictwo

 Carey T.: Metatarsal fractures – 1st and 5th, Orthopaedia – Collaborative Orthopaedic Knowledgebase, 2007.

[2]. Arndt A., Ekenman I., Westblad P., Lundberg A.: Effects of fatigue and load variation of metatarsal deformation measured in vivo during barefoot walking, Journal of Biomechanics, 2002, 35, pp. 621-628.

[3]. Buckwalter J.A., Brander E.A.: Stress and insufficiency fractures, Am. Fam. Physician, 1997, 56, pp. 175-182.

[4]. Butterman G.R., Janevic J.T., Lewis J.L., Lindquist C.M., Wood K.B., Schendel M.J.: Description and application of instrumented staples for measuring in vivo bone strain, Journal of Biomechanics, 1994, 27, pp. 1087-1094.

[5]. Donahue S.W., Sharkey N.A.: Strains in the metatarsals during the stance phase of gait: implications for stress fractures, J.Bone Joint Surg. Am., 1999, 81, pp. 1236-1244.

# References

[6]. Stryker Leibinger GmbH & Co. KG: TwinFix cannulated compression screw, Leibinger solutions for hand surgery, Procedural Guide, 2004, Stryker.

[7]. PN - ISO 5832-1, Implants for surgery metallic materials, Part I: Wrought stainless steel, (1997).

[8]. Marciniak J.: Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice (2002).

[9]. Kajzer W., Kajzer A., Marciniak J.: FEM analysis of compression screws used for small bone treatment. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering, 2009, 33(2), pp. 189-196.

BI MATERIALS

# ROZWÓJ POLIMERÓW W OPARCIU O NATURALNE SUROWCE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

#### MIROSŁAWA EL FRAY

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Instytut Polimerów, Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych, ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin MAILTO: mirfray@zut.edu.pl

#### Streszczenie

Polimery syntezowane metodami reakcji łańcuchowych znalazły szerokie zastosowanie w technikach medycznych, włączając poliestrowe lub poliuretanowe protezy naczyń krwionośnych, biodegradowalne rusztowania dla inżynierii tkankowej i różnorodny sprzęt medyczny. Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych specjalizuje się w syntezie różnorodnych kopolimerów segmentowych (ko- i terpolimerów o charakterze elastomerów termoplastycznych) z udziałem dimeryzowanych kwasów tłuszczowych - surowców pochodzenia naturalnego nadających wyjątkowe cechy materiałom (z wysoką biozgodnością in vitro i in vivo włącznie). Te nowe polimery mogą być z powodzeniem modyfikowane przy użyciu różnych bioaktywnych związków w celu uzyskania funkcjonalnych (np. antybakteryjnych) polimerów. Inny typ modyfikacji w kierunku biofunkcjonalnych i bioaktywnych materiałów to polimery wstrzykiwane i fotosieciowalne na podstawie pochodnych poliuretanowych. Niezwykle istotnym kierunkiem badań jest opracowywanie polimerowych nanokompozytów metodą polikondensacji in situ. Metoda ta pozwala na wytwarzanie różnorodnych systemów polimerowo-ceramicznych o wyjątkowo niskiej zawartości nanocząstek (poniżej 0.5%wag.). Poliestry, w matrycę których wprowadzano nanocząstki TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> lub hydroksyapatytu wykazały znaczącą poprawę właściwości mechanicznych porównaniu do materiałów wyjściowych. Co więcej, wykazują one korzystne cechy bioaktywności w kontakcie z komórkami, gdyż cechy budowy manometrycznej są podobne do tych, jakie znajdujemy w macierzy pozakomórkowej, stąd nanokompozyty takie mogą stanowić rusztowania i podłoża dla dostarczania komórek i odbudowy tkanek [1]. Ostatnie wyniki badań przebudowy kości na podłożu nanokompozytowym stanowią wyzwanie dla prób syntezy kości [2] i przypuszczalnie innych rodzajów tkanek.

słowa kluczowe: implanty polimerowe, systemy wstrzykiwalne, sztuczne organy. [Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 253]

# Piśmiennictwo

[1]. Piegat A., El Fray M., Jawad H., Chen Q., Boccaccini A. R., Advances in Applied Ceramics: Structural, Functional and

Bioceramics, 2008, 107(5), 287-292].

MIROSŁAWA EL FRAY

West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Polymer Institute, Division of Biomaterials and Microbiological Technologies, 10 Pulaski str., 70-322 Szczecin MAILTO: mirfray@zut.edu.pl

#### Abstract

Step-grow polymers had already found wide applications in medical technologies, including polyester and polyurethane blood vessel prosthesis, biodegradable scaffolds for tissue engineering and different medical devices. Division of Biomaterials and Microbiological Technologies is specialized in synthesis of various segmented polymers (co- and terpolyester-type thermoplastic elastomers) with the use of dimerized fatty acids, a bio-based components giving unique properties to the materials (including high biocompatibility in vitro and in vivo). These materials can successfully be modified with various bioactive agents to achieve functional (e.i. antibacterial) multiblock copolymers and terpolymers. Another type of modification toward biofunctional and bioactive materials is currently realized as injectable photo-crosslinkable systems based on polyurethane chemistry. Important and cutting-edge direction is development of polymer-matrix nanocomposites by in situ polycondensation. With this method, different polymer/ceramic systems are prepared at very low loading (below 0.5wt%) of nanoparticles. Polyester matrices containing TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> or hydroxyapatite nanoparticles showed significant improvement of mechanical properties as compared to the neat material. Furthermore, they showed favorable bioactive behavior in contact with living cells since nanometre range features were able to mimic those found in the natural extracellular environment, thus making such nanocomposites suitable as supports for cell delivery and tissue remodeling [1]. Recent findings on neo-bone formation upon exposure of periosteum to nanocomposite material, opens the door for in vivo synthesis of bone [2], and presumably, other type of tissue and organs.

Keywords: polymeric implants, injectable systems, artificial organs

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 253]

# References

[2]. El Fray M., Adv. Eng. Mater.-Biomaterials, 2009, DOI: 10.1002/ adem.200800333

#### • • • • • • • • • • • • • • • • • •

254

# BIOACTIVE CARBON-METAL COATINGS FOR MEDICAL APPLICATIONS

Boguslaw Rajchel<sup>1</sup>, Jadwiga Kwiatkowska<sup>1</sup>, Ireneusz Kotela<sup>2</sup>, Wojciech Rajchel<sup>3</sup>, Marcin Rajchel<sup>3</sup>, Jacek Rońda<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The Henryk Niewodniczański Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Sciences,

152 RADZIKOWSKIEGO STR., 31-342 CRACOW, POLAND <sup>2</sup>ORTHOPAEDICS AND TRAUMA DIVISION OF THE REGIONAL ST. LUCAS HOSPITAL,

178A LWOWSKA STR., 33-100 TARNOW, POLAND

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

30 MICKIEWICZ AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

The mechanical, chemical and biological properties of prostheses can be modified by thin coatings. Presently, carbon based coatings are often applied mainly to improve mechanical properties of the covered parts of the artificial prostheses. Particularly useful mechanical properties (such as good adhesion, high hardness, elasticity, etc.) are obtained when the coatings are formed by ion techniques such as the IBSD – Ion Beam Sputter Deposition and IBAD – Ion Beam Assisted Deposition.

The chemical and biological properties of carbon coatings can be modified by metallic additives. In the ion-based techniques the metallic additives can be introduced into the coating in a few ways: by ion implantation of the chosen metal into the carbon substrate, by the IBAD technique working with two beams in the dual beam mode, or by using a complex sputtered target, composed of carbon and the selected metal. The final properties of the complex carbon – metal coating are related to the method used for its formation.

In this work carbon–Ti and carbon–Ag coatings were investigated. All the coatings were formed by the IBSD or by DB IBAD techniques on UHMWPE and PU substrates. For each type of coatings the depth composition, chemical bonds and mechanical properties were determined. The morphology and thermal stability of the carbon–metal coatings were investigated mainly by the confocal dispersive Raman microspectrometry.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 254]

# Acknowledgements

This work was partly support by grants: "New generation of titanium biomaterials" no. ERA-MNT/90/2006 (117/ERA/2001/02/02), "Polish Artificial Heart" coordinator: Foundation of Cardiac Surgery Development, "Nanotechnology of complex coatings for special medical and industrial application" no. SPO WKP\_ 1/1.4.3/1/2004/90/90/186 and by project "Design of prototype machine for modification of medical implant surfaces by IBAD-PLD technique" no. R0301402 Ministry of Science and Higher Education

. . . . . . . . . . . . . . . .

# BIOFILM FORMATION UNDER ANAEROBIC CONDITIONS ON BIOMATERIAL'S SURFACE

W.Jakubowski<sup>1\*</sup>, T.Biela<sup>1</sup>, M.Kamińska<sup>1</sup>, M.Walkowiak-Przybyło<sup>1</sup>, B.Walkowiak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, <sup>2</sup>DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, LODZ, POLAND \*MAILTOL: JAKUBO@P.LODZ.PL

# Abstract

Investigations of the biofilm formation processes on biomaterials surfaces are focused on typical physiologic conditions - aerobic condition. In experimental works onto model strains, and also in the clinical reports there is a lack of the information related to the mechanisms engaged in biofilm grown under conditions of limited access to oxygen or in entirely anaerobic environment.

Presented results show the colonization of medical steel 316L surface and creation of biofilm structures by E. coli bacteria's, under oxygen deficit conditions or its total lack. In studied arrangement the change of the dynamics of bacterium growth was observed, which led to considerable slowdown of the biofilm development. Bacteria were observed with use of the combination of fluorescent dyes bis-benzimide and propidium iodide - which makes it possible the distinction of live/death bacteria. In oxygen deficiency and in anaerobic conditions multiplication of death bacteria level in comparison to standard conditions was observed (suitably 34% and 41% dead cells, oxygenic conditions - 1%). The limitation of oxygen utilization possibility by the bacteria, which colonized investigated surfaces also resulted in decreased sizes reached by the cells.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 254]

•••••

# POLY(BUTYLENE SUCCINATE) MODIFIED BY DIMERIZED FATTY ACID FOR MEDICAL APPLICATION

#### AGNIESZKA KOZŁOWSKA\*, MIROSŁAWA EL FRAY

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY IN SZCZECIN, POLYMER INSTITUTE,

DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, 10 PULASKI STR., 70-322 SZCZECIN, POLAND \*MAILTO: AGAK@ZUT.EDU.PL

#### Abstract

The synthesis method, characterization and preliminary degradation studies of novel aliphatic polyesters based on dimerized fatty acid were presented. Hydrogenated dilinoleic acid, succinic acid and 1,4butanediol were used for the synthesis. Preliminary results on selected properties as well as on hydrolytic degradation were discussed.

Keywords: aliphatic polyesters, poly(butylene succinate), hydrolytic degradation, dimerized fatty acid [Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 255-256]

### Introduction

BIONOLLE is commercially available biodegradable aliphatic polyester – poly(butylene succinate) (PBS) – with excellent characteristics such as good strength, toughness, processability and versatile commercial applications mainly as packaging material and for medical applications. Annual production of this polymer exceeds 3000 tons/year. However, there are many technical problems to be overcome before a full potential of this polymer can be realized and exapanded to other applications, e.g. pressure sensitive adhesives, aqueous emulsions, coating to name just a few. For example, the elastic properties and biodegradation characteristics must be improved [1-3].

In general, the degradability of aliphatic polyesters depends mainly on their chemical structure and especially on the hydrolysable ester bonds in the main chain, which are susceptible to hydrolysis and microbial attack. Other factors, such as molecular weight, degree of crystallinity, stereoregularity and morphology also affect the rate of

No	Segment con- tent			<b>F</b> 3	Ŧ	Ŧ	لہ
	PBS	DLA	DPPBS	[໗]	m1	I <sub>m2</sub>	a
	(w <sub>h</sub> )	(w <sub>s</sub> )					
1	100	0	192	0,861	113	115	1,431
2	70	30	9,3	0,879	107	110	1,324
3	60	40	6,0	0,910	102	107	1,245
4	50	50	4,0	0,816	97	102	1,231

w<sub>s</sub>-content of DLA (dimerized fatty acid – saturated dilinoleic acid) soft segments, wt.-%

 $\mathsf{w}_{\mathsf{h}}\text{-}\mathsf{content}$  of PBS (polybutylene succinate) hard segments, wt.-%

DP<sub>PBS</sub>-degree of polymerisation of PBS hard segments

[\eta]-limiting viscosity number (in chloroform at 25°C), dl g $^1$   $T_{m1}, T_{m2}$ -melting point temperatures from Boetius apparatus, °C

d-density by picnometric method, g cm<sup>-3</sup>

TABLE 1. Composition and selected properties ofsynthesized materials.

polymer biodegradation [4].

To tailor the degradation characteristics of PBS, different modifications can be made, including copolymers. Thus, novel aliphatic copolyesters - multiblock thermoplastic elastomers - composed of poly(butylene succinate) (PBS) as hard segment and soft sequences containing flexible chains of butylene ester of dimerized fatty acid (saturated dilinoleic acid – DLA) were synthesized and some of their properties are discussed in this paper.

### **Experimental and methods**

The synthesis method of polyesters, involving esterification and polycondensation from the melt, was described in previous publication [5]. Syntheses gave a series of PBS/ DLA copolymers with variable hard/soft segments composition and selected properties from "pure" PBS – 100/0 to 50/50 copolymer as is presented in TABLE 1.

Differential scanning calorimetry (DSC) scans were performed with a TA Instruments (DSC-910) apparatus. The samples were dried in vacuum at 60°C, and then kept in a desiccator. The process was carried out in a triple cycle: first heating, then cooling, and second heating in the temperature range from  $-100^{\circ}$ C to  $50^{\circ}$ C higher than melting point of each copolymer. The rate of heating and cooling was  $10^{\circ}$ C min<sup>-1</sup>.

The tensile data were collected at room temperature with an Instron TM-M tensile tester equipped with a 500N load cell employing a crosshead speed of 100mm/min. The starting clamp distance was 25mm. The obtained results were averaged from 6 specimens with cross section of 0.5×4 mm.

Hydrolytic degradation test of incubated thin polymer films was carried out during 4 weeks in three types of solutions: alkaline, neutral and acidic in buffers (pH=9, pH=7,2 and pH=5) at 37°C. The mass loss of the polymer samples was



FIG.1 DSC scans from cooling and heating runs for PBS/DLA copolymers.

256

determined by comparing the dry weight ( $m_d$ ) after hydrolysis with the initial weight ( $m_0$ ) according to eq 1. The samples were dried for 2 weeks at reduced pressure before determination of the dry weight.

$$\Delta m_d = \frac{m_0 - m_d}{m_o} \times 100 \tag{1}$$

### **Results and discussion**

Differential scanning calorimetry was carried out in a triple cycle heating/cooling/heating. Reported results collected from 2nd heating and cooling (FIG.1) clearly show that synthesised copolymers exhibit two main transition temperatures; low-temperature glass transition attributed to the soft block and high-temperature melting transition attributed to the hard block. At the same time, we can observe well-defined crystallization temperatures of hard segments. The thermograms of copolyesters show the occurrence of glass transitions in low temperature range from -61 to -37°C attributed to the amorphous soft phase. The observed Tg glass transition temperature shift corresponds well with the increase of the soft segments concentration. The endotherms occurred on the DSC curves in the range from 91 to 115°C, can be related to the melting transition of poly(butylene succinate) (PBS) hard domain (T<sub>m</sub>). The



FIG.2. Stress-strain behaviour of PBS/DLA copolymers before and after degradation.



FIG.3. Mass loss of PBS/DLA copolymers after 2 and 4 weeks degradation.

maxima decrease and flatten along with the decrease of PBS sequence length. The crystallization transition of hard segments appears in all prepared polymers and similarly to melting endotherms, crystallization exoterms decrease with the decrease of PBS sequence length. The Tm melting temperature of hard domains as well as Tc crystallization temperature of hard segments decrease systematically with the decrease of PBS sequence length (respectively from 115 to 91 and from 65 to 28°C).

The tensile properties of investigated copolymers as typical stress-strain curves before and after degradation are shown in FIGURE 2. For samples before degradation, the highest strain was observed at about 40 % soft segment content. It is worth noting that this behaviour is similar to changes of the elongation for the majority of the multiblock thermoplastic elastomers [6]. After degradation (4 weeks in buffer (pH=7,2) at 37°C) we can observe decreasing of strain for copolymers with increasing soft segment content, while "pure" PBS keeps almost the same mechanical properties. This phenomenon suggests that the most changes occur in amorphous phase.

The mass loss for the different three kind of buffers (pH=9, pH=7,2 and pH=5) at 37°C after hydrolysis is shown in FI-GURE 3. It can be seen that synthesized polymers shows weight loss during incubation time. Copolymer composition influenced the mass loss while the influence of solution type was not so significant. As it was expected, poly(butylene succinate) degrades slower as compared to copolymers with dimerized fatty acid.

#### Conclusions

In discussed paper, the results of preliminary hydrolytic degradation of degradable aliphatic copolyesters based on dimerized fatty acid (saturated dilinoleic acid), succinic acid and 1,4-butanediol were reported. Synthesized polymers are characterized by moderate melting temperatures. Introduction of dimerized fatty acid moieties decreases melting and crystallization temperature. The tensile properties (stress-strain curves) confirmed typical thermoplastic elastomer behaviour of the copolyesters. Synthesised polymers are susceptible to hydrolytic degradation as demonstrated by decrease of mechanical properties and mass loss.

#### References

[1]. Kim M., Kim K., Jin H., Park J., Yoon J., Eur Polym J, Vol: 37, (2001), 1843-1847

[2]. Jin H., Lee B., Kim M., Yoon J., J Appl Polym Sci, Vol: 38, (2000), 1504-1511

[3]. Müller, R. J., Kleeberg I. Deckwer W.D. Journal of Biotechnology Vol: 86, 2001, 87 - 95

[4]. Fujimaki T., Polym Degrad Stab Vol: 59, Issue: 1-3, 1998, 209-214

[5]. Kozlowska A., Gromadzki D., Štěpánek P., El Fray M., Fibres & Textiles in Eastern Europe 2008, 6 (71), 85-88

[6]. J. Slonecki, "Structure and some properties of copoly(esterether)", Sci. Papers of Technical University of Szczecin 1992, 479

•••••

# INFLUENCE OF SURFACE (NANO)ROUGHNESS ON CELL BEHAVIOUR

#### AGNIESZKA PIEGAT, MIROSŁAWA EL FRAY\*

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY IN SZCZECIN, POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES,

10 Pulaski syt., 70-322 Szczecin, Poland MAILTOL: mirfray@zut.edu.pl

# Abstract

The influence of surface (nano)roughness of soft elastomeric materials containing nanocrystalline TiO2 on tissue cell behaviour after implantation tests was investigated. Addition of small amount (0.2wt.%) of  $TiO_2$  into polymer matrix changed surface roughness giving material of well developed lamellar morphology and slightly diminished contact angle (wettability). This lamellar (fibrilar) morphology had strong influence on cell response after implantation into soft tissue indicating the absence of eosynophiles in tissue around implant.

key words: nanocomposites; AFM, cantact angle, cell/tissue response

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 257-258]

# Introduction

Biomaterial characterization in term of its biofunctionality must include such properties as mechanical stability, chemical structure, morphology, degradation profile and chemical character of the surface [1]. All these parameters and their interactions with biological system decide about the functionality and possibility of such materials to be used in specific applications. From the biological point of view, surface properties such as hydrophobicity/hydrophilicity, wettability, roughness and topography plays crucial role in cells and tissues response [2].

Information about surface properties can be obtained using microscopic, spectroscopic or thermodynamic methods, depending from the requirements [3]. The goal of this study was to characterize the surface properties of polymeric nanocomposite films. Their contact angles, roughness and morphology and has been measured and analyzed with respect to cellular response after implantation test.

# Experimental

#### **Materials**

PET/DLA (poly(ethylene terephthalate)/dilinoleic acid) multiblock copolymers was prepared as the neat material at hard/soft segments weight ratio as 30/70wt%. Then, by adding 0.2wt% nanocrystalline TiO<sub>2</sub> during the synthesis step, PET/DLA-based nanocomposite was prepared as described in the authors' previous work [4]. Thin films (60-160nm thickness) were obtained from polymers solution in chloroform by spin-coating on glass substrates (cover glasses  $\phi$ =18mm).

#### Morphology

AFM measurements were performed on the Nanoscope IV A (Veeco/Digital Instruments) AFM in tapping mode. The AFM was equipped with a dimension scanner - maximum scan size of 150x150µm.

#### **Contact angle**

Contact angles measurements were carried out on spincoated samples using drop technique on a DataPhysisc, Contact Angle System OCA. During each measurement on the instrument, 15 points were collected from each polymer (three samples from each composition at 5 points). The contact angle was measured with ultra pure distilled water.

#### Implantation test

Implantation test was performed according procedure described in details in [5]. Briefly, the PET/DLA and PET/DLA–0.2%TiO<sub>2</sub> used were small polymer rods, 10 to 12mm long, 3 to 5mm wide and 0.6 to 0.8mm thick. Polymer rods were implanted into the muscles of 30 Wistar rats weighing 200–220g. Animal observations were performed for 12 weeks and sacrificed with sodium pentobarbital in the amount 200mg (kg b.w.). The structure of histological slides was analyzed following the preparation of tissues with implanted polymers.

# **Results and discussion**

Addition of nanoparticles into polymer matrix is a simple method for modification of surface as well as bulk properties of polymeric materials. Depending from the particles character, they can act as osteoinductive or antimicrobial agents, or controlled drug delivery systems [6-8]. Song et al. [9] showed that new type of nanocomposite material, prepared by blending  $TiO_2$  nanoparticles with PNIPAM-co-PS electrospinned fibers may find some new applications in field of bioanalysis or as directed drug carriers. El Fray and Piegat [4,10] showed that addition of small amount of  $TiO_2$  into thermoplastic elastomer matrix is easy way to control mechanical behavior and susceptibility to degradation of this type of materials.



FIG.1. Morphology by AFM at  $1x1\mu m^2$  for a spin-coated PET/DLA sample (a,b): a) height image, b) phase image; c,d) PET/DLA 0,2wt% TiO<sub>2</sub> : c) height image, d) phase image.



FIG.2. AFM 3D images for neat PET/DLA copolymer (a) and for nanocomposite containing 0,2wt% TiO<sub>2</sub> (c) and corresponding contact angles PET/DLA (b), nanocomposite (d).

The morphology of the neat PET/DLA and nanocomposite containing TiO<sub>2</sub> was studied by AFM. In FIG.1, morphology (a) and phase images (b) of the neat PET/DLA and the same images for PET/DLA 0,2 wt% TiO<sub>2</sub> (FIG.1 c,d) are presented. The AFM pictures (especially phase images) showed well defined morphology (lamellar structure) of hard PET segments embedded in a soft amorphous matrix (DLA). The spin-coated samples showed lamellar morphology for both polymeric systems, however neat PET/DLA copolymer showed finer and shorter lamella compared to material containing TiO<sub>2</sub>. Addition of nanoparticles led to formation of longer and thicker lamella (FIG.1d) and some spherulitic structures were also observed.

Differences in height images correspond to 3D surface images for the same samples are presented in FIG.2. Surface of the nanocomposite is rougher than for the neat copolymer, what can be related to presence of  $\text{TiO}_2$  particles. Similar observations were described by the authors in their previous work [11] in case of melt-pressed samples, where rms parameter was significantly higher for PET/DLA with 0,2wt% nanocrystalline TiO<sub>2</sub>.

Despite of apparent differences in morphology of spincoated polymers, measurements of contact angles showed rather similar values for both systems, with slightly lower values for  $TiO_2$  containing material. More distinct differences are not observed probably due to the fact that  $TiO_2$  nanoparticles are covered by thin polymer layer and therefore surface hydrophilic/hydrophobic characteristic is so similar despite of strongly hydrophilic character of  $TiO_2$ .

Well developed surface morphology for  $TiO_2$  containing material as well as slightly diminished hydrophobicity was correlated with cellular tissue response after implantation test [5]. It is important to notice that no eosynophiles were present in a capsule around elastomer containing  $TiO_2$ nanoparticles thus indicating that surface nano-roughness play an important role in cell/tissue response.

### Conclusions

We demonstrated that well developed surface nano-topography in thermoplastic elastomer-based nanocomposites plays an important role in cellular response after soft tissue implantation test. It can be concluded that presence of lamellar structures in  $TiO_2$  containing materials contributed to formation of thin fibrillar tissue capsule where no eosinophiles were detected.

#### Acknowledgements

Financial support from the doctoral grant N N209 150636 is acknowledged.

# References

 Reis R.L., San Roman J., Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine, CRC Press, 2005
 Douglas W. Hamilton, Babak Chehroudi, Donald M. Brunette,

Biomaterials 28 (2007) 2281–2293 [3] Merrett K., Cornelius R.M., McClung W.G., Unsworth L.D., Sheardown H., J Biomater Sci Polymer Edn 13 (2002) 593-621

[4] M. El Fray, A. R. Boccaccini: Mater. Lett., 2005, 59, 2300– 2304

[5] M. El Fray, A.Piegat, P.Prowans, Adv Eng Mater 2009, 21, 1-4
[6] H.S. Mansur, H.S. Costa, Chem Eng J, 2008, 137, 72-83
[7] X. Xu, M. Zhou, Fibres and Polymers, 2008, 9, 685-690

[8] N.S. Satarkar, J. Zach Hilt, Acta Biomaterialia, 2008, 4, 11-16
 [9] M. Song, C. Pan, J. Li, R. Zhang, X. Wang, Z. Gu, Talanta 75 (2008), 1035-1040

[10] A. Piegat, M. El Fray, Biodegradation of polyester nanocomposites, "(Bio)degradable polymers from renewable resources", Vienna, 18-21 November 2007, p.34

[11] A. Piegat, M. El Fray, H. Jawad, Q.Z. Chen, A.R. Boccaccini, Adv App Ceramic, 2008, 107, 287-292

•••••

# COMBINATORIAL DISCOVERY APPROACHES ACCELERATE THE DEVELOPMENT OF BIORESORBABLE MEDICAL IMPLANTS

JOACHIM KOHN

New Jersey Center for Biomaterials, Rutgers University, Piscataway, New Jersey (USA)

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 259-260]

### Introduction

Within the overall development path, from design to FDA clearance of the device, the initial selection of the best biomaterial for the intended application is critical and often determines the early success or failure of the R&D effort. Our work addresses this key step by providing the "combinatorial-computational method" (CCM) which facilitates the rapid and rational selection of a small number of lead biomaterials for further consideration.

The CCM uses parallel synthesis of polymer libraries, rapid screening and characterization, and computational modeling of cell-biomaterial interactions to identify promising lead polymers for use in the design of specific medical implants. The CCM reduces the cost and risk associated with early prototype development. The effectiveness of the CCM as a new biomaterials discovery paradigm has been demonstrated in two R&D projects: A drug eluting hernia repair device, and a fully resorbable coronary stent. An additional example of using the CCM is our ongoing work on the development of an ophthalmic controlled release device for peptides.

#### Methods

The CCM is schematically depicted in FIGURE 1. Briefly, a materials need is identified and a set of property requirements is established. Using intuition and knowledge, chemists design a library of polymers of significant size, containing hundreds or even thousands of individual polymer compositions. A representative subset of "examples" of polymers are synthesized using an automated, parallel synthesis robot. The subset of polymers is now characterized, using physical measurements such as glass transition temperature, surface protein adsorption, or cell attachment and cell growth on flat polymer films. These data are augmented by thousands of computed "property descriptors" using commercially available software packages. Next, a computational model is developed that attempts to correlate polymer structure with polymer properties in such a way that specific polymer properties of every member of the entire library can be predicted with reasonable accuracy. After a suitable validation step, the results of the model are used to discover lead polymers among the entire library that match the originally identified material requirements as closely as possible. The CCM is described in more detail in several published references [1-4].

# **Results and discussion**

FIGURE 2 illustrates several commercial biomaterials project that are based on libraries of tyrosine-derived polymers [5].

The library of tyrosine-derived polyarylates was the first biomaterials library to be developed [6].

Originally, it contained 114 individual polymers encompassing a series of polymers with increasing hydrophobic character. The library of tyrosine-derived polycarbonates is substantially larger (approximately 10,000 individual polymer compositions, encompassing materials with an exceptionally wide range of material properties).

An interesting result was obtained when manual and automated polymer synthesis were compared. The need to synthesize about hundred different polymers in order to obtain a representative subset of polymers of a larger library stimulated a search for ways to reduce the time and cost of polymer synthesis. In our hands, the ain obstacles of automated parallel polymer synthesis were (i) the need to transform manual synthetic recipes into automatic work flows, and (ii) the need to overcome the limitations of commercially available synthetic workstations which are designed for small molecule work and not for polymer synthesis. We found that automatic synthesis requires a substantial "up-front investment of time and effort". However, once this hurdle had been overcome, automatic synthesis



FIGURE 1: Schematic overview of the work flow associated with the combinatorial-computational method (CCM). The experimental validation step can have three outcomes: The model made sufficiently accurate predictions and a suitable material was discovered, the model requires iterative improvement, or the model failed requiring the design of a different library of polymers. FIGURE 2: Images of commercial products based on tyrosine-derived polymer libraries. From the top left corner in clockwise direction: Hernia repair device, antibiotic sleeve for cardiac assist devices, coronary stent, ophthalmic drug delivery implant, different bone regeneration scaffolds, and a bone fixation screw.

provided time and cost savings that increased sharply with the number of polymers synthesized [7].

Once hundreds of polymers have been synthesized and worked up, the next major task is to characterize their physicomechanical or biological properties. While a number of high-throughput methods exist for the exploration of physicomechanical properties, we could not find any highthroughput methodologies for the exploration of biological polymer properties such as protein adsorption, cell attachment, or cell growth on flat polymer films within a given tissue culture medium. Over the last few years, we developed several such methods, including a high throughput assay for protein adsorption,8 bioactive surface gradients to control cell adhesion [9], high-content imaging techniques to characterize cell responses on polymeric substrates [10], and the development of combinatorial polymer scaffold libraries for the screening of cell-biomaterial interactions in 3D [11].

# Conclusion

The fields of Tissue Engineering and Regenerative Medicine require tissue scaffolds that are made of degradable biomaterials that can induce specific cellular responses. Examples of such specific cell responses are the growth of selected cell types, the differentiation of stem cells along a predetermined lineage, or the absence of any cell attachment when non-adhesive surfaces are needed. To create such tissue scaffolds, a new generation of bioactive biomaterials is required. Progress in discovering such materials has been slow - probably because of the complex interactions between material composition, surface properties, protein adsorption, and cellular responses. The combinatorial-computational method offers a framework for the rapid optimization of new biomaterials for specific applications. So far, this method has been used in several commercial biomaterials development projects and has resulted in the introduction of novel polymeric biomaterials into clinical use.

### References

[1]. Kholodovych V, Gubskaya AV, Bohrer M, Harris N, Knight D, Kohn J, Welsh WJ. Prediction of biological response for large combinatorial libraries of biodegradable polymers: polymethacrylates as a test case. Polymer 2008;49:2435-2439.

[2]. Kohn J, Welsh WJ, Knight D. A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials. Biomaterials 2007;28:4171-4177.

[3]. Gubskaya AV, Kholodovych V, Knight D, Kohn J, Welsh WJ. Prediction of fibrinogen adsorption for biodegradable polymers: Integration of molecular dynamics and surrogate modeling. Polymer 2007;48:5788-5801.

[4]. Smith JR, Kholodovych V, Knight D, Welsh WJ, Kohn J. QSAR models for the analysis of bioresponse data from combinatorial libraries of polymers. QSAR Comb. Sci. 2005;24:99-113.

[5]. Bourke SL, Kohn J. Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: Polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethyleneglycol). Adv. Drug Del. Rev. 2003;55(4):447-466.

[6]. Brocchini S, James K, Tangpasuthadol V, Kohn J. A combinatorial approach for polymer design. J. Amer. Chem. Soc. 1997;119(19):4553-4554.

[7]. Rojas R, Harris NK, Piotrowska K, Kohn J. Evaluation of automated synthesis for chain and step-growth polymerizations: Can robots replace the chemists. J Polym Sci: Part A: Polym Chem 2009;47(1):49-58.

[8]. Weber N, Bolikal D, Bourke S, Kohn J. A new method for rapid screening of adsorbed proteins and attached cells on multiple polymers. 2003 April 30 - May 3, 2003; Reno, Nevada. Society for Biomaterials. p 28.

[9]. Becker ML, Gallant N, Henderson L, Amis EJ. Bioactive surface gradients to control cell adhesion. Polym. Preprints 2005;46(2):1214.

[10]. Liu E, Treiser MD, Patel H, Sung H-J, Roskov KE, Kohn J, Becker ML, Moghe PV. High-content profiling of cell responsiveness to graded substrates based on combinatorially variant polymers. Comb. Chem. High Throughput Screen. 2009;12:646-655.

[11]. Yang Y, Bolikal D, Becker ML, Kohn J, Simon CG. Combinatorial polymer scaffold libraries for screening cell-biomaterial interactions in 3D. Adv. Mater. 2008;20:2037-2043.

• • • • • • • • • • • • • • • • •