

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

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

**Number 109-111**

**Special Issue**

Numer 109-111

Numer Specjalny

**Volume XIV**

Rok XIV

**DECEMBER 2011**

GRUDZIEŃ 2011

**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**

**Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF**

**EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST**

**30/A3, Mickiewicz Av.**

**30-059 Krakow, Poland**

Akademia

Górniczno-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

**Issue: 200 copies**

Nakład: 200 egz.

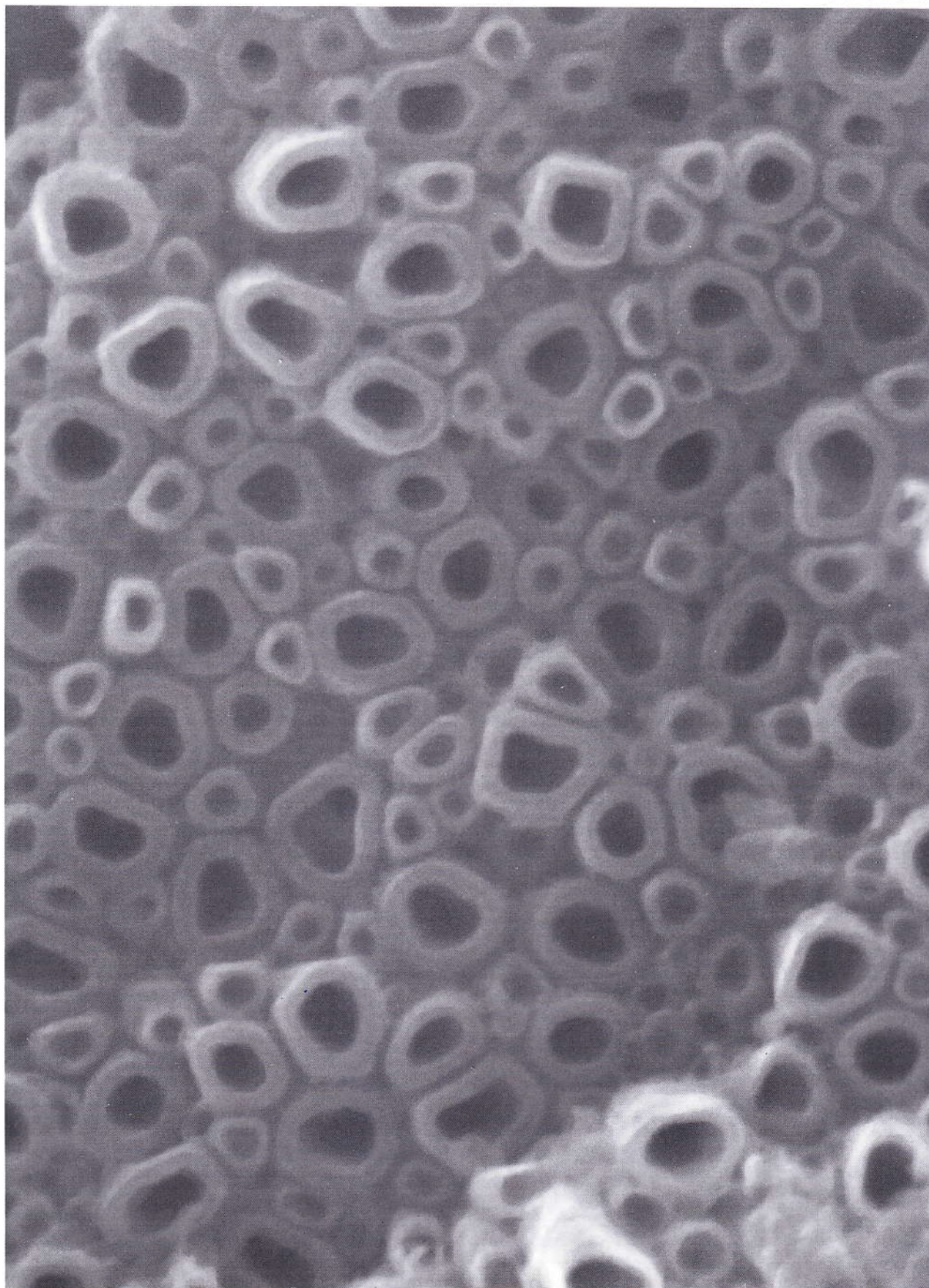
**Scientific Publishing**

**House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe

AKAPIT

e-mail: [wn@akapit.krakow.pl](mailto:wn@akapit.krakow.pl)



INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD  
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

**Iulian Antoniac**

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

**Lucie Bacakova**

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

**Romuald Będziński**

POLITECHNIKA WROCLAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Marta Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Stanisław Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Maria Borczuch-Łączka**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Wojciech Chrzanowski**

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

**Tadeusz Cieślik**

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

**Jan Ryszard Dąbrowski**

POLITECHNIKA BIALOSTOCKA / BIALYSTOK 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 Maria 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, UNITED KINGDOM

**Stanisław Mitura**

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

**Roman Pampuch**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Stanisław Pielka**

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCLAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

**Vehid Salih**

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

**Jacek Składzień**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW

**Andrei V. Stanishevsky**

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

**Anna Ślósarczyk**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Tadeusz Trzaska**

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

**Dimitris Tsipas**

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## SPIS TREŚCI

NANOPARTICLES, NANOFIBRES AND THEIR COMBINATIONS IN BONE TISSUE ENGINEERING – A REVIEW L. BACA KOVA	4
POLYMER CARRIERS MODIFIED BY PLASMA AND FUNCTIONALIZED WITH Au NANOPARTICLES AS SUBSTRATES FOR MOUSE 3T3 FIBROBLASTS M. BACA KOVA, Z. MAKAJOVA, N. SLEPICKOVA-KASALKOVA, V. SVORCIK, L. BACA KOVA	5
PROCESSES OF LIPIDS PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ORAL FLUID FOR PATIENTS WITH ACUTE ODONTOGENIC OSTEOMIEELITIS COMPLICATED WITH PHLEGMONS OF DIFFERENT LOCATION I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, A.A. KABANOVA.	6
STERILIZATION DECOMPOSITION EVALUATION OF COMPOSITE MATERIALS BASED ON CARBON FIBERS FOR USE IN MEDICINE R. SEDLÁČEK, T. SUCHÝ, K. BALÍK, M. SOCHOR, Z. SUCHARDA	9
ADHESION AND GROWTH OF HUMAN OSTEObLAST-LIKE MG 63 CELLS ON TITANIUM AND STAINLESS STEEL SAMPLES DEVELOPED FOR CONSTRUCTING BONE IMPLANTS L. STRANAVOVA, M. BACA KOVA, L. BACA KOVA, J. FENCL	10
BIOAPATITE MADE FROM CHICKEN FEMUR BONE M. ŠUPOVÁ, G. SIMHA MARTYNKOVÁ, Z. SUCHARDA, T. SUCHÝ	11
RESULTS FOR MODERN BANDAGING MATERIALS APPLICATION IN ALVEOLITIS TREATMENT T.L. SHEVELA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, E.Y. GROSHEV	13
ELEKTROCHEMICALNA ODPORNOŚĆ KOROZYJNA STOPÓW NiTi B. ŁOSIEWICZ, Z. LEKSTON, M. FREITAG, T. WIERZCHOŃ, J. LELĄTKO	15
POLIMEROWE MATRYCE JAKO NOŚNIKI DO MIEJSCOWEGO UWALNIANIA DOKSYCYKLINY W LECZENIU CHORO B PRZYŻĘBIA A. KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK, P. DOBRZYŃSKI, M. JAWORSKA-KIK	17

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

## CONTENTS

NANOPARTICLES, NANOFIBRES AND THEIR COMBINATIONS IN BONE TISSUE ENGINEERING – A REVIEW L. BACA KOVA	4
POLYMER CARRIERS MODIFIED BY PLASMA AND FUNCTIONALIZED WITH Au NANOPARTICLES AS SUBSTRATES FOR MOUSE 3T3 FIBROBLASTS M. BACA KOVA, Z. MAKAJOVA, N. SLEPICKOVA-KASALKOVA, V. SVORCIK, L. BACA KOVA	5
PROCESSES OF LIPIDS PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ORAL FLUID FOR PATIENTS WITH ACUTE ODONTOGENIC OSTEOMIEELITIS COMPLICATED WITH PHLEGMONS OF DIFFERENT LOCATION I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, A.A. KABANOVA.	6
STERILIZATION DECOMPOSITION EVALUATION OF COMPOSITE MATERIALS BASED ON CARBON FIBERS FOR USE IN MEDICINE R. SEDLÁČEK, T. SUCHÝ, K. BALÍK, M. SOCHOR, Z. SUCHARDA	9
ADHESION AND GROWTH OF HUMAN OSTEObLAST-LIKE MG 63 CELLS ON TITANIUM AND STAINLESS STEEL SAMPLES DEVELOPED FOR CONSTRUCTING BONE IMPLANTS L. STRANAVOVA, M. BACA KOVA, L. BACA KOVA, J. FENCL	10
BIOAPATITE MADE FROM CHICKEN FEMUR BONE M. ŠUPOVÁ, G. SIMHA MARTYNKOVÁ, Z. SUCHARDA, T. SUCHÝ	11
RESULTS FOR MODERN BANDAGING MATERIALS APPLICATION IN ALVEOLITIS TREATMENT T. L.SHEVELA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, E.Y. GROSHEV	13
ELECTROCHEMICAL CORROSION RESISTANCE OF NiTi ALLOYS B. ŁOSIEWICZ, Z. LEKSTON, M. FREITAG, T. WIERZCHOŃ, J. LELĄTKO	15
POLYMERIC MATRICES AS CARRIERS FOR LOCAL DOXYCYCLINE DELIVERY DEDICATED FOR PERIODONTAL PURPOSES A. KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK, P. DOBRZYŃSKI, M. JAWORSKA-KIK	17

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

**OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI POROWATYCH TRÓJWYMIAROWYCH SKAFOLDÓW KOLAGENOWYCH** 22

I. KOZŁOWSKA, A. SIONKOWSKA

**WŁAŚCIWOŚCI KOLAGENU WYIZOLOWANEGO Z ŁUSEK RYB Z GATUNKU *ESOX LUCIUS*** 26

J. KOZŁOWSKA, A. SIONKOWSKA

**MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWYCH BIOMATERIAŁÓW Z FIBROINY JEDWABIU** 27

A. PŁANECKA, A. SIONKOWSKA, P. SZARSZEWSKA

**WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE I TERMICZNE MIESZANIN POLI(ALKOHOLU WINYLOWEGO) I ELASTYNY** 29

J. SKOPINSKA-WISNIEWSKA, A. SIONKOWSKA, A. WIECZOREK, J. KOZŁOWSKA, A. PŁANECKA

**MATERIAŁY WYKAZUJĄCE ZJAWISKA PAMIĘCI KSZTAŁTU** 32

D. STRÓŻ

**OCENA TROMBOGENNOŚCI POWIERZCHNI POLEROWANEGO STOPU TYTANU Ti6Al7Nb MODYFIKOWANEGO CIENKĄ WARSTWĄ FOSFORANU WAPNIA** 37

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO, W. OKRÓJ, M. WALCZYŃSKA, P. SKWIERCZYŃSKI, B. WALKOWIAK

**COMPUTER AIDED EVALUATION OF POROACCESSIBILITY OF POROUS COATINGS OUTER LAYER OF INTRA-OSSEOUS IMPLANTS** 42

R. UKLEJEWSKI, M. WINIECKI, W. RADOMSKI

**VIBRATIONAL SPECTROSCOPY INVESTIGATION OF MONTMORILLONITE - CHITOSANE NANOCOMPOSITE MATERIALS** 44

C. PALUSZKIEWICZ, E. STODOLAK

**TRIBOLOGICAL INVESTIGATIONS OF MATERIALS USED FOR SPINE DISC IMPLANTS** 45

M. GIERZYŃSKA-DOLNA, M. LIJEWSKI, T. WIŚNIEWSKI, J. MAGDA

**INFLUENCE OF HIP ENDOPROSTHESES IMPLANTATION ERROR ON IMPLANTS WEAR** 46

W. WOŹNIAK, M. LIJEWSKI, A. MRÓZ, M. GIERZYŃSKA-DOLNA

**MODYFIKACJA POWIERZCHNI STOPÓW NiTi** 47

M. FREITAG, J. LELAŃKO, B. ŁOSIEWICZ, T. WIERZCHOŃ, T. GORYCZKA

**BADANIA DOŚWIADCZALNE NOWEJ GENERACJI STABILIZATORÓW PŁYTKOWYCH PRZEZNACZONYCH DO LECZENIA ZNIEKSZTAŁCEN PRZEDNIEJ ŚCIANY KLATKI PIERSIOWEJ** 50

A. KAJZER, W. KAJZER, J. MARCINIAK, J. DZIELICKI, I. JANICKA, W. WOLAŃSKI, B. GZIK-ZROSKA

**PREPARATION AND PROPERTIES OF A POROUS THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN SCAFFOLDS** 22

I. KOZŁOWSKA, A. SIONKOWSKA

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN FROM FISH (*ESOX LUCIUS*) SCALE** 26

J. KOZŁOWSKA, A. SIONKOWSKA

**MODIFICATION OF THE SURFACE PROPERTIES OF SILK FIBROIN BIOMATERIALS** 27

A. PŁANECKA, A. SIONKOWSKA, P. SZARSZEWSKA

**THE MECHANICAL AND THERMAL PROPERTIES OF POLY(VINYL ALCOHOL) /ELASTIN HYDROLYSATES BLENDS** 29

J. SKOPINSKA-WISNIEWSKA, A. SIONKOWSKA, A. WIECZOREK, J. KOZŁOWSKA, A. PŁANECKA

**SHAPE MEMORY MATERIALS** 32

D. STRÓŻ

**THROMBOGENICITY OF THIN LAYER CALCIUM PHOSPHATE CREATED ON POLISHED SURFACE OF Ti6Al7Nb ALLOY** 37

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO, W. OKRÓJ, M. WALCZYŃSKA, P. SKWIERCZYŃSKI, B. WALKOWIAK

**COMPUTER AIDED EVALUATION OF PORO-ACCESSIBILITY OF POROUS COATINGS OUTER LAYER OF INTRA-OSSEOUS IMPLANTS** 42

R. UKLEJEWSKI, M. WINIECKI, W. RADOMSKI

**VIBRATIONAL SPECTROSCOPY INVESTIGATION OF MONTMORILLONITE - CHITOSANE NANOCOMPOSITE MATERIALS** 44

C. PALUSZKIEWICZ, E. STODOLAK

**TRIBOLOGICAL INVESTIGATIONS OF MATERIALS USED FOR SPINE DISC IMPLANTS** 45

M. GIERZYŃSKA-DOLNA, M. LIJEWSKI, T. WIŚNIEWSKI, J. MAGDA

**INFLUENCE OF HIP ENDOPROSTHESES IMPLANTATION ERROR ON IMPLANTS WEAR** 46

W. WOŹNIAK, M. LIJEWSKI, A. MRÓZ, M. GIERZYŃSKA-DOLNA

**SURFACE MODIFICATION OF NiTi ALLOYS** 47

M. FREITAG, J. LELAŃKO, B. ŁOSIEWICZ, T. WIERZCHOŃ, T. GORYCZKA

**EXPERIMENTAL ANALYSIS OF THE NEW GENERATION PLATE STABILIZERS USED IN TREATMENT OF ANTERIOR SURFACE DEFORMITY OF CHEST** 50

A. KAJZER, W. KAJZER, J. MARCINIAK, J. DZIELICKI, I. JANICKA, W. WOLAŃSKI, B. GZIK-ZROSKA

OCENA BIOMECHANICZNA NOWEJ GENERACJI STABILIZATORÓW DO LECZENIA ZNIEKSZTAŁCENÍ PRZEDNIEJ ŚCIANY KLATKI PIERSIOWEJ W. KAJZER, A. KAJZER, J. MARCINIAK, J. DZIELICKI, I. JANICKA, W. WOLAŃSKI, B. GZIK-ZROSKA	54	BIOMECHANICAL EVALUATION OF NEW GENERATION PLATE STABILIZERS USED IN TREATMENT OF ANTERIOR SURFACE DEFORMITY OF CHEST W. KAJZER, A. KAJZER, J. MARCINIAK, J. DZIELICKI, I. JANICKA, W. WOLAŃSKI, B. GZIK-ZROSKA	54
MODYFIKACJA POWIERZCHNI STOPÓW NiTi AZOTKOWYMI LUB TLENKOWO-AZOTKOWYMI WARSTWAMI WIERZCHNIMI ZDOLNYMI DO ODKSZTAŁCENÍ J. LELAŃKO, M. FREITAG, B. ŁOSIEWICZ, T. WIERZCHOŃ, T. GORYCZKA	58	MODIFICATION OF NiTi ALLOY SURFACE BY ELASTIC NITRIDE AND OXIDE LAYERS FORMATION J. LELAŃKO, M. FREITAG, B. ŁOSIEWICZ, T. WIERZCHOŃ, T. GORYCZKA	58
IMPLANTY NiTi Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU ZASTOSOWANE W BADANIACH KLINICZNYCH Z. LEKSTON, T. GORYCZKA, H. MORAWIEC	62	NiTi SHAPE MEMORY IMPLANTS APPLIED IN CLINICAL STUDIES Z. LEKSTON, T. GORYCZKA, H. MORAWIEC	62
WYTWARZANIE NANORURKO-WYCH WARSTW TLENKOWYCH NA STOPIE TYTANU Ti13Nb13Zr A. OSSOWSKA, A. ZIELIŃSKI, M. SUPERNAK	66	PREPARATION OF NANO-TUBULAR OXIDE LAYERS ON TITANIUM ALLOY Ti13Nb13Zr A. OSSOWSKA, A. ZIELIŃSKI, M. SUPERNAK	66
BADANIA BIOAKTYWNOŚCI Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK KOŚCIOTWÓRCZYCH NA TYTANIE POKRYTYM CHITOZANEM M. SUPERNAK	69	BIOACTIVITY STUDIES USING OSTEOGENIC CELLS ON TITANIUM COATED WITH CHITOSAN M. SUPERNAK	69
THE SOFT-TISSUE RESPONSE TO IMPLANTS OF CHITOSAN FOILS Cz. PALUSZKIEWICZ, E. MENASZEK, M. ŻOLNIEREK	73	THE SOFT-TISSUE RESPONSE TO IMPLANTS OF CHITOSAN FOILS Cz. PALUSZKIEWICZ, E. MENASZEK, M. ŻOLNIEREK	73
SYNTEZA I WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI CHITOZANU MODYFIKOWANEGO KWASAMI TŁUSZCZOWYMI O POTENCJALNYM ZASTOSOWANIU JAKO PRZECIWDROBNOUSTRO-JOWE WARSTWY WIERZCHNIE NA ELASTOMERACH TERMOPLASTYCZNYCH A. NIEMCZYK, J. GAJOWY, M. EL FRAY	74	SYNTHESIS AND SELECTED PROPERTIES OF CHITOSAN MODIFIED WITH FATTY ACID AS POTENTIAL ANTIMICROBIAL COATINGS FOR POLYMERIC IMPLANTS A. NIEMCZYK, J. GAJOWY, M. EL FRAY	74
WPLYW ZAWARTOŚCI WAPNIA I FOSFORU PASZOWEGO NA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE TKANKI KOSTNEJ A. NIKODEM, Z. DOBRZAŃSKI	78	INFLUENCE OF CALCIUM CONTENT IN FEED PHOSPHATE ON MECHANICAL PROPERTIES OF BONE TISSUE A. NIKODEM, Z. DOBRZAŃSKI	78
ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI POWŁOK HAP WYTWARZANYCH METODĄ MAGNETRONOWĄ Z WYKORZYSTANIEM WYŁADOWANIA W.CZ. D. BATORY, P. SKWIERZYŃSKI, M. WITMAN, A. NIEDZIELSKA	81	ANALYSIS OF THE PROPERTIES OF HAP COATINGS PRODUCED BY RF MAGNETRON SPUTTERING D. BATORY, P. SKWIERZYŃSKI, M. WITMAN, A. NIEDZIELSKA	81
SREBRO JAKO DODATEK W ZASTOSOWANIACH BIOLOGICZNYCH D. BOCIĄGA, M. CZERNIAK-RECZULSKA	82	ADDITIONS OF SILVER IN BIOMEDICAL APPLICATION D. BOCIĄGA, M. CZERNIAK-RECZULSKA	82

## NANOPARTICLES, NANOFIBRES AND THEIR COMBINATIONS IN BONE TISSUE ENGINEERING – A REVIEW

LUCIE BACA KOVA

ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,  
INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,  
VIDENSKA 1083, PRAGUE 4-KRC, 142 20 CZECH REPUBLIC;  
E-MAIL: LUCY@BIOMED.CAS.CZ

Nanostructured materials are considered as promising scaffolds for advanced tissue engineering. The reason is that the nanostructure of a material resembles the nanoarchitecture of the natural extracellular matrix (ECM), e.g., its organization into nanofibres, nanocrystals, nano-sized folds of ECM molecules, etc. On nanostructured surfaces, the cell adhesion-mediating ECM molecules adsorb in an appropriate geometrical orientation which gives cell adhesion receptors access to specific sites in ECM molecules, such as amino acid sequences like Arg-Gly-Asp (RGD), which serve as ligands for these receptors [1-3]. In addition, these materials enhance the adsorption of vitronectin, which is recognized preferentially by osteoblasts over other cell types [1-3]. Nanostructured materials have therefore been considered as suitable particularly for bone tissue engineering.

Our studies have focused on carbon and hydroxyapatite nanoparticles as components of substrates for colonization with human bone-derived cells *in vitro*. Carbon nanoparticles, namely nanocrystalline diamond (NCD) and fullerenes C60, have been used in the form of films deposited on carbon, glass, silicon and metallic substrates [3-4]. These films were of continuous (NCD) or micropatterned (C60) morphology, and have been intended for surface modifications of bone and dental implants [5], or for creating surfaces enabling regionally-selective cell adhesion and directed cell growth [6]. NCD films were also doped with boron, which resulted in improved adhesion, growth and osteogenic differentiation (measured by the production of collagen I, osteocalcin and alkaline phosphatase content) of human osteoblast-like MG 63 cells [7]. These beneficial effects can be explained by the increased electrical conductivity of boron-doped nanocrystalline diamond films, and can be further enhanced by active electric stimulation of cells.

Some nanoparticles were also incorporated into polymeric matrices, e.g. foils of a terpolymer of polytetrafluoroethylene, polyvinylidene fluoride and polypropylene (carbon nanohorns, carbon nanotubes) or nanofibres prepared by an electrospinning technique from polylactide, PLA (hydroxyapatite nanoparticles) or poly(lactide-co-glycolide), PLGA (nanodiamond).

All these composite substrates promoted the adhesion, growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like MG 63 cells in an extent similar to or even better than standard cell cultivation substrates, such as polystyrene dishes or microscopic glass coverslips. The adhesion and growth of MG 63 cells was particularly improved on the terpolymer of polytetrafluoroethylene, polyvinylidene fluoride and polypropylene enriched with 4 wt.% of single-wall carbon nanohorns or multi-wall carbon nanotubes [3, 4]. The

osteogenic differentiation of MG 63 cells (measured by concentration of osteocalcin) was enhanced on nanofibrous polylactide scaffolds loaded with 15 wt.% of hydroxyapatite. On PLGA nanofibrous scaffolds loaded with approx. 23 wt.% of diamond particles, the number of initially adhering MG 63 cells on day 1 after seeding and the following growth dynamics of the cells were similar to the values on pure PLGA scaffolds [8]. However, the cells on PLGA meshes reinforced with nanodiamond formed larger and more numerous talin-containing focal adhesion plaques. In addition, these plaques in cells on PLGA-nanodiamond scaffolds were localized not only at the cell periphery but also in the central part of the cells (FIG. 1).

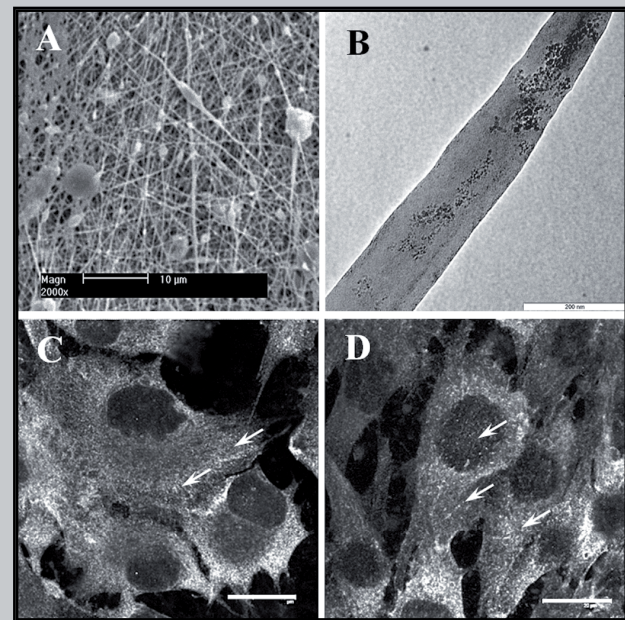


FIG. 1. Scanning electron microscope image of composite nanofibrous PLGA-nanodiamond scaffolds (A), transmission electron microscope image of a PLGA fiber loaded with nanodiamond particles (B), confocal microscope images of human osteoblast-like MG 63 cells stained by immunofluorescence against talin in 3-day-old cultures on pure PLGA scaffolds (C) and composite PLGA-nanodiamond scaffolds (D). Arrows indicate focal adhesion plaques. The bar indicates 10  $\mu\text{m}$  (A), 200  $\mu\text{m}$  (B) and 20  $\mu\text{m}$  (C, D).

Thus, it can be concluded that nanoparticle-modified materials are more promising than their non-modified counterparts for colonization with bone cells, for construction of bone implants and for bone tissue engineering.

### Acknowledgements

Supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (grant No. KAN400480, IAAX00100902), the Grant Agency of the Czech Republic (grants No. 106/09/1000, P107/11/1856, P108/11/0794). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the text.

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 4-5]

## References

- [1] Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R.: Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 51(3):475-483, 2000.
- [2] Price R.L., Ellison K., Haberstroh K.M., Webster T.J.: Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J. Biomed. Mater. Res. A* 70(1): 129-138, 2004.
- [3] Bacakova L., Grausova L., Vandrovcova M., Vacik J., Frazcek A., Blazewicz S., Kromka A., Vanecek M., Nesladek M., Svorcik V., Kopecek M.: Carbon nanoparticles as substrates for cell adhesion and growth. In: *Nanoparticles: New Research*. Lombardi S.L., Editor. New York: Nova Science Publishers Inc, 2008, p. 39-107.
- [4] Bacakova L., Grausova L., Vacik J., Frazcek A., Blazewicz S., Kromka A., Vanecek M., Svorcik V.: Improved adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells on biomaterials modified with carbon nanoparticles. *Diamond Relat. Mater.* 16(12): 2133-2140, 2007.
- [5] Grausova L., Bacakova L., Kromka A., Potocky S., Vanecek M., Nesladek M., Lisa V.: Nanodiamond as a promising material for bone tissue engineering. *J.Nanosci Nanotechnol.* 9(6): 3524-3534, 2009.
- [6] Grausova L., Vacik J., Bilkova P., Vorlicek V., Svorcik V., Soukup D., Bacakova M., Lisa V., Bacakova L.: Regionally-selective adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells on micropatterned fullerene C60 layers. *J. Optoelectron Adv. Mater.* 10(8): 2071-2076, 2008.
- [7] Grausova L., Kromka A., Burdikova Z., Eckhardt A., Rezek B., Vacik J., Haenen K., Lisa V., Bacakova L.: Enhanced growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on boron-doped nanocrystalline diamond thin films. *PLoS One* 6(6): e20943, 2011.
- [8] Parizek M., Douglas T.E.L., Kromka A., Renzing A., Voss E., Brady M.A., Warnke P.H., Bacakova L.: Human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on nanofibrous PLGA membranes loaded with nanodiamonds. *Inzynieria Biomaterialów-Engineering of Biomaterials XIII* (94): 11-13, 2010.

## POLYMER CARRIERS MODIFIED BY PLASMA AND FUNCTIONALIZED WITH Au NANOPARTICLES AS SUBSTRATES FOR MOUSE 3T3 FIBROBLASTS

MARKETA BACAKOVA<sup>1</sup>, ZUZANA MAKAJOVA<sup>2</sup>,  
NIKOLA SLEPICKOVA-KASALKOVA<sup>2</sup>, VACLAV SVORCIK<sup>2</sup>,  
LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,  
INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,  
VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4 – KRC

<sup>2</sup> INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF SOLID  
STATE ENGINEERING,  
TECHNICKA 5, 166 28 PRAGUE 6 - DEJVICE, CZECH REPUBLIC

*Polymers have been often applied in biology and medicine for construction of tissue replacements. However, the inert surface of the most polymers is not able to support and control cell adhesion, migration, proliferation, differentiation and other cell functions. Hence, the modification of polymer surface led to achieve appropriate properties. The polymer surface can be modified by plasma discharge by which the pol-*

*ymers surface chemistry and morphology is changed. Plasma treatment leads to creation of radicals, unsaturated bonds and new chemical groups, mainly oxygen containing groups. Oxidized groups increase the wettability of polymers, which supports adsorption of cell adhesion-mediating extracellular matrix (ECM) molecules in appropriate spatial conformation increasing accessibility of specific sites in these molecules by cell adhesion receptors. In addition, other surface properties of polymers are altered by plasma etching which strongly influence cell-material interaction. Radicals and unsaturated chemical bonds which are created by plasma can be utilized for grafting new chemical groups, biomolecules and nanoparticles. The biomolecules grafted on the polymer surface, such as amino acids, RGD-containing oligopeptides (i.e., ligands for integrin receptors), ECM molecules, enzymes, hormones, and also carbon and gold nanoparticles, not only have specific biological effects on cells but also change physical and chemical properties of the polymer surface, and by this way they support its bioactivity.*

*This study is focused on physiochemical properties and biocompatibility of modified polymers. The studied materials were poly(L-lactide) (PLLA) foils, nanofibrous PLLA meshes and polyethylene terephthalate (PTFE) foils. PLLA and PTFE foils were modified in plasma with Ar<sup>+</sup> ions for time intervals of 50, 100 and 300 s with power 8 W, and then grafted with Au nanoparticles.*

*Changes in the surface wettability were determined by reflection goniometry. The presence and concentration of Au nanoparticles were examined by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). For the biocompatibility testing, the polymers were seeded by mouse embryonic fibroblasts of the line 3T3, i.e., the cells often utilized as a feeder for keratinocytes. The cell adhesion and growth was evaluated by the number of cells, their morphology and the size of cell adhesion area in the 1st, 3rd and 6th day after seeding.*

*The results indicate that the water drop contact angle increases with the time of exposure to plasma, which means that the wettability decreases. However, the following exposure of plasma-irradiated polymers to a sodium citrate solution (i.e., a storage solution for Au nanoparticles) and grafting with Au nanoparticles decrease the contact angle, i.e., increase the material surface wettability. Our tests of biocompatibility indicate that the modification of the polymer surface influences positively the cell behavior. The cells adhered at higher numbers and by a larger cell adhesion area on modified polymers; it was mainly manifested on PTFE.*

## Acknowledgements

*Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. P108/10/1106) and by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant No. KAN400480701).*

*[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 5]*

## PROCESSES OF LIPIDS PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ORAL FLUID FOR PATIENTS WITH ACUTE ODONTOGENIC OSTEOMIEELITIS COMPLICATED WITH PHLEGMONS OF DIFFERENT LOCATION

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

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,  
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER EACMFS,  
220025, MINSK,  
KOSSMONAVTOV STR., 9, PO BOX 286, REPUBLIK OF BELARUS,  
E-MAIL: IP-C@YANDEX.RU

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 6-9]

### Introduction

Quantity of patients with pyoinflammatory diseases in the maxillofacial area is increasing [2]. It's determined by different reasons: the virulence and pathogenicity of the microorganisms was changed and there resistance to the antibiotics was increased as well, the immunological reactivity of the microorganism was greatly changed. In this connection the big attention is paid to the pathogenesis of this pathology last time. There is no doubt that processes of the free radical oxidation (FRO) have extremely important role in the life activity of cells [5]. But processes of the lipids peroxidation (LP) and antioxidant activity (AA) for patients with pyoinflammatory diseases in the maxillofacial area are not studied well till now [4].

Aim of the work was to study the LP processes in the oral fluid (OF) for patients with odontogenic phlegmons of different locations and there dynamics during the treatment.

Objects and methods. We examined 64 patients with odontogenic osteomyelitis of the lower jaw complicated with phlegmon of the maxillofacial area. The phlegmon of one cellular space was formed for 38 persons (group 1), 26 persons had phlegmon of two and more cellular spaces (group 2). The group of control consisted of 15 persons without somatic and pyoinflammatory pathologies of the maxillofacial area. All patients had the primary surgical debridement (PSD-B) of the suppurative focus during the first day of the treatment. Bacteriological examination of the wound exudation was performed during the operation, complex anti-inflammatory therapy course was prescribed to the patients. Antibacterial, desensitizing and disintoxication medicines were obligatory included into the treatment. During the examination we didn't fix the further spread of the pathological process for all patients as well as the acute complications development (mediastinitis, sepsis etc). OF sampling was performed 4 times: the first test was performed during the first day of treatment in the hospital and before

PSD-B of the suppurative focus; the second test was made on the second day of the treatment (next day after the PSD-B), the third test was made on the 4 day of treatment; the fourth test was made the last day of the treatment. LP and AA levels were checked in the OF with biochemiluminometer BHL-06 with the method of induced chemiluminescence in the reaction of Fenton [1]. We fixed the maximal intensity of the luminescence ( $I_{max}$ , mV), pro rata to the LP, lightsum (S, mV/s) of the luminescence inversely proportional to AA and  $tg \alpha 2$  (tangent of angle of reduction of the indication after the maximal intensity achievement characterized with the speed reduction of the free radical processes). Final data

**TABLE 1**  
LP and AA indices in the oral fluid for healthy patients.

Indices	n	M	$\sigma$	Me	LQ	UQ
S, [mV·s]	15			4,51	3,5	4,8
$I_{max}$ , [mV]	15	0,43	0,08	0,42	0,38	0,5
$tg \alpha 2$	15			-0,1	-0,12	-0,1

was processed statistically with tables application package «Statistica 6.0» and «Excel». We evaluated the statistical significance of difference between the dependent groups taking into consideration the sign allocation using variance analysis by Fridman and density-free test by Vilcoxon considering the Bonferoni amendment ( $p \times 6$ ). In order to evaluate the statistical significance between independent groups, we used Mann-Whetny criteria (U) [3].

Results. LP and AA indices in the oral fluid for healthy patients (TAB.1)

LP indices in the OF for patients with odontogenic phlegmons in dynamic are presented in the table 2. Comparative indices of the LP and AA in the oral fluid for patients with different location of pyoinflammatory processes in the maxillofacial area discovered statistically significant differences between all indices we were studying during the treatment (TAB.2). Thus, we found out the higher activity of LP processes and lower AA and speed reduction for PL in the OF for patients with different phlegmons in respect of the patients group with odontogenic phlegmon of one cellular space during the treatment course.

We discovered the influence of the standard method of treatment with odontogenic phlegmons on the indices LP

**TABLE 2**  
Dynamics for PL in the OF for patients with odontogenic phlegmons.

Test	Indices	Group 1 Me (LQ; UQ)	Group 2 Me (LQ; UQ)	p
1	S [mV·s]	5,43(4,25;7,11)	6,34(4,51;10,15)	0,04
	$I_{max}$ [mV]	0,55(0,41;0,71)	0,65(0,48;0,97)	0,04
	$tg \alpha 2$	-0,14(0,16;-0,12)	-0,16(-0,18;-0,12)	0,04
2	S [mV·s]	5,92(4,22;7,8)	6,55(5,76;8,85)	0,04
	$I_{max}$ [mV]	0,66(0,49;0,76)	0,75(0,61;0,91)	0,03
	$tg \alpha 2$	-0,13(-0,16;-0,12)	-0,17(-0,19;-0,14)	0,03
3	S [mV·s]	5,42(4,07;8,1)	6,67(5,4;8,76)	0,04
	$I_{max}$ [mV]	0,63(0,49;0,75)	0,8(0,5;0,87)	0,02
	$tg \alpha 2$	-0,16(-0,18;-0,12)	-0,18(-0,22;-0,14)	0,02
4	S [mV·s]	5,26(3,63;6,69)	6,05(4,9;8,1)	0,03
	$I_{max}$ [mV]	0,5(0,41;0,59)	0,61(0,41;0,84)	0,04
	$tg \alpha 2$	-0,13(-0,14;-0,12)	-0,16(-0,18;-0,12)	0,01

$p < 0,05$



and AA in the oral fluid with density-free dispersion method by Fridman (TABs. 3-8). Data of the table there demonstrates that indices of the lightsum in the OF for patients with phlegmons of one cellular space on the next day after the PSD-B of the suppurative focus ( $S_2=5,92(4,22;7,8)$  mV·s) and on the 4th day of the treatment. ( $S_3=5,42(4,01;8,7)$  mV·s) is higher than at the first day of the treatment ( $S_1=5,43(4,25;7,11)$  mV·s). So, antioxidant activity of the OF for patients with phlegmons of one cellular space is reducing on the next day after the operation according to the first day of the treatment and remains reduced till the 4th day of the examination.

**TABLE 3**

**Comparative evaluation of the maximal intensity of the luminescence ( $I_{max}$ ) in OF for patients with phlegmons of one cellular space during the treatment.**

Friedman ANOVA $p<0,0008$			
Indices for comparison	p	p taking into consideration the correction Bonferoni (x6)	
S1/S2	0,0001	0,0006	$p<0,001$
S1/S3	0,007	0,04	$p<0,05$
S1/S4	0,32	1,92	$p>0,05$
S2/S3	0,02	0,12	$p>0,05$
S2/S4	0,13	0,78	$p>0,05$
S3/S4	0,14	0,84	$p>0,05$

**TABLE 4**

**Comparative evaluation of the maximal intensity of the luminescence ( $I_{max}$ ) in OF for patients with phlegmons of one cellular space during the treatment.**

Friedman ANOVA $p<0,0000001$			
Indices for comparison $I_{max}$	p	p taking into consideration the correction Bonferoni (x6)	
$I_{max} 1/ I_{max} 2$	0,0007	0,004	$p<0,01$
$I_{max} 1/ I_{max} 3$	0,00002	0,0001	$p<0,001$
$I_{max} 1/ I_{max} 4$	0,11	0,66	$p>0,05$
$I_{max} 2/ I_{max} 3$	0,26	1,32	$p>0,05$
$I_{max} 2/ I_{max} 4$	0,0008	0,004	$p<0,01$
$I_{max} 3/ I_{max} 4$	0,01	0,06	$p>0,05$

LP process activity in the OF for patients of the group I was raising correspondently to the first day of the treatment in the clinic ( $0,55(0,41;0,71)$  mV) next day after the operation ( $0,66(0,49;0,76)$  mV) and kept the more high level till the 3rd day after the operation ( $0,63(0,49;0,75)$  mV). But this indices became weak till  $0,5(0,41;0,59)$  mV by the day of recovery comparing to the first day of the treatment after the PSD-B of the suppurative focus ( $0,55(0,41;0,71)$  mV),  $p=0,004$ . Thus, variable dynamics of the LP activity in the OF was fixed for patients with odontogenic phlegmons. After the PSD-B of the suppurative focus the activity of the free radical processes is increasing but it reduces till the initial indices by the end of the treatment. It was not possible to find out the changes of LP in the OF by the end of the treatment in the clinic accordingly to the indices of the 1<sup>st</sup> test.

The TABLE 5 says that the speed of the reduction of LP in the OF for patients with phlegmons of one cellular space was reducing by the 4<sup>th</sup> day of the treatment accordingly to the indices of the first day of the treatment. But to the end of the treatment this indices was the same as the initial one determined at the first day of the treatment in the hospital.

**TABLE 5**

**Comparative evaluation of indices characterizing the speed reduction of free radical processes ( $tg \alpha_2$ ) in OF for patients with phlegmons of one cellular space during the treatment.**

Friedman ANOVA $p<0,0006$			
Indices for comparison	p	p taking into consideration the correction Bonferoni (x6)	
tg 1/ tg 2	0,07	0,42	$p>0,05$
tg 1/ tg 3	0,00001	0,00006	$p<0,001$
tg 1/ tg 4	0,75	4,5	$p>0,05$
tg 2/ tg 3	0,14	0,84	$p>0,05$
tg 2/ tg 4	0,23	1,38	$p>0,05$
tg 3/ tg 4	0,06	0,36	$p>0,05$

**TABLE 6**

**Comparative evaluation of the lightsum of luminescence (S) in OF for patients with phlegmons of two and more cellular spaces during the treatment.**

Friedman ANOVA $p<0,005$			
Indices for comparison	p	p taking into consideration the correction Bonferoni (x6)	
S1/S2	0,42	2,52	$p>0,05$
S1/S3	0,35	2,1	$p>0,05$
S1/S4	0,01	0,06	$p>0,05$
S2/S3	0,24	1,44	$p>0,05$
S2/S4	0,03	0,18	$p>0,05$
S3/S4	0,04	0,24	$p>0,05$

**TABLE 7**

**Comparative evaluation of the maximum lightsum of luminescence ( $I_{max}$ ) in the OF for patients with phlegmons of two and more cellular spaces.**

Friedman ANOVA $p<0,0001$			
Indices for comparison	p	p taking into consideration the correction Bonferoni (x6)	
$I_{max} 1/ I_{max} 2$	0,008	0,04	$p<0,05$
$I_{max} 1/ I_{max} 3$	0,07	0,52	$p>0,05$
$I_{max} 1/ I_{max} 4$	0,04	0,24	$p>0,05$
$I_{max} 2/ I_{max} 3$	0,01	0,06	$p>0,05$
$I_{max} 2/ I_{max} 4$	0,009	0,05	$p>0,05$
$I_{max} 3/ I_{max} 4$	0,04	0,24	$p>0,05$

Indices of the TABLE 6 demonstrate that statistically significant difference of AA in the tests of the OF during the treatment of patients with phlegmons of two and more cellular spaces wasn't discovered.

So, processes of the LP in the OF pass more actively after the PSD-B of the suppurative focus that at the first day of the treatment before operation. Examining the table Nr 8 we discovered that the speed of the processes reduction of PL in the OF for patients of the group 2 reduced by the 4 day correspondently to the second day of the treatment. Results of LP and AA in the OF comparison with phlegmons of one cellular space and practically healthy people are presented in the TABLE 9. Results of comparative evaluation of LP and AA in the OF comparison with odontogenic phlegmons of two and more cellular spaces and practically healthy people are presented in the TABLE 10.

Presented data confirm that LP and AA indices of the oral fluid for patients with phlegmons are authentically different from the indices of the health people during examination when standard treatment was applied. Processes activity of the LP is higher but AA and the speed of the reactions reduction of the free radical oxidation is less for patients with pyoinflammatory diseases than in the group of control.

Thus, basing on the examinations results data we could make next conclusions. Patients with odontogenic phlegmons had more high level of the LP, less level

TABLE 8

Comparative evaluation of indices characterizing the speed of free radicals reduction processes (tg  $\alpha_2$ ), in OF for patients with phlegmons of two and more cellular spaces.

Friedman ANOVA $p < 0,003$			
Indices for comparison	p	p taking into consideration the correction Bonferoni (x6)	
tg 1/ tg 2	0,34	2,04	$p > 0,05$
tg 1/ tg 3	0,08	0,48	$p > 0,05$
tg 1/ tg 4	0,55	3,3	$p > 0,05$
tg 2/ tg 3	0,0002	0,001	$p < 0,01$
tg 2/ tg 4	0,65	3,9	$p > 0,05$
tg 3/ tg 4	0,05	0,3	$p > 0,05$

TABLE 9

Indices for comparative evaluation of LP and AA in the OF for patients with phlegmons of one cellular space and practically health people.

Indices	Patients, Me (LQ; UQ)	Healthy people, Me (LQ; UQ)	p
S1 [mV·s]	5,43(4,25;7,11)	4,51(3,5;4,8)	0,02
$I_{max}1$ [mV]	0,55(0,41;0,71)	0,42(0,38;0,5)	0,01
tg $\alpha_2$ 1	-0,14(0,16;-0,12)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,01
S2 [mV·s]	5,92(4,22;7,8)	4,51(3,5;4,8)	0,01
$I_{max}2$ [mV]	0,66(0,49;0,76)	0,42(0,38;0,5)	0,00004
tg $\alpha_2$ 2	-0,13(-0,16;-0,12)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,002
S3 [mB·s]	5,42(4,07;8,1)	4,51(3,5;4,8)	0,01
$I_{max}3$ [mV]	0,63(0,49;0,75)	0,42(0,38;0,5)	0,001
tg $\alpha_2$ 3	-0,16(-0,18;-0,12)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,005
S4 [mB·s]	5,26(3,63;6,69)	4,51(3,5;4,8)	0,03
$I_{max}4$ [mV]	0,5(0,41;0,59)	0,42(0,38;0,5)	0,04
tg $\alpha_2$ 4	-0,13(-0,14;-0,12)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,007

TABLE 10

Indices of comparative evaluation of LP and AA in the OF for patients with odontogenic phlegmons of two and more cellular spaces and practically healthy people

Indices	Patients, Me (LQ; UQ)	Healthy people, Me (LQ; UQ)	p
S1 [mV·s]	6,34(4,51;10,15)	4,51(3,5;4,8)	0,003
$I_{max}1$ [mV]	0,65(0,48;0,97)	0,42(0,38;0,5)	0,0002
tg $\alpha_2$ 1	-0,16(-0,18;-0,12)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,00008
S2 [mV·s]	6,55(5,76;8,85)	4,51(3,5;4,8)	0,0000001
$I_{max}2$ , mV	0,75(0,61;0,91)	0,42(0,38;0,5)	0,000008
tg $\alpha_2$ 2	-0,17(-0,19;-0,14)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,00006
S3 [mV·s]	6,67(5,4;8,76)	4,51(3,5;4,8)	0,000005
$I_{max}3$ [mV]	0,8(0,5;0,87)	0,42(0,38;0,5)	0,00003
tg $\alpha_2$ 3	-0,18(-0,22;-0,14)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,000006
S4 [mV·s]	6,05(4,9;8,1)	4,51(3,5;4,8)	0,0008
$I_{max}4$ [mV]	0,61(0,41;0,84)	0,42(0,38;0,5)	0,008
tg $\alpha_2$ 4	-0,16(-0,18;-0,12)	-0,1(-0,12;-0,1)	0,0005

of AA and the speed of the free radical processes reduction in the OF during the treatment regarding to the indices of the healthy people. For patients with phlegmons of one cellular space the reduction of the AA in the OF was evident, LP activity augmentation the next day after the PSD-B of the suppurative focus and reduction of the slowing-down speed of LP processes by the 4 day of the treatment. Dynamics of AA in the OF was not determined for patients with phlegmons of two and more cellular spaces. LP activity was increasing after the operation and the speed of the LP processes slowing-down was reducing by the 4 day of the treatment. Indices under examination

for both groups of patients were no different by the end of the treatment from indices received the first day of the treatment in the hospital. It demonstrates the keeping of LP and AA deviation in the oral fluid from the norm even by the end of the treatment in the hospital. Patients with different phlegmons had higher activity of LP processes, less AA level and the speed of the LP reduction in the OF regarding to the persons with phlegmons with one cellular space during the treatment.

Conclusion. Results of LP processes examination in the OF for patients with odontogenic phlegmons of different location and there dynamics during the treatment give basis to make conclusion that LP and AA indices could be additional criteria for diagnostic when verifying the diagnose and confirming the level of the pyoinflammatory process location.

## References

- [1] Abramov J.I.: Man and antioxidant substances / J.I. Abramova, G.I. Oksegendler. - L.: Nauka, 1985, 230 p.
- [2] Korotkih N.G.: Abscesses and phlegmons of the head: diagnostics, treatment, prognostication / N.G. Korotkih, G.V. Toboev. - Voronezh: IPO SOIGSI, 2010, 90 p.
- [3] Rebrova O.Y.: Statistical analysis of the medical data. Application program STATISTICA. / O.Y. Rebrova - M.: MediaSfera, 2002, 312 p.
- [4] Hasanov A.I.: The importance of the lipids peroxidation products in prognostication and earlier diagnostics of the traumatic osteomyelitis of the lower jaw / A.I. Hasanov, C.Y. Abdulaev // Stomatology. 2002, № 2, P. 27-29.
- [5] Halliwell B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? / B. Halliwell. - Lancet. - 1994. Vol. 344. P. 721-724.

## STERILIZATION DECOMPOSITION EVALUATION OF COMPOSITE MATERIALS BASED ON CARBON FIBERS FOR USE IN MEDICINE

RADEK SEDLÁČEK<sup>1</sup>, TOMÁŠ SUCHÝ<sup>1,2</sup>, KAREL BALÍK<sup>2</sup>,  
MIROSLAV SOCHOR<sup>1</sup>, ZBYNĚK SUCHARDA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
LABORATORY OF BIOMECHANICS, PRAGUE, CZECH REPUBLIC,  
RADEK.SEDLACEK@FS.CVUT.CZ

<sup>2</sup> CZECH ACADEMY OF SCIENCES, V.V.I.,  
INSTITUTE OF ROCK STRUCTURE AND MECHANICS,  
DEPARTMENT OF COMPOSITES AND CARBON MATERIALS, PRAGUE,  
CZECH REPUBLIC, SUCHYT@IRSM.CAS.CZ

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 9-10]

### Introduction

Radiolucent composite materials have superior properties to insufficiently radiolucent metal alloys and unreinforced polymers with poor mechanical properties. Their use as medical device materials requires an understanding of the micromechanical properties that provisionally define their behavior. Sterilization is a mandatory process for such materials used in a range of medical applications, e.g., intraoperative guides, screening equipment accessories and patient support systems. The steam or dry heat sterilization processes widely employed in medical practice can affect the micromechanical properties of polymeric composites, particularly in the interface region between the polymer matrix and the reinforcing fibers. However, the effect of sterilization processes on the properties of materials used in medical devices is often ignored [1]. The structural integrity and the overall performance of fiber reinforced polymer composites are strongly influenced by the stability of the fiber/polymer interfacial region. Absorption of moisture causes dilatational expansion and induces stresses associated with moisture-induced expansion, which degrade the structural stability [2-5]. This may induce plastic deformation by plasticization or differential strains [2]. These effects may greatly alter the physical, chemical and mechanical properties of the material at different scales [6]. This results in a significant mismatch in moisture-induced volumetric expansion

between the matrix and the fibers, and leads to the evolution of localized stress and strain fields in fibrous composites [6]. Several variables affect the performance of composite materials, including matrix, reinforcement, manufacturing method and reinforcement orientation. It is necessary to investigate both microscopic and macroscopic changes in mechanical and structural properties due to the sterilization processes that are employed. The aim of this study was to prepare a composite material with suitable mechanical, structural and radiolucent properties after repeated sterilization by widely-used techniques.

### Materials and methods

Composites based on carbon T300 fibers (plain weave fabrics, Toray, Japan) and/or polyetheretherketone (Porcher Industrie, France) and polyphenylenesulfide (TenCate, Holland) were prepared. T300/polyetheretherketone (PEEK) was cured under a pressure of 0.08 MPa at 395°C. T300/polyphenylene sulfide (PPS) was cured under a pressure of 1.0 MPa at 310°C. The mechanical properties were measured before sterilization (A), after 1 sterilization process period (B1), and after 30 (B30) sterilization process periods. An autoclave (Sterident, Prodenta, CZ) for steam sterilization (134°C, 304 kPa, 10 min) was used for this purpose. The ultimate strength in bending and the modulus of elasticity in bending in the direction of the fiber axis were determined with a four-point and three-point bending setup using the Inspekt 100 HT material tester (Hagewald & Peschke, Germany), in accordance with ISO 14125.

### Results

The flexural properties after multiple sterilizations were tested and compared with those of the corresponding unsterilized samples (FIGS. 1 and 2). The modulus of elasticity in bending is influenced by multiple sterilizations only in the case of T300/PEEK composite (PEEK). The inexpressive decrease in the modulus is equal to approx. 3-4% after 30 sterilization cycles. In the case of ultimate strength in bending, no decrease was observed. From this point of view, we can state that no weakening of the reinforcement-matrix bond occurred.

The influence of multiple sterilization processes on changes in the structural integrity of the composites was studied by an image analysis of cross sections. From the point of view of image analysis, we can state that no weakening of the reinforcement-matrix bond occurred (for illustration, see FIGs. 3 and 4).

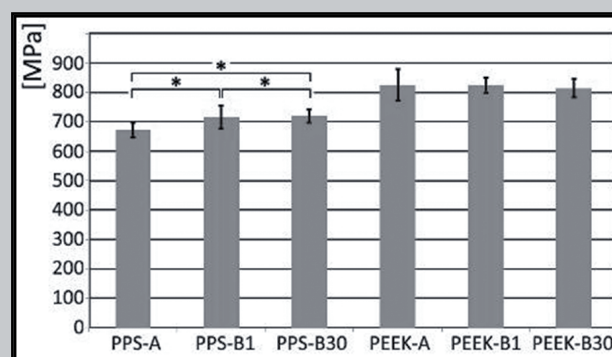


FIG. 1. The ultimate strength in bending (\*denotes statistically significant differences, new-man-keuls post-hoc test,  $\alpha = 0.05$ ).

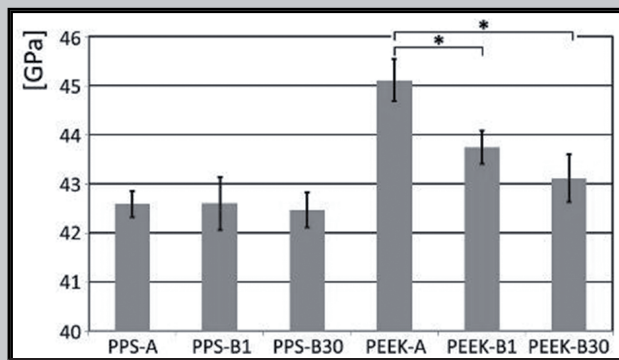


FIG. 2. The modulus of elasticity in bending (\*denotes statistically significant differences, Mann-Whitney post-hoc test,  $\alpha = 0.05$ ).

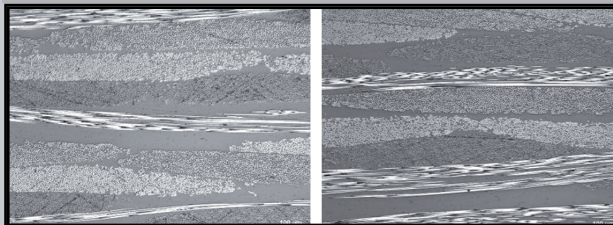


FIG. 3. Micrographs of polished sections of T300/PPS composites (from left: A and B30).

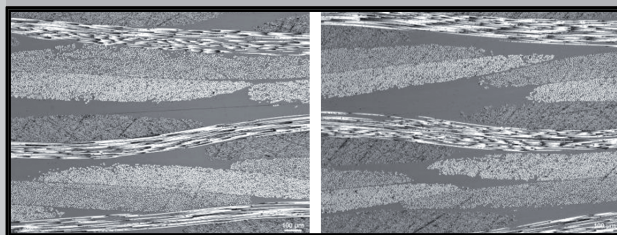


FIG. 4. Micrographs of polished sections of T300/PEEK composites (from left: A and B30).

## Conclusions

On the basis of our analyses, we can state that both PEEK and PPS composites are good candidates for application as radiolucent materials providing resistance against sterilization decomposition. Presently, increased sterilization processes periods are applied and further analyses of physical properties are performed.

## Acknowledgements

This study was supported by the Czech Science Foundation under project No. P108/10/1457, and by Ministry of Education project Transdisciplinary Research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012.

## References

- [1] Block S.S.: 1991, Disinfection, Sterilization, and Preservation, Lea and Febiger, Philadelphia.
- [2] Ray B.C." Journal of Colloid and Interface Science, 298 (2006) 111-7.
- [3] Simmons A., Hyvarinen J., Poole-Warren L.: Biomaterials, 27 (2006) 4484-97.
- [4] Godara A., Raabe D., Green S., Acta Biomateriala, 3 (2007) 209-20.
- [5] Okpara-Hofmann J., Knoll M., Dürr M., Schmitt B.: Journal of Hospital Infection, 59 (2005) 280-5.
- [6] Zheng Q., Morgan R.J.: Journal of Composite Materials, 27 (1991) 1465-1478.

## ADHESION AND GROWTH OF HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS ON TITANIUM AND STAINLESS STEEL SAMPLES DEVELOPED FOR CONSTRUCTING BONE IMPLANTS

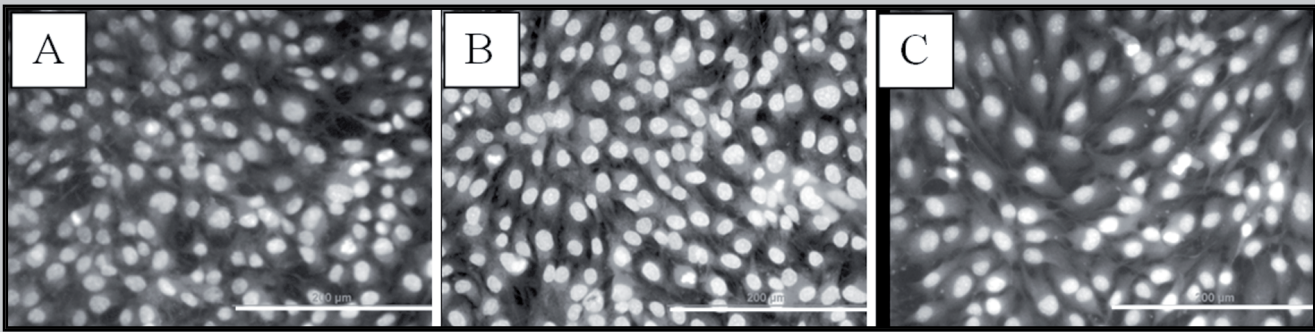
LUCIA STRANAVOVA<sup>1</sup>, MARKETA BACAKOVA<sup>1</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>, JAROSLAV FENCL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC  
<sup>2</sup>BEZNOŠKA LTD., DELNICKA 2727, 272 01 KLADNO 2 – KROCEHLAVY, CZECH REPUBLIC

*Titanium and stainless steel are strong, corrosion-resistant and biocompatible metals. Thanks to their remarkable properties, they have been in use for a long time in clinical medicine, mainly for constructing and replacing large joints, in particular the bone-anchoring parts, e.g. cups and stems, and also for fabricating orthopaedic screws and splints. In the Czech Republic, these devices are produced by Beznoska Ltd., and are clinically applied in the Orthopaedic Clinic, Bulovka Faculty Hospital in Prague.*

*This study has investigated the biocompatibility of samples made of pure titanium (according to quality standard ISO 5832-2) and corrosion-resistant steel (quality standards ISO 5832-1 and AISI 316L), obtained from Beznoska. In addition to Fe, the steel samples contained C (max. 0.025 wt.%), Si (0.6 wt.%), Mn (1.7 wt.%), P (max. 0.025 wt.%), S (max. 0.003 wt.%), Cr (17.5 wt.%), Ni (13.5 wt.%), Mo (2.8 wt.%), and Cu (max. 0.1 wt.%). The materials were used in the form of square samples (9x9 mm or 30x30 mm, thickness 1 mm). Both Ti and steel samples were grinded with SiO<sub>2</sub>. The surface of the steel samples was then treated by polishing with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> paste (grain size up to 1 μm), while the surface of the Ti samples, i.e. a material not suitable for polishing, was finished by brushing using another type of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> paste with slightly larger grains. Thus, the surface of the steel samples was finally smoother and glossy, while the Ti surface was rougher and matted.*

*For the in vitro biocompatibility tests, human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were used. The smaller samples (9 x 9 mm) were inserted into polystyrene 24-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland; well diameter 1.5 cm). Each well contained 25 000 cells (approx. 14150 cells/cm<sup>2</sup>) and 1.5 ml of Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, USA, Cat. No. 10270-106) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco, Cat. No. 10270-106) and gentamicin (40 μg/ml, LEK, Slovenia). These samples were used for evaluating the size of the cell spreading area (day 1), and for evaluating cell shape and cell viability (days 1, 4 and 7 after seeding). The size of the cell spreading area was measured using Atlas Software (Tescan Ltd., Brno, Czech Republic). The viability of the cells was determined by the LIVE/DEAD viability/*



**FIG. 1.** Morphology of human osteoblast-like MG 63 on day 4 after seeding on titanium (A), on stainless steel (B), and on the control polystyrene culture dish (C). Cells stained with Texas Red C2-Maleimide and Hoechst #33342. Olympus IX 51 microscope, obj. 20, DP 70 digital camera, bar = 200 µm.

cytotoxicity kit for mammalian cells (Invitrogen, Molecular Probes, USA).

The larger samples (30x30 mm) were inserted into GAMA polystyrene dishes (diameter 5 cm; GAMA Group Joint-Stock Company, Ceske Budejovice, Czech Republic) and seeded with 300000 cells/dish (approx. 15300 cells/cm<sup>2</sup>) suspended in 9 ml of the above mentioned culture medium. These samples were used for evaluating the cell number on days 1, 4 and 7 after seeding, using a Beckman Vi-CELL XR Cell Analyser automatic cell counter.

The results indicated that the number of initially adhering cells on day 1 after seeding was significantly lower on the titanium (5320±390 cells/cm<sup>2</sup>) and on the stainless steel (4110±370 cells/cm<sup>2</sup>) than on the control polystyrene culture dishes (7740±350 cells/cm<sup>2</sup>). However, on day 4 after seeding, the cell population density on both metallic materials studied here became significantly higher than on the control polystyrene dishes (75200±2 890 cells/cm<sup>2</sup> on Ti and 90870±2 350 cells/cm<sup>2</sup> on steel vs. 56440±1180 cells/cm<sup>2</sup> on polystyrene). This suggests faster cell proliferation on both metallic materials than on polystyrene. At the same time, the cell number on the stainless steel samples was significantly higher than on the Ti samples. On day 7, the differences in number of adhered cells on both studied metals and on the control polystyrene substrate was on an average similar (from 328780±680 cells/cm<sup>2</sup> to 362 200±760 cells/cm<sup>2</sup>). The cell viability on all tested materials was almost 100% in all culture intervals. The morphology of the cells on the studied materials was similar to the morphology of the adhered cells on the control polystyrene dishes, i.e. the cells were mostly flat and polygonal, and the size of their cell spreading areas was similar on all tested materials. The cells were distributed homogeneously on the entire material surface, and on day 4 they started to form confluent cell layers (FIG. 1).

It can be concluded that the tests of biocompatibility confirmed that the titanium and the stainless steel promoted the adhesion and growth of bone-derived cells, and thus these materials are promising for construction of bone implants and for their good integration with the surrounding bone tissue. Further studies on osteogenic cell differentiation, potential immune activation and the response of the bone cells to growth factors, including bone morphogenetic protein, are in progress.

## Acknowledgements

Supported by the Technological Agency of the Czech Republic (grant No. TA01011141) and by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. P108/10/1858). We also thank Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) for his language revision of the text.

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 10-11]

## BIOAPATITE MADE FROM CHICKEN FEMUR BONE

MONIKA ŠUPOVÁ<sup>1</sup>, GRAŽYNA SIMHA MARTYNKOVÁ<sup>2</sup>, ZBYNĚK SUCHARDA<sup>1</sup>, TOMÁŠ SUCHÝ<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> CZECH ACADEMY OF SCIENCES, INSTITUTE OF ROCK STRUCTURE AND MECHANICS, DEPARTMENT OF COMPOSITES AND CARBON MATERIALS, PRAGUE, CZECH REPUBLIC, SUPOVA@IRSM.CAS.CZ

<sup>2</sup> VŠB-TECHNICAL UNIVERSITY OF OSTRAVA, NANOTECHNOLOGY CENTRE, OSTRAVA-PORUBA, CZECH REPUBLIC

<sup>3</sup> CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE, FAC. OF MECHANICAL ENG., PRAGUE, CZECH REPUBLIC

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 11-13]

## Introduction

The inorganic part of the human bone has chemical and structural similarities with hydroxyapatite (HA) in the form of plate-shaped nanocrystals that are 2–3 nm in thickness and tens of nanometers in length and width [1]. Bones do not have a pure or a stoichiometric HA but incorporate many elements; some of them at the ppm level [2]. Ionic substitution can affect the crystal structure, crystallinity, surface charge, solubility etc., leading to major changes in the biological performance upon implantation. Nano HA was successfully synthesized from biowaste chicken eggshells and from different types of sea creatures. Another possible source for preparation of bioapatite (BAP) can be warm-blooded animal bones (e.g. bovine bone) [3]. In this study we report a preparation and characterization of bioapatite from chicken femur, such as another alternative source of bone apatite.

BAP sample was obtained using a chemical and thermal deproteinating process inspired by Murugan et al. [3]. The cortical chicken bones were heated with a 2% NaCl aqueous solution at 150°C and pressure of 0.2 MPa in autoclave followed by disintegration of the sample in mixer. Then the degreasing process in acetone – ether mixture (ratio 3:2) for 24 hours followed. Bone samples were then treated with 4% NaOH solution at 70°C for 24 hours. The chemically treated bone samples were calcined overnight at 500°C. Product was washed with deionized water and dried in oven at 80°C. Sodium and magnesium were determined by AAS method (Varian AA 240), phosphate by the photometric method (UV-VIS 500, Unicam) and calcium by titration method. Specific gravity was determined pycnometrically in water. Morphology of BAP particles was studied by TEM (Tecnai G2 Spirit Twin). The surface area was determined by the BET method (Sorptomatic 1990) with nitrogen as the adsorbate gas. The XRD pattern of the final nanopowder was obtained with X-Ray Powder Diffractometer D8 Advance (Bruker AXS, Germany), Bragg-Brentano diffraction geometry with CoK radiation ( $\lambda=1.78 \text{ \AA}$ ), position sensitive VANTEC detector, reflecting mode. The crystallite size and distribution was calculated using software MudMaster using Warren-Averbach [4] approach. The FTIR spectroscopy was done with Protégé 460 E.S.P. (Thermo-Nicolet, Inc., USA) by KBr tablet technique. The  $\text{CO}_3^{2-}$  content was qualitatively determined from the

infrared spectrum by comparing the extinction coefficient (E) of the  $1450 \text{ cm}^{-1}$  (carbonate) and  $569 \text{ cm}^{-1}$  (phosphate) bands using the formula:  $\% \text{CO}_3^{2-} = 13.5(E_{1450}/E_{569}) - 0.2$  [3], the  $\text{CO}_3^{2-}$  content was also quantitatively determined using an el. analysis by a CHNS/O microanalyzer Flash FA 1112 Thermo Finnigan (Carlo Erba).

## Results and discussions

BAP sample contents 0.71 and 0.80 wt.% of magnesium and sodium, respectively. The amount of magnesium in apatite is usually much higher than that incorporated into its crystalline structure and it is mainly adsorbed on the apatite crystal surface [5]. Owing to these substitutions the Ca/P molar ratio is smaller (1.64) than 1.67 that is typical for stoichiometric HA. This fact becomes evident also in value of specific gravity 2.864 for BAP sample compared to 3.080 for stoichiometric HA. Generally, the nanoparticles appear to have a needle-shape (FIG. 1a) with heights of ~ 20 nm to 90 nm and diameters of ~ 13 nm to 20 nm. The average values of the specific surface area ( $73.3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) and pore specific volume ( $0.28 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) determined by BET demonstrate the nano nature of BAP particles.

The FTIR spectrum (FIG. 1b) shows a weak broad bands ranging between  $3600\text{--}3350 \text{ cm}^{-1}$  and at  $1634 \text{ cm}^{-1}$  corresponds to strongly adsorbed and/or bound  $\text{H}_2\text{O}$ . The weak  $3564 \text{ cm}^{-1}$  band corresponds to the  $\text{OH}^-$  group, other bands correspond to  $\text{OH}^-$  group at  $635$  and  $595 \text{ cm}^{-1}$  were not detected which is in agreement with published data [6]. The low portion of  $\text{OH}^-$  groups in the bone apatite thus would enable

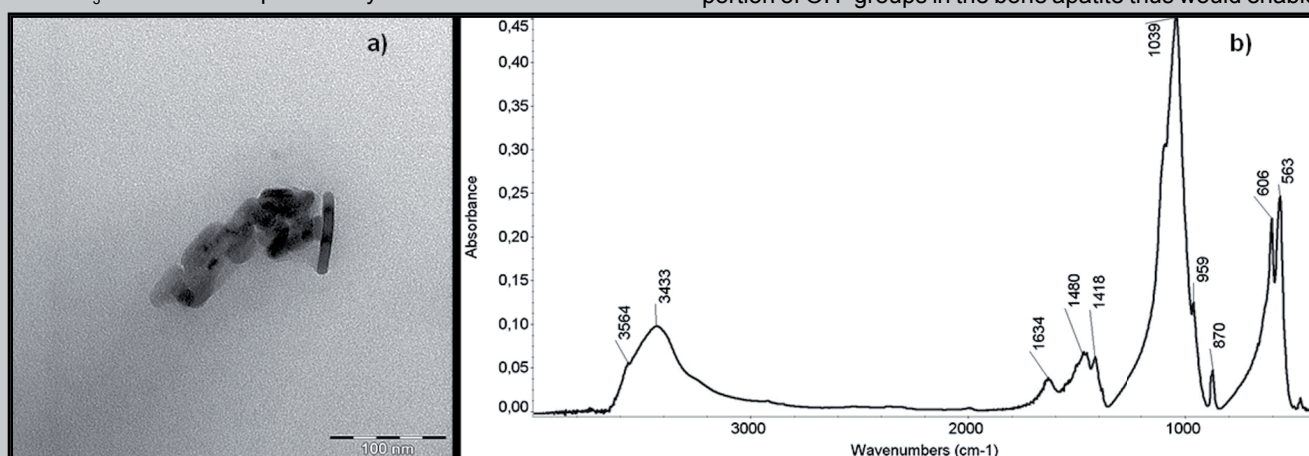


FIG. 1. TEM image (a), baseline corrected FTIR spectrum (b) of BAP sample.

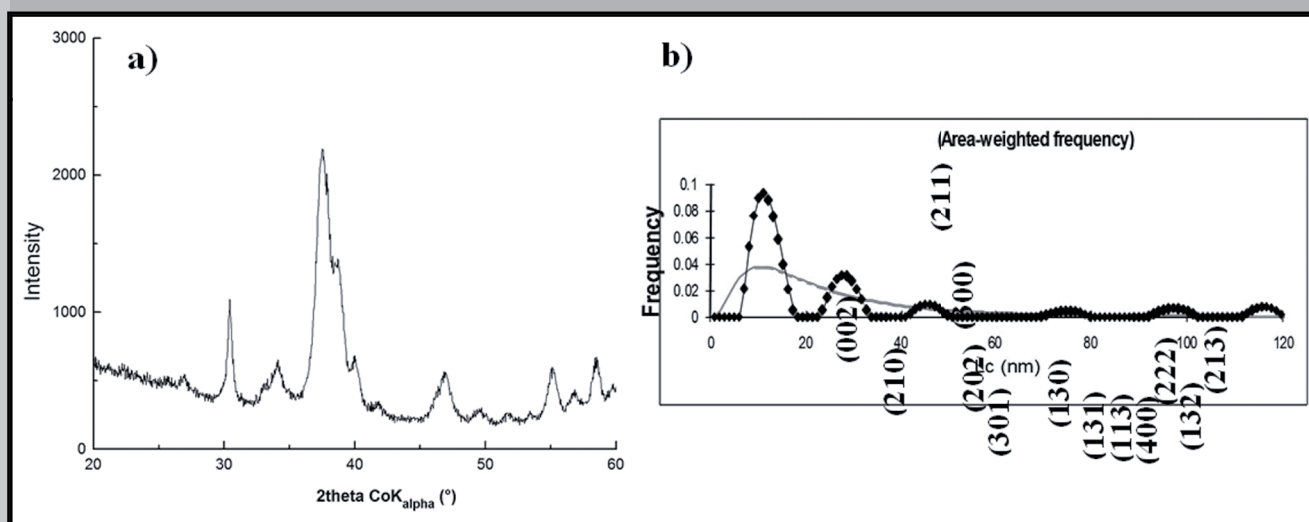


FIG. 2. XRD pattern (a) and crystallite size distribution (b) of BAP sample.

its dissolution. A strong band of  $PO_4^{3-}$  group was seen at 1039, 959 (stretching vibration) and bands at 590–610  $cm^{-1}$  regions are due to deformation vibration of  $PO_4^{3-}$  ions. Bands pertain to the B-type  $CO_3^{2-}$  functional group at ~ 1450 and 870  $cm^{-1}$ , indicating the substitution of  $CO_3^{2-}$  ions into the apatite. The  $CO_3^{2-}$  peak at 1550  $cm^{-1}$  assigned to the A-type was not detected owing to none existence of  $OH^-$ . The amount of  $CO_3^{2-}$  estimated by a FTIR method using an equation given in the Materials and Methods was found to be 3.11 wt.%, which corresponds well with the results determined by CHNS/O analyzer-3.25 wt.%. Carbonates in apatite correlates positively with its solubility [7].

XRD analysis served for material crystallinity estimation. The diffraction pattern of BAP (FIG.2a) represents typical broadened peaks of semi-crystalline material. The area-weighted mean crystallite size  $\langle L_c \rangle$  was calculated according to the theory of Warren and Averbach [4] from distribution  $\langle L_c \rangle = 27$  nm. The crystallite size distribution curve has two major maximums (FIG.2b) and calculated log-normal distribution (solid line) roughly traces the character of the BAP distribution. Majority of the crystallites is in range 12 to 18 nm. Larger domains are represented with sizes around 30 nm. The crystallites are rather small and uniform, which is advantageous for further applications. For comparison, the average crystallite size  $L_c$  of human bone, studied by Handschin et al. [8], has been determined as 28 nm within age group 0-25, to reach a constant average domain size of 34 nm within age group 30-80. Crystallite size is connected with apatite solubility and resorbability in bone [7].

## Conclusions

The chicken femur bone was used to isolate nano-bioapatite powder via chemical treatment followed by calcination. XRD, BET, crystalite size distribution and TEM proved the nanostructured character of the sample. Values of specific gravity and Ca/P molar ratio together with chemical analysis and FTIR spectrometry have demonstrated that BAP sample was Ca-deficient with Na, Mg and carbonate substitutions. Properties mentioned above are related to good solubility and resorbability, which are very important for bone remodeling. The present study shows that chicken femur bone can be effectively utilized for the preparation of nano-bioapatite powders as potential filler to biocomposites.

## Acknowledgements

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

## References

[1] Weiner S., Wagner H.D.: Annu. Rev. Mater. Sci. 1998; 28: 271-98.  
 [2] Skinner H.C.W.: Mineralogical Magazine 2005; 69: 621-41.  
 [3] Murugan R., Ramakrishna S., Panduranga Rao K.: Mater. Lett. 2006; 60: 2844-47.  
 [4] Warren B.E., Averbach B.L.: J. Appl. Phys. 1953; 21: 595-599.  
 [5] Bertoni E., Bigi A., Cojazzi G., Gandolfi M., Panzavolta S., Roveri N.: J. Inor. Biochem. 1998; 72: 29-35.  
 [6] Pasteris J.D., Wopenka B., Valsami-Jones E.: Elements 2008; 4: 97-104.  
 [7] Wopenka B., Pasteris J.D.: Mat. Sci. Eng. C-Bio S 2005; 25: 131-143.  
 [8] Handschin R.G., Stern W.B.: Bone 1995; 16: 355S-363S.

# RESULTS FOR MODERN BANDAGING MATERIALS APPLICATION IN ALVEOLITIS TREATMENT

SHEVELA T.L., POHODENKO-CHUDAKOVA I.O., GROSHEV E.Y.

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,  
 BELARUSIAN COLLABORATING CENTER EACMFS,  
 220025, MINSK,  
 KOSSMONAVTOV STR., 9 – 1 – 63, PO Box 286.  
 REPUBLIK OF BELARUS,  
 IP-C@YANDEX.RU

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 13-14*]

## Introduction

A small pain appears in the postoperative wound after the tooth extraction and when the anesthesia effect is not active. Its intensity depends on the operation severity. Alveolitis is forming after the alveolar socket injury and its gum crushing as a result of the postoperative treatment disturbance when the blood clot is washed out from the alveolar socket during the mouth wash. Microorganisms of the oral cavity penetrate into it and provoke its inflammation [1, 2].

Food ingress into the alveolar socket, not keeping of the oral cavity hygiene also provoke the alveolitis development. This complication is due to the following factors: periodont tissues injuries of the extracted tooth when the microcirculation is violated into it; infected tooth into the alveolar socket, dental deposit; infection-inflammatory focus in the region of the apical or marginal periodontitis; reduction of the activity level of the of the antimicrobial local system of the oral cavity protection. An iodoform turunda was used by surgeon-stomatologist during long time for treatment of alveolitis during surgery hours. This preparation had good recommendations as a banding material used for many years. But the turunda manufacture is a complicated process because not all pharmaceutical products are available. Iodoform turunda contains of diethyl ether, glycerin, anesthesin powder, iodophor, 70% alcohol, which are not used for alcohol production for medical purposes. Special equipment is required for this medicine storage - vessel in dark glass with lapped head. Now Borisov Plant for Medical Preparations produces banding materials such as «Diosept», «Kombiksin», «Protzelan» (FIG. 1). Above-stated confirms the topicality of this subject.

Aim of the work was to make comparative research and evaluation of the banding materials «Diosept», «Kombiksin», «Protzelan» effectiveness. In order to realize this aim we emphasized next subjects:

- 1) to appreciate application effectiveness of the banding material of «Kombiksin» in maxillofacial surgeon practice;
- 2) to appreciate application effectiveness of the banding material of «Diosept» in maxillofacial surgeon practice;
- 3) to appreciate application effectiveness of the banding material of «Protzelan» in maxillofacial surgeon practice;
- 4) to make comparative assessment of the banding materials application during the treatment of alveolitis.

## Objects and methods

We made clinical examination of 32 patients with alveolitis during September, 2010 - April, 2011 in the Minsk Central Region Polyclinic Nr 14. All patients were divided into groups

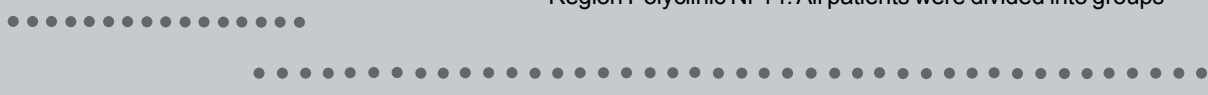




FIG. 1. Bandaging materials: a - «Diosept», b - «Kombiksin», c - «Protzelan».

according to the treatment methods: «Kombiksin» banding material was used for treatment of 10 patients, 11 patients were treated with «Diosept» and 11 patients were treated with «Protzelan» (FIG. 2).

We also studied the presence of the pain syndrome subjectively. We checked without bias during the examination the presence of the mucous tunic edema of the alveolaris appendix, its hyperemia, presence of the necrotic deposit in the region of the alveolar socket of extracted tooth. Results evaluation was performed on the third day of the preparations of control application.

**Results**

During the treatment we discovered that during application of preparations «Diosept», «Kombiksin», «Protzelan» the «Protzelan» was effective for wound infection treatment. The first day of the treatment with «Protzelan» patients had the absence of pain in the region of the socket. By the third day, reduction of clinical indices of infection was checked (reduction of edema, necrotic exudation from the socket, hyperemia of the mucous tunic of the alveolar socket). Necrotic deposit was not absolutely found in the socket by the second day of examination. Socket cicatrization passed without development of the evident pain syndrome and local inflammatory reaction of the mucus tunic.

**Conclusion**

Clinical examination after the application of banding materials of «Diosept», «Kombiksin», «Protzelan» during the out-patient reception hours by surgeon-stomatologist, confirm effectiveness of those preparations application during the treatment of the alveolitis by surgeons. Complex banding materials «Diosept», «Kombiksin», «Protzelan» in outpatient maxillofacial surgery hours could be used as preparations of choice composed of the complex treatment of alveolitis.

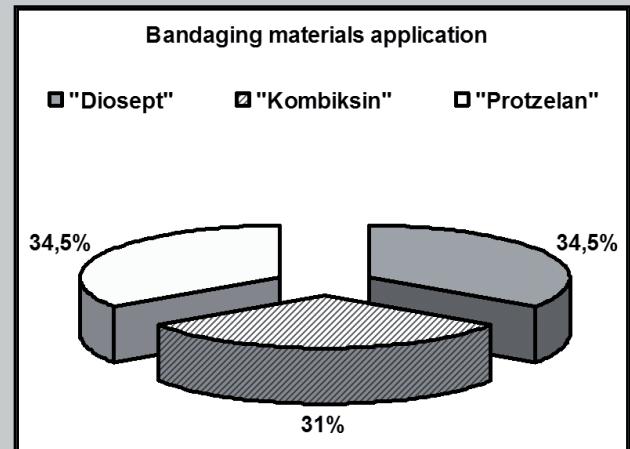


FIG. 2. Percentage of examined patients.

TABLE 1. Comparative evaluation of the dynamics of subjective and objective indices dynamics when «Diosept», «Kombiksin», «Protzelan» applied by the 3 day of the tretment accordingly to each group of control.

Indices	«Kombiksin»	«Diosept»	«Protzelan»
Pain syndrome	No pain	No pain	No pain
Edema	Not fixed	Not fixed	Not fixed
Hyperemia	3 patients had it	1 paatient ahd it	Not fixed
Necrotic deposit	Not found	Not found	Not found

**References**

- [1] Robustova, T.G.: Surgical stomatology: Manuel / Under red. T.G. Robustova. – Medicine, 1990. 576 p.
- [2] Soloviev M.M.: Propaedeutics of the surgical stomatology: man. / M.M. Soloviev – M. : MEDpress-inform, 2007. 264 p.



# ELEKTROCHEMICZNA ODPORNOŚĆ KOROZYJNA STOPÓW NiTi

B. ŁOSIEWICZ<sup>1</sup>, Z. LEKSTON<sup>1</sup>, M. FREITAG<sup>1</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>,  
J. LELAŃKO<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA, POLSKA  
E-MAIL: BOZENA.LOSIEWICZ@US.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 15-17*]

## Wstęp

Stopy NiTi stosowane na implanty medyczne muszą wykazywać wystarczającą elektrochemiczną odporność korozyjną na działanie środowiska organizmu ludzkiego w celu utrzymania strukturalnej integralności i funkcjonalności implantu oraz zminimalizowania wydzielania się toksycznych substancji, które w przeciwnym razie mogą wchodzić w niepożądane reakcje z otaczającymi tkankami. Jednym z wyzwań stawianych w produkcji implantów medycznych jest zastosowanie krótkoterminowych badań in vitro do oszacowania długoterminowego in vivo zachowania korozyjnego implantów. Obecnie preferowaną metodą określania korozyjnego zachowania in vitro zarówno gotowych implantów jak i ich podelementów jest norma międzynarodowa ASTM F2129-08 [1]. Jest to niszcząca metoda badań, która pozwala oszacować podatność na korozję małych, metalicznych implantów medycznych za pomocą cyklicznej polaryzacji potencjodynamicznej. Norma ta jest przeznaczona do badań małych implantów wykonanych z metali lub ich stopów, wykazujących stosunkowo wysoką odporność na korozję. W prezentowanej pracy podsumowano wyniki doświadczalne dotyczące określania elektrochemicznej odporności korozyjnej stopów NiTi uzyskane zgodnie z normą ASTM F2129-08 [1].

## Elektrochemiczne badania korozyjne medycznych implantów niti

Zgodnie z normą ASTM F2129-08 [1] w badaniach elektrochemicznych próbka metalowa (elektroda pracująca) jest ekspozycja w roztworze fizjologicznym w naczyniu badawczym, w którym umieszczana jest również elektroda odniesienia (nasycony kalomel) i przeciwelektroda. Potencjostat jest podłączony do tych trzech elektrod, a skanuje się potencjał elektrody pracującej w odniesieniu do elektrody referencyjnej. Doświadczalnie rejestrowany jest prąd pomiędzy elektrodą pracującą i przeciwelektrodą. Każda próbka przed rozpoczęciem cyklicznej polaryzacji jest ekspozycja w odpowietrzonym i ogrzanym roztworze przez 1h przy potencjale obwodu otwartego ( $E_{oo}$ ). Skanowanie rozpoczyna się przy potencjale o 100 mV bardziej ujemnym względem  $E_{oo}$ , a następnie kontynuowane jest z szybkością polaryzacji 1 mV/min w kierunku anodowych potencjałów, rejestrując przejście katodowo-anodowe, aż do potencjału przebiecia ( $E_{pb}$ ), przy którym pojawiają się wżery. Następnie kierunek skanowania jest odwracany i pomiar przebiega w kierunku potencjałów katodowych aż do potencjału ochronnego lub ustalonej wartości końcowej prądu (RYS. 1a). Taki skan jest później przedstawiany w układzie pół-logarytmicznym, który zezwala na analizę kluczowych wartości prądu

# ELECTROCHEMICAL CORROSION RESISTANCE OF NiTi ALLOYS

B. ŁOSIEWICZ<sup>1</sup>, Z. LEKSTON<sup>1</sup>, M. FREITAG<sup>1</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>,  
J. LELAŃKO<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,  
141 WOŁOSKA STR. 141, 02-507 WARSAW, POLAND  
E-MAIL: BOZENA.LOSIEWICZ@US.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 15-17*]

## Introduction

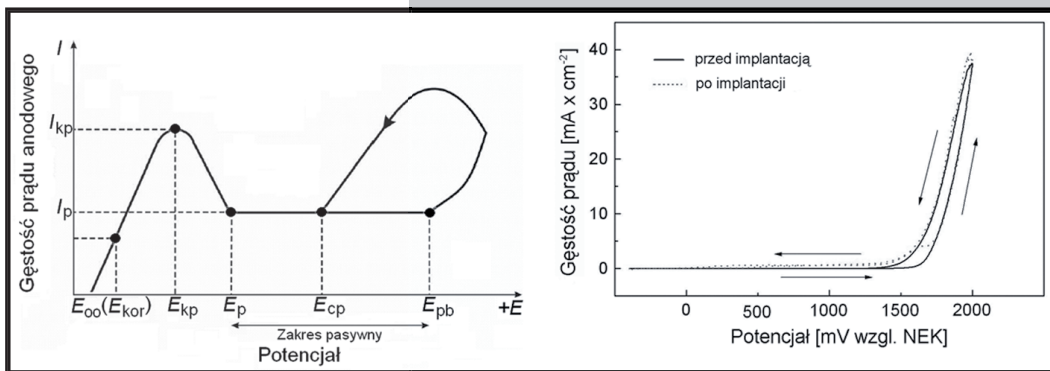
NiTi alloys used as medical implants must exhibit sufficient electrochemical corrosion resistance to the environment presented by the human body to maintain their structural integrity and functionality, as well as to minimize the release of toxic substance that otherwise might react adversely with surrounding tissues. One of the challenges faced by medical-implant manufactures is the use of short-time in vitro data to evaluate the long-term in vivo corrosion performance of implants. At present, the ASTM International Standard F2129-08 [1] is the preferred method for evaluating the in vitro corrosion performance of both finished implants and their subcomponents. This is a destructive test which assesses the corrosion susceptibility of small, metallic, implant medical devices, or components thereof, using cyclic potentiodynamic polarization. This standard is intended for use on implantable devices made from metals and their alloys with a relatively high resistance to corrosion. The presented work summarizes experimental results concerning determination of electrochemical corrosion resistance of NiTi alloys using the ASTM F2129-08 standard [1].

## Electrochemical corrosion testing of medical niti implants

In accordance with the ASTM F2129-08 standard [1] in the electrochemical tests, a metal specimen (working electrode) is exposed to the physiological solution in a test cell fitted with a reference electrode (saturated calomel) and a counter electrode. The potentiostat is connected to these three electrodes, and the potential of the working electrode, with respect to the reference, is scanned. The resulting current between the working and counter electrodes is recorded. Each sample is exposed to the deaerated and heated solution for 1h at open-circuit potential ( $E_{ocp}$ ) prior to commencing the cyclic polarization scan. Scans begin at 100 mV negative to the  $E_{ocp}$ , then proceed in a forward direction at 1 mV/min through the cathodic/anodic transition and continue on to a potential of breakdown ( $E_{pb}$ ) at which pits start occur. At a present current the scan direction is reversed and proceeds in the negative direction until a protection potential is found or the preset final current is achieved (FIG. 1a). This scan is then plotted on a semi-log graph, allowing the resulting polarization curve to be analyzed for key-point voltages or currents. The hysteresis loop formed by polarization curve is an indication of the susceptibility of the tested material to pitting corrosion. The best performing materials in terms of pitting corrosion have relatively little or no hysteresis effect. Theoretical anodic polarization curve and an example of the experimental anodic polarization scan for the NiTi alloy passivated in steam autoclave that

i potencjału na krzywej polaryzacji. Pętla histerazy utworzona przez krzywą polaryzacji wskazuje jak duża jest podatność badanego materiału na korozję wżerową. Materiały o najwyższej odporności na korozję wżerową posiadają stosunkowo małą pętlę histerazy lub wykazują brak efektu histerazy. Teoretyczna krzywa polaryzacji anodowej oraz przykład doświadczalnego skanu anodowego dla stopu NiTi pasywowanego w parowym autoklawie, wykazującego bardzo małą pętlę histerazy, przedstawiono odpowiednio na RYS.1 a i b.

Kluczowe wyniki elektrochemicznej odporności korozyjnej stopu NiTi pasywowanego w autoklawie [2] oraz po procesie niskotemperaturowego azotowania (poniżej 400°C) [3,4] i tlenoazotowania jarzeniowego [5-7] zestawiono w TAB.1.



**RYS. 1. Teoretyczna (a) i doświadczalna (b) krzywa polaryzacji anodowej dla klamry NiTi pasywowanej w autoklawie przed i po 6 miesiącach implantacji w organizmie pacjenta [2].**  
**FIG. 1. Theoretical (a) and experimental (b) anodic polarization curve for NiTi staple passivated in autoclave before and after 6 months of implantation in the patient organism [2].**

exhibits a very small hysteresis loop [2] is shown in FIGS. 1a and b, respectively.

Key-point data of electrochemical corrosion resistance for the NiTi alloy passivated in autoclave [2], after low-temperature glow discharge nitriding (below 400°C) [3,4] and nitriding/oxidizing [5-7], are summarized in TAB.1.

The best parameters of corrosion resistance were revealed for NiTi alloys covered with the layers of a relatively

**TABELA 1. Kluczowe dane elektrochemiczne dla stopu NiTi po pomiarach potencjodynamicznych [2-7].**

**TABLE 1. Key-point electrochemical data for NiTi alloy from the potentiodynamic measurements [2-7].**

\*RSBF and TSBF is Ringer's and Tyrode's simulated body fluid, respectively.

Modyfikacja stopu NiTi NiTi alloy modification	Parametry procesu / Parameters of the process	$E_{OO}$ (mV)	$E_{pb}$ (V)	$J_{pb}$ (mA/cm <sup>2</sup> )	Roztwór Solution*
Sterylizacja w autoklawie Sterilization in autoclave	3,5 min – przed implantacją / before implantation	-245	1,98	33,4	Ringer'a
	3,5 min – po implantacji / after implantation	-298	1,98	33,1	Ringer'a
	90 min	-479	1,93	27,3	Tyrode'a
Niskotemperaturowe azotowanie jarzeniowe Low-temperature glow discharge nitriding	300°C/10min	-365	2,39	7,5	Tyrode'a
	300°C/1h	-455	2,41	12,3	Tyrode'a
	300°C/1h, chłodzenie w H <sub>2</sub> / cooling in H <sub>2</sub>	-394	2,36	13,5	Tyrode'a
	350°C/10min	-321	3,24	37,1	Tyrode'a
	400°C/5min	-80	2,10	-	Tyrode'a
Niskotemperaturowe tlenoazotowanie jarzeniowe Low-temperature glow discharge nitriding/oxidizing	200°C/10min	-382	2,21	53,4	Tyrode'a
	250°C/10min	-471	2,36	12,2	Tyrode'a
	250°C/10min (więcej O <sub>2</sub> ) / (more O <sub>2</sub> )	-339	2,35	4,6	Tyrode'a
	380°C/15min/N <sub>2</sub> +5%powietrza/ air	-83	1,94	-	Tyrode'a
	Grzanie / Heating Ar+H <sub>2</sub> /300°C/1,5h/N <sub>2</sub> +300°C/30min/O <sub>2</sub>	-145	2,42	24,8	Tyrode'a
	Grzanie / Heating 5%H <sub>2</sub> /350°C/1,5h/N <sub>2</sub> +400°C/15min/O <sub>2</sub>	-8	2,87	-	Tyrode'a

Najlepsze parametry odporności korozyjnej wykazują stopy NiTi pokryte warstwami o stosunkowo dużej grubości, wytworzonymi w procesie jarzeniowym w temp. powyżej 300°C. W tych warunkach uzyskiwano potencjały przebiccia nawet powyżej 3V. Wartości  $E_{pb}$  wzrastają wraz z grubością warstw. Uwzględniając strukturę otrzymanych warstw oraz fakt tworzenia się warstwy pośredniej złożonej z fazy międzymetalicznej Ni<sub>3</sub>Ti lub Ni<sub>2</sub>Ti [3,4] można stwierdzić, że warstwy te mogą poprawiać właściwości ciernie oraz biotolerancję stopów NiTi, jednak tylko tych stosowanych bez wykorzystywania zjawiska pamięci kształtu. W innych przypadkach należy stosować proces jarzeniowego otrzymywania warstw w temperaturach do 300°C. Zarówno azotowane jak i tlenoazotowane warstwy otrzymywane w takich warunkach wykazują stosunkowo wysoką odporność korozyjną, gdzie wartości  $E_{pb}$  wynoszą ok. 2,2-2,3V i są wyższe

large thickness, obtained in the glow discharge process at temperatures above 300°C. For these conditions, the breakdown potential even above 3V were obtained. The  $E_{pb}$  values increase with increasing the layer thickness. Taking into account both the structure of the obtained layers and the fact that a sublayer consisting of a Ni<sub>3</sub>Ti or Ni<sub>2</sub>Ti intermetallic phase is formed [3,4], it can be ascertained that these layers are able to improve frictional properties and biotolerance of NiTi alloys, however, only those applied without the use of the shape memory phenomenon. In other cases, the process of glow discharge at temperatures up to 300°C should be used for the obtaintment of layers. The nitrided and oxynitrided layers alike obtained at such temperatures exhibit a relatively high corrosion resistance, where the  $E_{pb}$  values are around 2.2-2.3V and are higher as compared to the  $E_{pb}$  of ~2.0V that are observed for the layers formed by sterilization in autoclave.

niż w przypadku  $E_{pb}$  ok. 2,0V uzyskiwanych dla warstw otrzymywanych przez sterylizację w autoklawie.

## Podsumowanie

Poprawa elektrochemicznej odporności korozyjnej stopów NiTi przeznaczonych na implanty medyczne wykorzystujące efekt pamięci kształtu może zostać uzyskana poprzez wytworzenie warstw ochronnych zdolnych do odkształceń związanych z indukowaniem tego efektu. Dla potrzeb krótkoterminowych wszczepów wystarczająca jest szybka pasywacja w autoklawie parowym, która pozwala na otrzymanie cienkich, amorficznych i samorepasywujących się warstw ochronnych, zdolnych do zastosowań w warunkach dynamicznych. Dla wszczepów długoterminowych korzystniejsze parametry odporności korozyjnej wykazują warstwy otrzymywane w procesie jarzeniowym prowadzonym w temperaturach do 300°C.

## Summary

The improvement of electrochemical corrosion resistance of NiTi alloys intended for medical implants utilizing the shape memory effect can be obtained by the formation of protective layers that are able to deformations connected with the induction of this effect. For the needs of short-term implants fast passivation in steam autoclave is sufficient that allows to obtain thin, amorphous and self-repassivating protective layers which are able to work under dynamical conditions. For the long-term implants, more advantageous parameters of corrosion resistance are revealed by the layers obtained in the glow discharge process carried out at temperatures up to 300°C.

## Piśmiennictwo

- [1] ASTM F2129-08 - Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices.  
 [2] Z. Lekston, B. Łosiewicz, A. Winiarski, M. Jędrusik-Pawłowska, M. Kromka-Szydek, K. Miernik, Inżynieria Biomateriałów (Engineering of Biomaterials) 96-98 (2010) 29-33.  
 [3] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Proceedings of ESOMAT 2009, 05020 (2009), DOI:10.1051/esomat/200905020.  
 [4] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Inżynieria Materiałowa 5(171) (2009) 429-432.

## References

- [5] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, Inżynieria Biomateriałów (Engineering of Biomaterials) XII (89-91) (2009) 40-42.  
 [6] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Solid State Phenomena 163 (2010) 127-130.  
 [7] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, Inżynieria Materiałowa 3(175) (2010) 348-351.

## POLIMEROWE MATRYCE JAKO NOŚNIKI DO MIEJSCOWEGO UWALNIANIA DOKSYCYKLINY W LECZENIU CHOROÓB PRZYŻĘBIA

ANNA KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK<sup>1</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>,  
MARZENA JAWORSKA-KIK<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA  
E-MAIL: AKOPYTYNSKA\_KASPERCZYK@GO2.PL

### Streszczenie

Celem przedstawionych badań jest ocena przydatności wybranych materiałów polimerowych jako materiału do formowania matryc zastosowanych w procesach kontrolowanego uwalniania doksycykliny. Omówione wyniki stanowią część pracy służącej opracowaniu systemu miejscowego, kontrolowanego uwalniania leków do leczenia chorób przyzębia o etiologii bakteryjnej. Z materiałów biodegradowalnych o określonych własnościach mechanicznych wykonano ma-

## POLYMERIC MATRICES AS CARRIERS FOR LOCAL DOXYCYCLINE DELIVERY DEDICATED FOR PERIODONTAL PURPOSES

ANNA KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK<sup>1</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>,  
MARZENA JAWORSKA-KIK<sup>1</sup>

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

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

### Abstract

Aim of this work is to evaluate chosen polymer materials as means to form matrices for local doxycycline delivery. Described results are part of project that should lead to elaboration of local drug delivery system for periodontal purposes. Periodontal diseases are mainly caused by bacteria and seem to become common health problem. Chosen copolymers have been used to obtain drug containing matrices. Potentially pathogenic bacteria's susceptibility to

tryce zawierające doxycyklinę. Oznaczono wrażliwość potencjalnie patogennych bakterii, odpowiedzialnych za przebieg tych chorób na doxycyklinę. Ocenę kinetyki uwalniania doxycykliny z wybranych matryc przeprowadzono w 28-dniowym eksperymencie *in-vitro* w warunkach imitujących panujące w jamie ustnej. Dokonano wstępnej oceny działania matryc na komórki bakteryjne i wybrano optymalny materiał na nośnik chlorowodoru doxycykliny - kopolimer TMC/ $\epsilon$ -kaprolakton, zapewniający uwalnianie tego leku w okresie 28 dni w dawkach wystarczających na eliminację bakterii patogennych prawdopodobnie odpowiedzialnych za rozwój chorób przyzębia.

**Słowa kluczowe:** periodontitis, miejscowe uwalnianie leku, doxycyklina, biomateriały w stomatologii

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 17-21]

## Wprowadzenie

Choroby przyzębia stanowią współcześnie powszechny problem zdrowotny. Mogą one doprowadzić do przedwczesnej utraty zębów i znacząco obniżyć jakość życia, ale także mogą stanowić utajone wewnątrzpochodne ogniska zakaźne rzutując na zdrowie całego organizmu.

Choroby przyzębia dotyczą tkanek otaczających ząb, a istota choroby polega w początkowym okresie na utracie przyczepu nabłonkowego i stopniowym pogłębianiu szczeliny dziąsłowej aż do wytworzenia patologicznej kieszonki dziąsłowej co w konsekwencji prowadzi do rozluźnienia tkanek utrzymujących ząb w zębodole. W zdecydowanej większości przypadków przyczyną choroby jest źle oczyszczana płytka nazębna, która gromadzi się wzdłuż linii dziąsła i o ile złoży nie zostaną odpowiednio wcześniej usunięte, ulegają wysyceniu tworząc kamień nazębny. Bakterie w nim obecne produkują toksyny, które doprowadzają do degradacji tkanek okołozębnych. Istnieje spora grupa bakterii markerowych dla periodontitis. Spośród nich najlepiej udokumentowane są tzw. „czynniki schorzenia przyzębia” (ang. agents of periodontal disease): *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannerella forsythensis* – syntetyzują one najwięcej czynników wirulencji [1]. Boopathy w swoich badaniach na 9 z 17 pobranych wymazów poddziąsłowo, wykrył obecność bakterii redukujących siarczany (BRS), w tym *Desulfovibrio* [2].

Należy podkreślić, że choroby przyzębia czynią nieodwracalne szkody w tkankach, a cały wysiłek ich leczenia skupia się na zatrzymaniu postępu choroby.

Obecne wytyczne leczenia za podstawową metodę uznają mechaniczne usuwanie złogów i poprawę higieny jamy ustnej, tak by nie dopuścić do progresji choroby. Mechaniczne usuwanie złogów nad- i poddziąsłowych (scaling & root planning – SRP) ciągle pozostaje najlepszą metodą leczenia [3], jednakże nawet specjalistyczne narzędzia nie zapewniają dostępu do komórek bakteryjnych rezydujących głęboko w tkankach, gdyż ogranicza je głębokość kieszonki dziąsłowej. Dlatego właściwe wydaje się stosowanie antybiotyków w tej sytuacji, aby działać dwukierunkowo. Blisko 40-letnie doświadczenie w stosowaniu antybiotyków ujawniło wady długotrwałego ich przyjmowania (reakcje anafilaktyczne, wyjałowienie przewodu pokarmowego). Odrębny problem stanowi uodparnianie się szczepów bakteryjnych na antybiotyki. Ostatnio w związku z rozwojem biomateriałów, coraz więcej uwagi przywiązuje się do ich zastosowania w medycynie, a szczególnie systemów miejscowego uwalniania leków. Pozwalają one ominąć drogę przewodu pokarmowego i efekt pierwszego przejścia przez wątrobę, a także dystrybucję leku przez system naczyń krwionośnych,

*doxycycline has been tested. In order to estimate doxycycline release kinetics from different matrices, four weeks long experiment has been carried out. The environment of the experiment was supposed to reflect oral cavity conditions. Preliminary estimation of system influence on bacteria has been tested and the optimum material has been chosen- copolymer TMC/ $\epsilon$ -caprolactone. The copolymer provides drug release concentration able to eliminate potentially pathogenic bacteria.*

**Keywords:** periodontitis, local drug delivery, doxycycline, dental biomaterials

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 17-21]

## Introduction

Periodontal diseases are spread widely among society nowadays. They may cause earlier teeth loss and affect life quality significantly, but they may also be hidden source of infections.

Periodontitis refers to tissues surrounding tooth. The main problem initially boils down to epithelial attachment loss and periodontal fissure progression to periodontal pocket – tooth is getting more and more loose. In most cases the reason of the disease is unbrushed dental plaque that accumulates among gingiva line. If not removed, dental plaque hardens into calculus. Bacteria present in calculus produce toxins and enzymes responsible for periodontal tissue destruction. There are known some bacterial species recognized as periodontitis markers - agents of periodontal disease : *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannerella forsythensis* [1]. Boopathy has also managed to detect sulfate-reducing bacteria in 9 out of 17 periodontal tissue samples including *Desulfovibrio* [2].

It is important to highlight that treatment effort focuses on not proceeding the disease. Contemporary treatment is based on scaling and root planning (SRP) and oral hygiene improvement. SRP still seems to be the more efficient way of treatment [3], although even specified tools have problems to reach bacteria deep in the periodontal pocket. That is why it seems to be reasonable to use antibiotics in periodontal treatment as a helpful way of treatment. Almost 40 years of experience have revealed disadvantages of long-term antibiotics use. Another issue is bacteria getting resistant to antibiotics. Recently thanks to biomaterials development more attention has been paid to their use for medical purposes, especially as local drug delivery systems. They enable to avoid digestive system and blood vessels transport to tissues which lead to decrease in final drug concentration. Local drug delivery systems for periodontal purposes may occur as strips, matrices, gel or fibers placed directly into periodontal pocket.

Modern therapy needs new solutions convenient for doctors and patients as well. Local drug delivery systems seems to fulfill basement requirements. Drug carriers are obtained from natural and man-made sources. Achievements in polymer science enabled use of biocompatible and biodegradable man-made polymers that may be modified by changing their chain structure and by comonomeric units distribution in polymeric chain. This is why it is possible to obtain drug carrier that would release proper drug dosage at proper period of time [4,5]. Bioresorbable materials are getting more and more popular owing to their degradation to non-toxic forms inside human body. They are commonly used in medicine as surgical sutures, bone implants and scaffolds [6,7].

które skutkują obniżeniem stężenia leku w tkankach docelowych. Systemy miejscowego uwalniania mogą mieć postać pasków, błon, włókien lub żeli umieszczanych bezpośrednio w kieszonce dziąsłowej.

Współczesna terapia poszukuje rozwiązań dogodnych zarówno dla lekarza (optymalizacja pracy i polepszenie rezultatów klinicznych), jak i dla pacjenta (uproszczona aplikacja i poprawa komfortu leczenia). Systemy miejscowego uwalniania leku wydają się spełniać powyższe postulaty. Osiągnięcia w dziedzinie polimerów pozwoliły wykorzystywać w formowaniu nośników leków biokompatybilne i biodegradowalne syntetyczne polimery, które można modyfikować poprzez skład, budowę czy morfologię, wychodząc naprzeciw różnorodnym farmakologicznym i biologicznym zapotrzebowaniom. Przy zastosowaniu wybranego materiału polimerowego, możliwe jest otrzymanie nośnika leku, który pozwala na sterowanie czasem i dawką podawanego tego leku, bez czynnego udziału chorego [4,5]. Materiały bioresorbowalne na bazie poliestrów alifatycznych z uwagi na degradację do form nietoksycznych oraz hydrolizę wewnątrz organizmu, stosowane w codziennej praktyce lekarskiej jako nici chirurgiczne, implanty kostne czy gąbki [6,7], a więc o sprawdzonej biokompatybilności, są w grupie materiałów polimerowych najbardziej interesujące.

## Materiały i metody

Jako substancję leczniczą do wprowadzenia do biodegradowalnych matryc wybrano doksyicylinę - antybiotyk z grupy tetracyklin [8]. W przeprowadzonych wstępnych badaniach stwierdzono dużą skuteczność tego leku w zwalczaniu wybranych potencjalnie patogennych szczepów bakterii, co również potwierdzają wcześniejsze dane literaturowe [9,10,11]. O wyborze tego leku zdecydowała również jego duża dostępność i niska cena, oraz co było najważniejsze bardzo dobra rozpuszczalność zarówno w wodzie, jak i w stosowanych kopolimerach jonowej formy tego związku; chlorowodorku doksyicyliny. Zjawisko to zapewniało relatywnie szybkie uwalnianie leku, już w początkowej fazie. W badaniach wykorzystano chlorowodorek doksyicyliny firmy Sigma (Doxycycline hyclate D9891). Celem wyznaczenia wartości referencyjnej, która pozwoliłaby potem oceniać skuteczność działania systemu bezpośrednio na kolonie bakterii, konieczne było oznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost potencjalnie patogennych bakterii [2] (na których będzie prowadzona ocena działania systemu) dla doksyicyliny (Minimum Inhibitory Concentration – MIC). Oznaczenie MIC wykonano metodą rozcieńczeń w agarze.

Matryce w formie cienkich folii formowano przez wylewanie na płaszczyznę roztworów polimerowych, zawierających rozpuszczony lek i odparowanie rozpuszczalnika. W tym celu zsyntetyzowano biodegradowalne kopolimery stosując jako monomery cykliczne laktony: glikolid, (GL)  $\epsilon$ -kapolakton ( $\epsilon$ -CL) oraz cykliczny węgiel: węgiel tri metylenu (TMC) o różnych udziałach jednostek monomerycznych: 10% GL/90%  $\epsilon$ -CL, 50%TMC / 50%  $\epsilon$ -CL, 20%TMC / 80%  $\epsilon$ -CL. Kopolimery TMC/ $\epsilon$ -kapolakton otrzymano stosując jako inicjator kopolimeryzacji niskotoksyczny acetylacetonian cynku (II), w wypadku kopolimeru glikolid/ $\epsilon$ -kapolakton inicjatorem był również nietoksyczny acetylacetonian cyrkonu (IV) [12]. Odpowiednio prowadzony proces syntezy zapewnił otrzymanym kopolimerom multiblokową strukturę łańcucha i amorficzność, co wiązało się z ich wysoką elastycznością (maksymalne wydłużenie powyżej 300% dla wszystkich badanych próbek) i wytrzymałością na rozciąganie wyższą od 10MPa. O wstępnym doborze własności tych kopolimerów zdecydowały potrzebne, w wypadku

## Materials and methods

The drug chosen for the experiment was doxycycline – one of the tetracyclines [8]. Doxycycline effectiveness to periodontal pathogenic bacteria and its therapeutic use has been previously described [9,10,11] All of the examinations have been carried out on doxycycline hydrochloride by Sigma (Doxycycline hyclate D9891). The reason to choose this drug was its low price, common use and good solubility in water what resulted in proper and relatively fast drug release in the beginning. It was necessary to estimate minimum inhibitory concentration (MIC) for doxycycline that *D. desulfuricans* (potentially pathogenic bacteria) [2] are susceptible to. MIC estimation has been carried out at Department of Biopharmacy (Medical University of Silesia) by broth microdilution method.

Matrices as thin foils has been shaped by pouring polymers solutions containing drug into forms. The biodegradable copolymers for matrices have been synthesized in Centre of Polymer and Carbon Materials Polish Academy of Sciences. Copolymers samples with following co-monomeric units content have been obtained: 10% glycolide / 90%  $\epsilon$ -CL, 50%TMC / 50%  $\epsilon$ -CL, 20%TMC / 80%  $\epsilon$ -CL. Copolymers TMC /  $\epsilon$ -CL were obtained by use of low-toxic zinc (II) acetylacetonate initiator and glycolide /  $\epsilon$ -CL copolymers were obtained by use of zirconium (IV) acetylacetonate initiator [12]. Proper conditions of synthesis resulted in multiblocks chain structure and amorphousness of the copolymers. They are highly elastic ( maximum elongation above 300%) and resistant to extension above 10 MPa. These properties were necessary to form subgingival rings as drug carrier. Previously synthesized copolymers lactide / glycolide and lactide /  $\epsilon$ -CL were not suitable for the predicted system. The copolymers containing 5% of weight doxycycline were manufactured in a form of foil by solvent casting. Samples were round with 10x10 mm diameter. The samples were used in in vitro doxycycline release kinetics measurements. Each sample has been placed in amount of artificial saliva and stored in 37°C continuously being shaken for gingival pocket conditions simulation .

The experiment has lasted 28 days . During initial 2 weeks artificial saliva with the doxycycline released Has been collected and replaced everyday and frozen until drug concentration measurements. Beginning with the third week of the experiment, saliva Has been collected and replaced once a week. After the experiment matrices have been dried and its degradation has been detected by NMR spectroscopy.

The following part of the experiment was evaluation of their bactericidal effectiveness. Matrices have been placed in 0,5 Mc Farland bacteria's inoculum. Bacteria have been cultivated before adding doxycycline to inoculum to confirm their growth without doxycycline. After having added the released doxycycline bacteria have been inoculated onto prepared plates. Plates have been stored in anaerobic chamber for 48 hours. Presence of growth or growth inhibition have been examined for each matrix.

## Results and discussion

*D. desulfuricans* susceptibility to doxycycline has been estimated at MIC level of 0,12  $\mu$ g/ ml.

The artificial saliva with released doxycycline that Has been collected, was used to measure drug concentration in medium by means of Jasco V-570 spectrophotometer in Centre of Polymer and Carbon Materials Polish Academy of sciences. FIGURE 1. shows comparison of accumulative diagrams of doxycycline amounts released from different matrices during 28 days.

formowania docelowych nośników leku w formie pierścieni dokieszonkowych, własności mechaniczne tych kopolimerów, tj. dobra wytrzymałość na rozciąganie i co najważniejsze bardzo duża elastyczność. Warunku tego nie spełniały specjalnie wcześniej syntezowane kopolimery laktydu z glikolidem, ani laktydu z  $\epsilon$ -CL. Wykonano folie z kopolimerów z zawartością 5% wag. doksycykliny, z których następnie wycięto krążki o średnicy 10 mm i grubości 1 mm. Wykonane matryce posłużyły do oceny kinetyki uwalniania doksycykliny z wybranych materiałów. Matryce z każdej serii umieszczono w szczelnie zamykanych fiolkach. Jako medium do uwalniania leku wybrano roztwór zwany dalej sztuczną śliną, który składem ilościowym i jakościowym zbliżony był do ludzkiej śliny. Dla jeszcze lepszego odwzorowania warunków panujących w jamie ustnej, fiołki z próbkami umieszczono w ciepłarnie w temperaturze 37°C w wytrząsarce, której ruchy imitowały ciągły przepływ płynu dziąsłowego w szczelinie dziąsłowej.

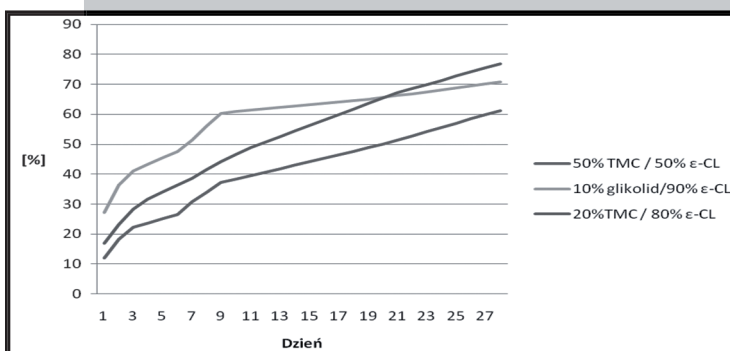
Za okres trwania eksperymentu przyjęto 28 dni. W początkowym okresie eksperymentu, tj. w pierwszych dwóch tygodniach, medium z uwolnionym do niego lekiem zbierano codziennie w 24-godzinnych odstępach czasu i umieszczano w probówkach typu Eppendorf. Do czasu pomiaru stężenia uwolnionego leku, zbierane medium było przechowywane w temperaturze -80°C. W miejsce zebranego medium codziennie umieszczano w fiołce nową objętość sztucznej śliny. Począwszy od trzeciego tygodnia badania, medium wymieniane było raz w tygodniu. Po zakończeniu eksperymentu matryce suszono i wykonano analizę 1H NMR celem oceny ich degradacji. Poziom uwolnionej doksycykliny oznaczano metodą spektroskopii absorpcyjnej UV-VIS-NIR na spektrofotometrze JASCO V-570 w CMPIW PAN w Zabrze.

Kolejnym etapem badań była wstępna ocena działania wybranych matryc z lekiem na bakterie. W tym celu matryce z lekiem wykonane z poszczególnych materiałów umieszczano w zawieszynie bakterii o znanym stopniu zmętnienia w skali Mc Farland. Przed umieszczeniem próbek w inokulum wykonano posiewy na szalkach z podłożem, które następnie inkubowano w warunkach beztlenowych przez 48 godzin. Po upływie 48 godzin wykonano pasaż zawiesin bakteryjnych z uwolnioną do nich doksycykliną na oddzielne płytki z podłożem i również umieszczono w komorze beztlenowej. Po 48 godzinach dokonywano odczytu wzrostu bakterii na płytkach odpowiadających doksycyklinie uwolnionej z poszczególnych materiałów.

## Wyniki i dyskusja

Bakterie *D. desulfuricans* wykazały się sporą wrażliwością na doksycyklinę, gdyż zahamowanie ich wzrostu zaobserwowano już na poziomie MIC 0,12  $\mu$ g/ml.

Zbierane medium w trakcie badania kinetyki uwalniania leku, posłużyło do oznaczenia stężenia doksycykliny uwolnianej dobowo do sztucznej śliny. Porównanie wykresów kumulacyjnych uwolnionej doksycykliny z poszczególnych matryc polimerowych przedstawia RYS.1. W wypadku wszystkich zastosowanych matryc zaobserwowano szybkie uwalnianie doksycykliny, co pozwalało na uwolnienie od ponad 60% (kopolimer glikolid/ $\epsilon$ -kaprolakton) do 70-80% (kopolimery  $\epsilon$ -kaprolakton/TMC) całkowitej ilości leku w ciągu 28 dni. W wypadku matryc zbudowanych z kopolimerów kaprolakton/TMC proces ten dodatkowo był równomierny już od 3 dnia eksperymentu. Przeprowadzone wstępne badania oceny skuteczności omówionych matryc jako nośników doksycykliny wykazały, że matryca 20%TMC



RYS. 1. Porównanie wykresów kumulacyjnych doksycykliny uwolnionej z matryc wykonanych z trzech różnych kopolimerów: 10% glikolid/90%  $\epsilon$ -CL, 50%  $\epsilon$ -CL / 50%TMC, 20%TMC / 80%  $\epsilon$ -CL.

FIG. 1. Comparison of cumulative graphs of doxycycline released from matrices made of three different copolymers: 10% glycolide/90%  $\epsilon$ -CL, 50%  $\epsilon$ -CL / 50% TMC, TMC 20% / 80%  $\epsilon$ -CL.

TABELA 1. Porównanie skuteczności poszczególnych matryc jako nośników doksycykliny na podstawie zahamowania wzrostu bakterii po 48-godzinnym okresie inkubacji.

TABLE 1. Comparison of the effectiveness of these matrices as doxycycline carriers based on inhibition of bacterial growth after 48-hour incubation period.

Obecność kolonii bakteryjnych po 48h (The presence of bacterial colonies after 48 hours)	Rodzaj kopolimeru (The copolymer type)		
	10% GL / 90% $\epsilon$ -CL	50%TMC/50% $\epsilon$ -CL	20%TMC/80% $\epsilon$ -CL
	+	+	-

Each matrix has released drug fastly – from 60% (copolymer glycolide/  $\epsilon$ -caprolactone) to 70-80% ( copolymer TMC/  $\epsilon$ -caprolactone ) within 28 days. In case of TMC/  $\epsilon$ -caprolactone matrix the process was regular since third Day of the experiment.

Bactericidal effectiveness confirmation experiment has shown surprising results (TABLE 1).

With doxycycline released bacteria have shown no growth after 48 hours of incubation in anaerobic conditions only for 20%TMC / 80%  $\epsilon$ -CL matrix. This was not the material that has released the highest drug amount in in vitro release kinetics measurements.

## Conclusions

At the basis on drug release profile from chosen matrices, presence of burst effect and released drug dosages, it seems that 20%TMC / 80%  $\epsilon$ -CL matrix is suitable drug carrier for the system. In in vitro research reflecting oral cavity conditions, it was the material with the best drug release profile close to linear and apart from burst effect

/ 80%  $\epsilon$ -CL jako jedyna uwolniła dawkę leku, która spowodowała całkowite zahamowanie wzrostu bakterii w odczynie po wymaganych 48 godzinach

## Wnioski

Na podstawie profilu uwalniania doksycykliny z poszczególnych matryc (obecność lub brak zjawiska burst effect) i dawek uwalnianego leku, należy uznać, że matryca wykonana z kopolimeru 20%TMC / 80%  $\epsilon$ -CL jest najbardziej optymalnym nośnikiem doksycykliny dla założonego systemu. W warunkach in vitro zbliżonych do tych, jakie panują w środowisku jamy ustnej, ta właśnie matryca wykazała się optymalnym profilem uwalniania leku zbliżonym do liniowego i za wyjątkiem zjawiska burst effect w drugiej dobie badania, nie wykazywała większych fluktuacji uwalniania podczas całego eksperymentu. W przypadku antybiotykoterapii jest to zjawisko bardzo korzystne, gdyż wahania stężeń doksycykliny mogłyby doprowadzić do ponownego namnażania się bakterii, a także ich uodpornienia na zastosowany lek. Ponadto w ocenie działania wybranych matryc na kolonie bakteryjne, to właśnie z tej matrycy została uwolniona skuteczna dawka doksycykliny równa lub większa od MIC, która spowodowała, że nie zaobserwowano wzrostu kolonii bakteryjnych po 48-godzinym okresie inkubacji. Na obecnym etapie badań matryca 20%TMC/80%  $\epsilon$ -CL wydaje się spełniać wszystkie niezbędne warunki wymagane do skonstruowania biodegradowalnego systemu z kontrolowanym uwalnianiem doksycykliny przeznaczonym do leczenia chorób przyzębia. W odróżnieniu od już dostępnych na rynku systemów tego typu, matryca uwalnia mniej niż 96% zawartego leku w ciągu 48 godzin swego działania oraz degraduje dłużej, nie wymuszając wymiany nośnika leku raz w tygodniu.

## Podziękowania

Praca jest finansowana z funduszy Unii Europejskiej w ramach Regionalnego Funduszu Stypendiów Doktoranckich 2.

(which is in fact wanted situation in antibiotics use) there were no periods of higher drug amounts release.

Taking into consideration the fact that only this matrix resulted in no single bacterial colony growth after 48 hours (amount of drug released equal or higher than MIC), at present stage of work 20%TMC / 80%  $\epsilon$ -CL material seems to be fitting all the requirements of the designed system. Further more it does not involve drug carrier replacement every week and does not release 96% of the contained drug within 48 hours as other systems available on the market.

## Acknowledgments

Researches were conducted with financial support from Regional Scholarship Fund for PhD students RFSD2.

## Piśmiennictwo

- [1] Wolf H., Edith M., Reteitschak K., Periodontologia, wyd. Czelej 2006, 36-37
- [2] Boopathy R., Roichaux M., LaFont D., Howell M., Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket., Can. J. Microbiol. 48, 1099-1103.
- [3] Seymour R.A., Heasman P.A. (1995) Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents. Journal of Dentistry Vol. 23, No. 1, 5-14.
- [4] Oliver A. Scholz i wsp. Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. Drug Discovery Today Volume 13, Numbers 5/6, 247-253.
- [5] Schwabach-Abdellaoui K., Loup P.J., Vivien-Castioni N., Mombelli A., Baehni P., Barr J., Heller J. and Gurny R., Bioerodible Injectable Poly(ortho ester) for Tetracycline Controlled Delivery to Periodontal Pockets: Preliminary Trial in Humans. AAPS Pharm-Sci 2002, 4(4) 20.
- [6] Jelonek K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Biodegradable polymers based on glycolide, lactide,  $\epsilon$ -caprolactone and TMC for long-term controlled delivery of cyclosporine A and sirolimus, Engineering of Biomaterials, 58-60, (2006), 129-132.

## References

- [7] Stokłosa K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Kaczmarczyk B., Various release profiles of tetracyclines as a result of interactions between drug and biodegradable polymer matrix., Engineering of Biomaterials, 58-60, (2006), 203-206.
- [8] Sapadin A.N., Fleischmajer R., Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications, J Am Acad Dermatol 2006;54: 258-65.
- [9] Jańczuk Z., Banach J., Praktyczna periodontologia kliniczna, Wydawnictwo Kwintesencja 2004, 221-232
- [10] Sreenivsan K.P., Gaffar A., Antibacterials as anti-inflammatory agents : Dual action agents for oral health, Antonie van Leeuwenhoek 2008, 93 : 227-239
- [11] Goldstein E., Citron D., Peraino V., Cross S., Desulfovibrio desulfuricans Bacteremia and Review of Human Desulfovibrio Infections, Journal of Clinical Microbiology 2003, Vol. 41 No.6, 2752-2754.
- [12] Dobrzyński P., Mechanism of  $\epsilon$ -caprolactone polymerization and  $\epsilon$ -caprolactone/trimethylene carbonate copolymerization carried out with Zr(Acac)<sub>4</sub>, Polymer 48 (2007) 2263-2279.

## OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI POROWATYCH TRÓJWYMIAROWYCH SKAFOLDÓW KOLAGENOWYCH

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU,  
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,  
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA  
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 22-24*]

### Wprowadzenie

Kość jest materiałem kompozytowym, złożonym z substancji nieorganicznej, organicznej oraz wody. Substancję organiczną tworzą włókna kolagenowe, natomiast minerał stanowi hydroksyapatyt ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HAp) w postaci nanokryształów. Dlatego też hydroksyapatyt oraz kolagen wydają się być odpowiednimi składnikami do wytwarzania biomateriałów służących do rekonstrukcji ubytków kości. Kolagen typu I, ze względu na swoje właściwości, m.in. biokompatybilność, biodegradowalność, jest uważany za jeden z najbardziej użytecznych biomateriałów. Syntetyczny hydroksyapatyt, z uwagi na swe chemiczne i mineralogiczne podobieństwo do substancji nieorganicznej kości i zębów, charakteryzuje się znakomitą biokompatybilnością i bioaktywnością.

### Metodyka

Kolagen otrzymano ze ścięgien młodych szczurów albinosów w warunkach laboratoryjnych. Hydroksyapatyt (nanocząstki, <200 nm) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Przygotowano kompozyt kolagenu i hydroksyapatytu poprzez dodanie odpowiedniej ilości hydroksyapatytu do roztworu kolagenu (stosunek wagowy HAp do kolagenu wynosił 70/30). Metodą liofilizacji otrzymano skafoldy, które następnie usieciowano za pomocą 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu (EDC) i imidu N-hydroksy kwasu bursztynowego (NHS) (RYS.1).

Morfologię porowatych próbek oceniono za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, Anglia). Przed obrazowaniem próbkę zamrożono w ciekłym azocie i przecięto na pół skalpelem, po czym poddano napyleniu złotem.

Obliczono gęstość i porowatość otrzymanego kompozytu metodą wypierania cieczy przez zanurzone w niej ciało. Do pomiarów użyto izopropanol.

Wyznaczono stopień spęcznienia badanego kompozytu. W tym celu zważono suche gąbki kolagenowe ( $W_d$ ), po czym zanurzono je w 5 ml buforu fosforanowego (PBS, pH=7,4) na 2h, 24h, 48h i 72h, w 37°C. Po określonym czasie wyjęto próbki z buforu PBS i ponownie zważono ( $W_w$ ). Stopień spęcznienia ( $E_{sw}$ ) obliczono ze wzoru:

$$E_{sw} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100\%$$

### Wyniki i dyskusja

Metoda liofilizacji pozwala na otrzymanie próbek w postaci trójwymiarowych, porowatych gąbek (skafoldów), które mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej. Na RYSUNKACH 2 a-b przedstawiono zdjęcia SEM otrzymanego kompozytu HAp/Col.

## PREPARATION AND PROPERTIES OF A POROUS THREE- DIMENSIONAL COLLAGEN SCAFFOLDS

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, TORUN ,  
FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,  
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND  
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 22-24*]

### Introduction

Natural bone is a complex inorganic-organic composite material, in which hydroxyapatite nanocrystals ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HAp) and collagen fibrils (Col) are well organized into hierarchical architecture. Synthetic hydroxyapatite and collagen composites (HAp/Col) have the potential in mimicking and replacing skeletal bones. Their combination should be beneficial for bone tissue engineering due to their natural biological resemblance and properties. Collagen type I provides an excellent basis for biomaterials as it is readily available, non-toxic and its fibril architecture is inherent in natural tissues. Synthetic hydroxyapatite (HAp) has excellent biocompatibility and bioactivity due to its chemical and structural resemblance to mineral bone and tooth.

### Materials and methods

Collagen was obtained in our laboratory from tail tendons of young rats. Hydroxyapatite (nanopowder, <200 nm particle size) was supplied by the company of Sigma-Aldrich. The starting materials for the final HAp/Col composite were mixed and the concentration and amount of the starting substances were set for HAp/Col weight ratio to be 70/30. Scaffolds were prepared by lyophilization. The HAp/Col sample was cross-linked using N-(3-dimethylamino propyl)-N'-ethylcarboimide hydrochloride (EDC) combined with N-hydroxysuccinimide (NHS) in water solution (FIG.1).

The morphology of porous samples was studied using Scanning Electron Microscopy (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, England). Scaffolds were cut with a razor scalpel after being frozen in liquid nitrogen for 3 min and were sputter-coated with a layer of gold for observation.

The density and porosity of the fabricated 3D scaffolds were measured by liquid displacement. The liquid used in this study was isopropanol.

The weighted samples ( $W_d$ ) were immersed in 5 ml phosphate buffer saline (PBS, pH=7,4) for 2, 24, 48, and 72h at 37°C. At each time point, scaffolds were taken out of the solution and weighted ( $W_w$ ). Water uptake of scaffold was calculated according the following equation:

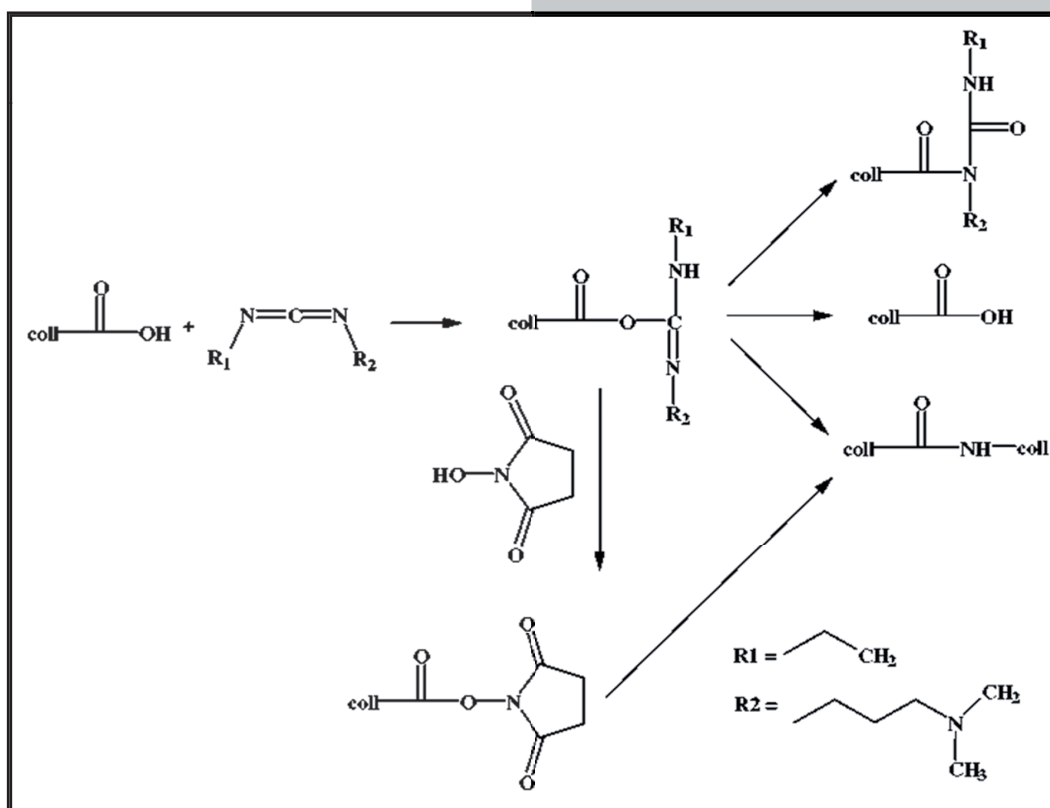
$$\text{swelling ratio (\%)} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100$$

### Results and discussion

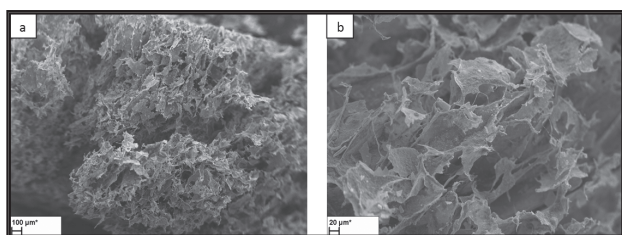
Freeze drying of HAp/Col blend leads to porous three-dimensional sponge, mimicking the extracellular matrix of bone tissue. FIG.2 a-b shows the SEM image of the HAp/Col composite.

Generally, HAp/Col scaffold was highly porous and interconnected, and appeared to be relatively homogeneous throughout the bulk of the scaffold.





RYS. 1. Sieciowanie skafoldu HAp/Kol za pomocą mieszaniny sieciującej EDC/NHS [1].  
FIG. 1. Cross-linking of samples in EDC/NHS [1].



RYS. 2. Zdjęcia SEM kompozytu HAp/Col w różnym powiększeniu: a) x100, b) x500.  
FIG. 2. SEM image of HAp/Col composite: a) x100, b) x500.

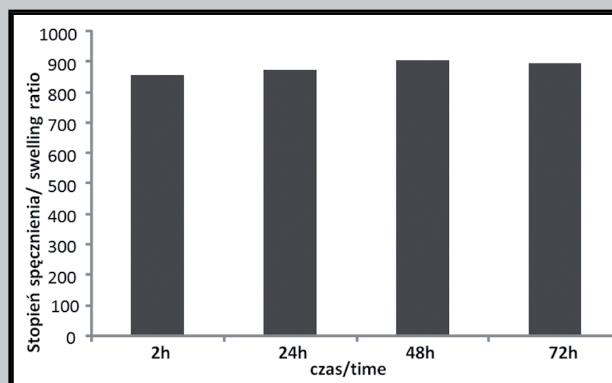
Zdjęcia SEM wskazują, iż otrzymano trójwymiarowy, wysoce porowaty kompozyt, z połączonymi wzajemnie porami, o względnie jednorodnej strukturze.

Porowatość otrzymanego metodą liofilizacji kompozytu HAp/Col wynosi 84,5%, z kolei gęstość 0,069 g/cm<sup>3</sup>.

Wyniki pomiarów stopnia spęcznienia badanej próbki przedstawiono na RYSUNKU 3. Przedstawione wartości są średnią z pomiarów 3 próbek. Po 2h pęcznienia próbek w buforze PBS został osiągnięty maksymalny, ustabilizowany stopień spęcznienia badanego kompozytu.

## Wnioski

Otrzymano trójwymiarowy, porowaty materiał kompozytowy złożony z kolagenu typu I i nanohydroksyapatytu, który ma szansę być wykorzystany w inżynierii tkankowej. Metoda liofilizacji pozwala na otrzymanie próbek o strukturze wysoce porowatej. Sieciowanie gąbek kolagenowych za pomocą mieszaniny sieciującej EDC/NHS jest efektywną, bezpieczną metodą modyfikacji właściwości otrzymanych kompozytów.



RYS. 3. Stopień spęcznienia kompozytu HAp/Col po różnym czasie zanurzenia w buforze PBS.  
FIG. 3. Swelling ratio of hydroxyapatite/collagen composite in different soaking times.

The HAp/Col scaffolds prepared by freeze-drying had porosity 84,5% and density 0,069 g/cm<sup>3</sup>.

Swelling ratio of collagen matrices containing 70 mass % of hydroxyapatite are shown in FIG.3. Value was averaged from three parallel measurements. After 2h the swelling ratio was constant.

## Conclusions

3D composite material obtained from collagen type I and nano-hydroxyapatite is suitable for tissue engineering. Highly porous HAp/collagen scaffolds, with a interconnected pore structure, were produced in this study by a freeze-drying technique. Crosslinking of HAp/collagen scaffolds using an EDS/NHS system proves to be an easy, effective and contaminant free technique.

- [1] Sloviová A., Vojtová L., Jančař J., Preparation and modification of collagen-based porous scaffold for tissue engineering, *Chemical Papers* (2008), 62, 417–422.
- [2] Teng S.H., Lee E.J., Wang P., Kim H.E., Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning. *Materials Letters* (2008), 62, 3055–3058.

- [3] Gelinsky, M., Welzel, P.B., Simon, P., Bernhardt, A., König, U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone *Chemical Engineering Journal* (2008), 137, 84–96.
- [4] Shen X., Chen L., Cai X., Tong T., Tong H., Hu J., A novel method for the fabrication of homogeneous hydroxyapatite/collagen nanocomposite and nanocomposite scaffold with hierarchical porosity *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2011), 22, 299–305

## WŁAŚCIWOŚCI KOLAGENU WYIZOLOWANEGO Z ŁUSEK RYB Z GATUNKU *ESOX LUCIUS*

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU,  
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,  
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA  
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów*, 109-111, (2011), 24-26]

### Wprowadzenie

Kolagen jest białkiem występującym w organizmach zwierzęcych, szeroko stosowanym w przemyśle medycznym i farmaceutycznym. Jednak wysoki koszt tego białka znacznie ogranicza możliwości jego zastosowania. Obecnie głównymi źródłami pozyskiwania kolagenu typu I są skóry bydłowe i świńskie. Jednak, na skutek wystąpienia u bydła zwyrodnienia gąbczastego (BSE) oraz innych zakaźnych encefalopatii gąbczastych (TSE), a także pryszczycy (FMD) u świń i bydła, surowce rzeźne są już mniej atrakcyjnym źródłem tego białka. Kolagen typu I można również wyizolować ze skór, kości, płetw czy łusek ryb. Ryby spożywane są codziennie na całym świecie w dużych ilościach. Ponad 30% rybich odpadów to skóry, łuski i kości, które są bogatym źródłem kolagenu. Dlatego odpady rybne mogą być alternatywnym, bezpiecznym źródłem kolagenu, stąd też nastąpił wzrost zainteresowania i badań naukowych w tej dziedzinie.

W pracy przedstawiono metodykę i właściwości kolagenu wyizolowanego z łusek ryb z gatunku *Esox lucius*. Jest to ryba słodkowodna, występująca w krajach o umiarkowanym klimacie.

### Metodyka

Kolagen wyizolowano z łusek rybich, poprzez demineralizację oraz rozpuszczenie w kwasie octowym. Za pomocą spektrometru rentgenowskiego (EDX) oznaczono zawartości pierwiastków w łusce i potwierdzono całkowite rozpuszczenie fosforanu wapnia. Wykonano widmo FTIR filmu kolagenowego oraz przeprowadzono analizę składu aminokwasowego. Temperaturę denaturacji kolagenu wyznaczono

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN FROM FISH (*ESOX LUCIUS*) SCALE

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, TORUN ,  
FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,  
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND  
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 24-26]

### Introduction

Collagen is the most abundant protein found in animal body and widely used for biomedical and pharmaceutical applications. However, its applicability is severely limited due to high cost. At present, the main sources of type I collagen are bovine or porcine dermis. However, due to outbreak of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE), Foot and Mouth Disease (FMD) in pigs, cattle, use of collagen and collagen derived products from these sources have been limited. Type I collagen has also been extracted from skin, bone, fins, and scales of fresh water and marine fishes. In various parts of the world, different fish species are being consumed daily in large quantities. More than 30% of fish processing wastes consist of skin, scale and bone, which are very rich in collagen. Thus, fish processing wastes may be alternative collagen sources and these underutilized resources have attracted the increasing attention of scientists all over the world.

In the present study, collagen was isolated from scales of *Esox lucius*. This fish is found in fresh water of temperate countries.

### Materials and methods

Collagen was isolated from fish scale, a calcified tissue, through demineralization following acetic acid treatment. Energy dispersive X-ray (EDX) analysis of demineralized scale was carried out for quantitative estimation of inorganic content. The isolated and purified collagen was characterized by FTIR and amino acid analysis. The denaturation

wiskozymetrycznie, przeprowadzając pomiar lepkości w różnych temperaturach. Lepkość w każdej temperaturze pomiaru wyznaczono z następującej zależności:

$$\text{lepkość} = \frac{(\eta_{sp(T^{\circ}C)} - \eta_{sp(40^{\circ}C)})}{(\eta_{sp(10^{\circ}C)} - \eta_{sp(40^{\circ}C)})}$$

gdzie  $\eta_{sp}$  oznacza lepkość właściwą obliczoną ze wzoru:

$$\eta_{sp} = (t - t_0) / t_0$$

( $t$  i  $t_0$  oznaczają odpowiednio: czas wpływu z kapilary roztworu kolagenu oraz rozpuszczalnika).

## Wyniki i dyskusja

Wyniki analizy EDX świeżej łuski oraz łuski po demineralizacji przedstawiono w TABELI 1.

**TABELA 2. Skład aminokwasowy kolagenu wyrażony w nanomolach poszczególnych aminokwasów w przeliczeniu na 50 µg białka pobranego do analizy.**  
**TABLE 2. Amino acid composition of collagen (nmol of amino acid in 50 µg of collagen).**

Amino Acid	
Asparagine + Aspartic Acid	17.03
Glutamine + Glutamic Acid	31.56
Hydroxyproline	28.44
Serine	13.85
Glycine	129.84
Histidine	4.18
Arginine	20.49
Threonine	11.29
Alanine	45.48
Proline	46.17
Tyrosine	1.86
Valine	7.09
Methionine	4.19
Isoleucine	3.69
Leucine	7.67
Phenylalanine	6.65
Lysine	9.79

Analiza EDX potwierdza, iż po 48h traktowania łusek roztworem EDTA następuje całkowita ich demineralizacja. W TABELI 2 przedstawiono skład aminokwasowy kolagenu rybiego.

W kolagenie rybim stwierdzono obecność iminokwasów w następującej ilości: 46,17 proliny i 28,44 hydroksyproliny. Zawartość proliny i hydroksyproliny w kolagenie wpływa na stabilność termiczną i temperaturę denaturacji kolagenu. Nie stwierdzono obecności cysteiny.

Widmo IR filmu kolagenowego przedstawiono na RYSUNKU 1. Zarejestrowano pasma typowe dla kolagenu: pasmo amidowe A występuje przy liczbie falowej 3327  $\text{cm}^{-1}$ , pasmo amidowe B przy 3085  $\text{cm}^{-1}$ , amid I przy 1658  $\text{cm}^{-1}$ , a amid II przy 1554  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabela 1. Analiza EDX świeżej łuski oraz łuski po 48 h traktowania roztworem EDTA).**

**Table 1. EDX analysis for raw scale and demineralized scale after 48 h of EDTA treatment.**

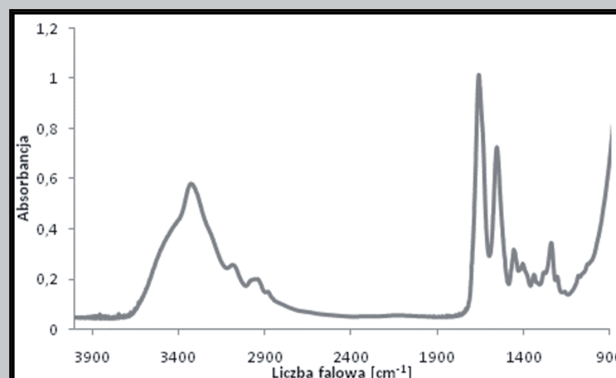
Pierwiastek Element	Procent masowy zawartości pierwiastków w łuskach [%] Mass percent (%)	
	przed demineralizacją Raw scale	po 48h traktowania roztworem EDTA 48h EDTA treatment
C	2.95	13.69
N	6.97	14.02
O	60.25	71.50
P	9.04	0
Ca	20.79	0

of collagen in solution was determined from temperature induced viscosity change using an Ubbelohde viscometer. Fractional viscosity was calculated for each temperature as follows:

Fractional viscosity =  $\frac{(\eta_{sp(T^{\circ}C)} - \eta_{sp(40^{\circ}C)})}{(\eta_{sp(10^{\circ}C)} - \eta_{sp(40^{\circ}C)})}$   
where, the viscosity was specific viscosity ( $\eta_{sp}$ ) and was calculated by following equation:

$$\eta_{sp} = (t - t_0) / t_0$$

( $t$  and  $t_0$  are the efflux times of collagen solution and solvent, respectively).



**RYS. 1. Widmo IR filmu kolagenowego.**  
**FIG. 1. IR spectrum of collagen film.**

## Results and discussion

EDX of raw scale and demineralized scale are shown in TABLE 1.

Demineralization was almost completed after 48h of EDTA treatment, which was confirmed by EDX.

The amino acid composition of collagen was shown in TABLE 2.

The amount of imino acids, proline and hydroxyproline, are 46.17 and 28.44 nmol of amino acid in 50 µg of collagen, respectively, which is likely to have an influence on the stability of the collagen fibers and influences the denaturation temperature as well. Absence of cysteine in collagen emphasizes presence of type I collagen.

IR spectrum of fish scale collagen film is shown in FIG.1. We observe the bands typical for collagen such N-H stretching at ~3305  $\text{cm}^{-1}$  for the amide A, C-H stretching at ~3081  $\text{cm}^{-1}$  for the amide B, C=O stretching at ~1635  $\text{cm}^{-1}$  for the amide I, and N-H deformation at ~1545  $\text{cm}^{-1}$  for the amide II.

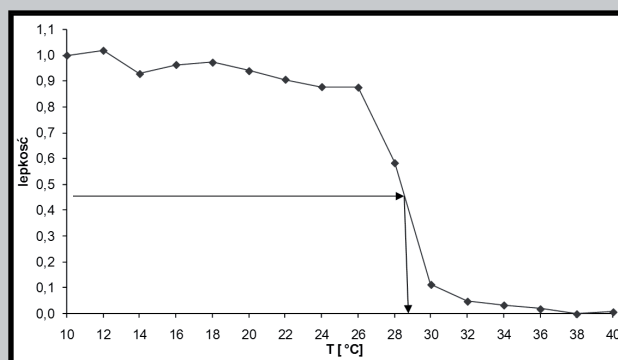
The denaturation temperature ( $T_d$ ) was determined by viscosity measurement. Relative viscosity of collagen in 0.1 M acetic acid is depicted in FIG. 2.

Temperatura denaturacji ( $T_d$ ) została wyznaczona z pomiarów wiskozymetrycznych. Zależność lepkości roztworu kolagenu w 0,1 M kwasie octowym od temperatury przedstawiono na RYSUNKU 2.

$T_d$  kolagenu rybiego wynosi  $\sim 28,5^\circ\text{C}$ . Jest to wyższa temperatura w porównaniu z  $T_d$  kolagenu wyizolowanego z tkanek niektórych zwierząt morskich takich jak: mintaj ( $16,8^\circ\text{C}$ ), makrelosz ( $24^\circ\text{C}$ ), rekin ( $25,0^\circ\text{C}$ ), keta (gatunek łososia) ( $19,4^\circ\text{C}$ ), makrela ( $26,1^\circ\text{C}$ ).

## Wnioski

Z łusek ryb z gatunku *Esox lucius* wyizolowano kolagen typu I. Stabilność termiczna pozyskanego białka ( $T_d=28,5^\circ\text{C}$ ) jest wyższa niż w przypadku niektórych ryb morskich. Może to być spowodowane większą zawartością iminokwasów oraz wyższą temperaturą ciała i środowiska życia ryb z gatunku *Esox lucius*. Temperaturę denaturacji można podwyższyć stosując różne metody sieciowania białek, m.in. sieciowanie za pomocą reakcji chemicznych. Kolagen uzyskany z łusek rybich jest ciekawą alternatywą dla kolagenu ssaków i może znaleźć zastosowania biomedyczne.



RYS. 2. Zmiany lepkości roztworu kolagenu w zależności od temperatury.

FIG. 2. Change in fractional viscosity with temperature of fish scale collagen.

The  $T_d$  of fish scale collagen was found to be  $\sim 28,5^\circ\text{C}$ . The  $T_d$  of collagen from *Esox lucius* was higher than those of collagens from some marine species: Alaska Pollack skin ( $16.8^\circ\text{C}$ ), saury ( $24^\circ\text{C}$ ), bullhead shark ( $25.0^\circ\text{C}$ ), chub salmon ( $19.4^\circ\text{C}$ ), common mackerel ( $26.1^\circ\text{C}$ ) [4].

## Conclusions

Collagen type I was successfully isolated from the scale of *Esox lucius*. Thermal stability of isolated collagen ( $28.5^\circ\text{C}$ ) was higher than that of sea fishes. The higher thermal stability of *Esox lucius* may be due to higher contents of imino acids and may have correlation with their body temperature and living environment. The thermal stability of collagen can be improved by chemical crosslinking. The isolated fish collagen may serve as an attractive alternative to mammalian collagen for biomedical applications.

## Piśmiennictwo

- [1] Sankar S.; Sekar S.; Mohan R.; Rani S.; Sundaraseelan J.; Sastry T.P., Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales, *International Journal of Biological Macromolecules* (2008) 42, 6-9.
- [2] Rodziejewicz-Motowidło S.; Ślądowska A.; Mulkiewicz E.; Kołodziejczyk A.; Aleksandrowicz A.; et. al., Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aquaculture* (2008) 285, 130-134.

## References

- [3] Zhang J.; Duan R.; Tian Y.; Konno K., Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) *Food Chemistry* (2009) 116, 318-322.
- [4] Nagai, T.; Araki, Y.; Suzuki, N., Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) *Food Chemistry* (2002) 78, 173-177.

# MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWYCH BIOMATERIAŁÓW Z FIBROINY JEDWABIU

A. PŁANECKA\*, A. SIONKOWSKA, P. SZARSZEWSKA

UNIwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii,  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń  
\*MAILTO: ANNAP@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 27-28*]

## Wstęp

Jedwab jako biopolimer, wytwarzany przez stawonogi w postaci nitek, jest cenny nie tylko dla przemysłu tekstylnego, ale i medycznego. Jedwab cechuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością i dobrymi właściwościami mechanicznymi. Nici jedwabne używane były często do zszywania ran. Natomiast obecnie błonki na bazie fibroiny jedwabiu znalazły zastosowanie jako nośniki leków, mikro-tuby w plastyce naczyń krwionośnych, a także jako pokrycie tub celulozowych i membran do dializy.

Nie ma jednak informacji na temat właściwości powierzchniowych jedwabiu po jego sterylizacji promieniowaniem UV. Polimery stosowane w medycynie, szczególnie w zakresie chirurgii i implantacji, muszą charakteryzować się wysoką adhezją. Dotychczasowe badania naszego zespołu potwierdzają, korzystne działanie promieniowania UV na zwiększenie hydrofilowości błonek kolagenowych, a tym samym większej na nim adhezji komórek. Wyniki tych badań są potwierdzone we współpracy z Collegium Medicum w Bydgoszczy [1]. Przewidujemy, że błonki wykonane z fibroiny jedwabiu zmodyfikowane promieniowaniem UV byłyby, również dobrym podłożem do hodowli komórkowej. W pracy przedstawiono sposób modyfikacji właściwości powierzchniowych błonek na bazie fibroiny jedwabiu, w celu poprawy ich właściwości implantacyjnych.

## Materiały i metodyka badań

Roztwór fibroiny jedwabiu (SF) otrzymano metodą Ajisawa, która polega na usunięciu powłoki serycynowej z surowego jedwabiu (w procesie odserycynowania) oraz rozpuszczeniu czystych włókien jedwabiu w odpowiednim rozpuszczalniku ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , w stosunku molowym: 1/8/2, w  $75^\circ\text{C}$  przez 4h). Surowy jedwab pochodził z kokonów jedwabników morwowych.

Do napromieniania próbek użyto średniociśnieniową lampę rtęciową HPR-120 W (firmy Philips, Holand) emitującą promieniowanie UV o długości fali 254 nm. Natężenie promieniowania UV mierzono za pomocą radiometru HD 9021 (Delta OHM) z sondą pomiarową LP 9021 UVC na zakres promieniowania 200-280 nm. Zmierzone natężenie promieniowania lampy wynosiło  $0,256 \text{ J}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$ .

Pomiarów kąta zwilżalności ( $\theta$ ) zbadano na cienkich błonkach z fibroiny jedwabiu. Pomiarów kątów zwilżania prowadzono za pomocą goniometru typu G10 (Kruss GmbH) w temperaturze pokojowej, wyposażonego w kamerę wideo. Do pomiarów użyto dwóch cieczy pomiarowych gliceryny i diiodometanu, a obliczeń dokonano metodą Owens-Wendta.

Mikrografie błonek z fibroiny jedwabiu otrzymano za pomocą mikroskopu sił atomowych (Atomic Force Microscopy - AFM) NanoScope III w warunkach otoczenia. Ana-

# MODIFICATION OF THE SURFACE PROPERTIES OF SILK FIBROIN BIOMATERIALS

A. PŁANECKA\*, A. SIONKOWSKA, P. SZARSZEWSKA

FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,  
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND  
\*MAILTO: ANNAP@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 27-28*]

## Introduction

Silk as a biopolymer, produced by arthropods in the form of threads, is valuable not only for the textile industry but also for medical applications. Silk is biocompatible, biodegradable and possesses good mechanical properties. Silk threads were often used for suture wounds. Recently films based on silk fibroin were used as drug carriers, in the angioplasty of micro blood vessels, as well as they cover tubes and cellulose dialysis membranes.

However, there are no studies about the surface properties of silk after UV sterilization. The polymers used in medicine, particularly for surgery and implantation, must be characterized by high adhesion. Previous studies of our research group showed the beneficial effects of UV radiation to increase of hydrophilicity of collagen films, and thus the improvement of adhesion of cells. The results of these studies were confirmed in collaboration with the Collegium Medicum in Bydgoszcz [1]. One can expect that the film made from silk fibroin modified by UV radiation would be also a good substrate for cell culture. The paper shows how to modify the surface properties of films based on silk fibroin, in order to improve its cells adhesion.

## Materials and methods

Silk fibroin solution (SF) were obtained by Ajisawa's method, which involves removing the sericin shell of raw silk and the dissolution of pure silk fibers in a suitable solvent ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  in a molar ratio: 1/8/2 in  $75^\circ\text{C}$  for 4h). Raw silk came from silkworm (*Bombyx Mori*) cocoons.

Silk-based samples were irradiated by mercury lamp Medium HPR-120 W (Philips, Holand), emitting UV light with a wavelength of 254 nm. The intensity of UV radiation was measured using radiometer HD 9021 (Delta OHM) with probe LP 9021 UVC radiation in the range 200-280 nm. The measured intensity was  $0,256 \text{ J}/(\text{s}^2 \cdot \text{m})$ .

Contact angle ( $\theta$ ) measurements on thin films of silk fibroin were carried out using a G10 goniometer (Kruss GmbH) equipped with a video camera at room temperature. For the measurements two liquid were used: glycerin and diiodomethane. Calculations of surface free energy were made by Owens-Wendt equation.

Microphotographs of fibroin silk films were obtained using Atomic Force Microscopy (AFM) NanoScope III at ambient conditions. The analysis of each sample was carried out in several places, and specific areas were photographed. Films were analyzed before and after UV irradiation (2 and 8h).

## Results and discussion

Our studies have shown that the surface free energy of silk fibroin films increases with increasing time of UV irradiation. This may be caused by photochemical degradation

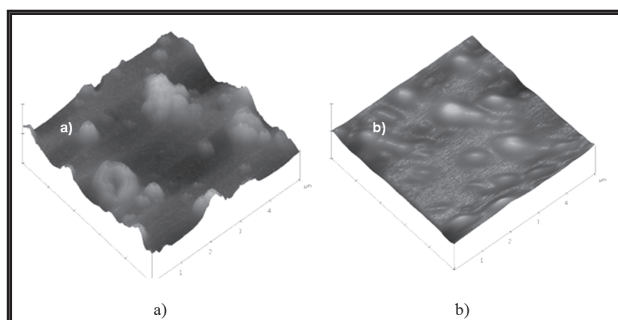
lizej każdej próbki wykonano w kilku miejscach, a charakterystyczne obszary sfotografowano. Zanalizowano błonki przed jak i po naświetlaniu promieniowaniem nadfioletowym (po 2 i 8h).

## Wyniki i dyskusja

Badania wykazały, że swobodna energia powierzchniowa filmów fibroiny jedwabiu rośnie wraz z czasem poddania ich promieniowaniu UV. Może to być spowodowane przez fotochemiczną degradację, która zwiększa polaryzację powierzchni, powodując silniejsze interakcje między filmem a kroplą. Wzrost polarności powierzchni (TAB.1) można tłumaczyć przez fotoutlenianie, czyli fotodestrukcję wiązań glikozydowych, a także przez tworzenie się pierścieni z grupami karboksylowymi.

Zmianie uległy także wartości swobodnej energii powierzchniowej, jak i jej składowych, których wartości zwiększyły się, co świadczy o lepszej adhezji tego materiału. Wolne rodniki powstające podczas napromieniowania UV mogą reagować z tlenem atmosferycznym tworząc różnego rodzaju grupy karbonylowe, hydroksylowe, a także wodoronadtlenki, co powoduje silne zmiany w składowych swobodnej energii powierzchniowej. Zmiany te spowodowane mogą być m.in. wytworzeniem na powierzchni polimeru wolnych rodników ( $R\cdot, ROO\cdot$ ), wtórnymi reakcjami rodników tlenowych z wytworzeniem grup wodoronadtlenkowych (ROOH) oraz utworzeniem grup polarnych (-OH, -COOH, -CHO, =CO).

Na podstawie mikrofotografii AFM (RYS. 1) oraz wyników chropowatości można stwierdzić, iż z czasem naświetlania promieniowaniem UV ich chropowatość maleje, czego dowodem są malejące wartości parametru RMS (TAB. 2).



RYS. 1. Obrazy AFM fibroiny jedwabiu a) niemodyfikowanego i b) po modyfikacji promieniowaniem UV (po 8h).

FIG. 1. AFM images of silk fibroin film: a) unmodified; and b) after modification by UV radiation (after 8h).

## Wnioski

Wyniki badań sugerują, że najkorzystniejszym czasem modyfikacji promieniowaniem nadfioletowym są 2 godziny. Po czasie tym, odnotowuje się 6 krotnie większą hydrofilowość powierzchni błonek na bazie fibroiny jedwabiu (w porównaniu z nie naświetlaną) oraz zadowalającą ich chropowatość (RMS=19.2 nm).

TABELA 1. Wartości składowej polarnej [mN/m] błonek z fibroiny jedwabiu przed i po naświetlaniu promieniowaniem UV.

TABLE 1. The values of polar component of surface free energy [mN/m] for silk fibroin films before and after UV irradiation.

Czas naświetlania Time of irradiation [h]	Składowa polarna Polar component [mN/m] $\gamma_p$
0	2.9
1	7.5
2	17.4
8	22.3

and photooxidation, which increase the surface polarity, resulting in stronger interactions between the film and drop. The increase of surface polarity (TAB.1.) can be explained by photooxidation which leads to formation of carbonyl and carboxyl groups.

Free radicals formed during UV irradiation ( $R\cdot, ROO\cdot$ ) may react with atmospheric oxygen and can form various types of carbonyl groups, hydroxyl, and hydroperoxides, which causes a strong change in polar component of surface free energy (-OH, -COOH, -CHO, =CO).

Based on the AFM microphotographs (FIG. 1) the surface roughness can be calculated as RMS. After UV exposure of silk fibroin films the surface roughness decreases and the values of RMS are shown in TAB. 2.

TABELA 2. Zestawienie wyników parametru chropowatości błonek z fibroiny jedwabiu przed i po 2 i 8 h napromieniania światłem UV (obszar skanowania 5×5 μm).

TABLE 2. The surface roughness parameter RMS of the silk fibroin films before and after UV irradiation (scan area 5×5 μm).

Czas naświetlania Time of irradiation [h]	Chropowatość RMS Roughness RMS [nm]
0	22.8
2	19.2
8	3.9

## Conclusions

The results suggest that the best time of ultraviolet modification of silk fibroin film is 2 hours. After this time, surface of films based on silk fibroin has six times more hydrophilic character (compared to not irradiated ones) and satisfactory roughness (RMS = 19.2 nm).

## Piśmiennictwo

## References

[1] J.Skopinska-Wisniewska, A. Sionkowska, A. Kaminska, A. Kaznica, R. Jachimiak, T. Drewa, „Surface characterization of collagen/elastin-based biomaterials for tissue regeneration”, Applied Surface Science, 2009; 225: 8286-8292.

## WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE I TERMICZNE MIESZANIN POLI(ALKOHOLU WINYLOWEGO) I ELASTYNY

J. SKOPINSKA-WISNIEWSKA\*, A. SIONKOWSKA, A. WIECZOREK, J. KOZŁOWSKA, A. PŁANECKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, WYDZIAŁ CHEMII,  
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ,  
\*MAILTO:JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[*Inżynieria Biomateriałów*, 109-111, (2011), 29-31]

### Wstęp

Od wielu już lat do otrzymywania biomateriałów oraz matryc dla inżynierii tkankowej szeroko stosuje się zarówno polimery syntetyczne jak i naturalne. Jak wiadomo, materiały do zastosowań medycznych powinny charakteryzować się odpowiednimi parametrami fizykochemicznymi i mechanicznymi, biokompatybilnością i brakiem toksyczności. Nie powinny wywoływać odczynów zapalnych oraz odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza oraz ulegać degradacji w określony sposób. By sprostać tym wymaganiom zaczęto badać mieszaniny polimerów syntetycznych i naturalnych. Zwykle składnik syntetyczny zapewnia odpowiednie właściwości mechaniczne i fizyczne, podczas gdy biopolimer poprawia parametry biologiczne materiału [1,2].

Poli(alkohol winylowy) (PVA) jest syntetycznym polimerem rozpuszczalnym w wodzie. Charakteryzuje go znaczna stabilność chemiczna i dość duża elastyczność. Jest on biokompatybilny i biodegradowalny. Dzięki tym właściwościom PVA znalazł wiele zastosowań medycznych, m.in. jako soczewki kontaktowe, systemy dostarczania leków, membrany, substytut kości i chrząstek oraz składnik rusztowań dla inżynierii tkankowej. PVA wykazuje ponadto niską adsorpcję białek i adhezję komórek [2-6].

Elastyna jest białkiem włóknistym stanowiącym składnik macierzy zewnątrzkomórkowej. Zapewnia ona sprężystość wielu tkankom i organom, np. naczyń krwionośnym, skórze, ścięgnom, płucem. Łańcuch elastynowy zbudowany jest z dwóch rodzajów domen. Pierwsze z nich to mobilne, bogate w glicynę, hydrofobowe obszary o strukturze  $\beta$  odpowiedzialne za elastyczność białka. Drugi typ to regiony  $\alpha$ -helikalne. Zbudowane są one głównie z alaniny. Zawierają też reszty lizynowe, które uczestniczą w tworzeniu wielofunkcyjnych wiązań sieciujących – desmozyny (DES) i izodesmozyny (IDES). Dzięki ich obecności tworzona jest bardzo wytrzymała i elastyczna, trójwymiarowa sieć polimerowa [7,8]. Właściwości mechaniczne i aktywność biologiczna elastyny sprawiły, że budzi ona coraz większe zainteresowanie jako surowiec do otrzymania biomateriałów, np. substytutów skóry czy naczyń krwionośnych [9]. Należy jednak pamiętać, że wysoki stopień usieciowania tego białka, z jednej strony zapewnia znakomite właściwości mechaniczne, z drugiej jednak ogranicza możliwości jego zastosowania. Dlatego też stosuje się hydrolizaty elastyny, które wykazują gorsze właściwości mechaniczne, lecz chemiczne i biologiczne zbliżone do natywnego białka, dzięki czemu ich obecność w mieszaninie poprawia biokompatybilność materiału [10].

Wcześniejsze badania wykazały, iż hydrolizaty elastyny sprzyjają adhezji i proliferacji komórek fibroblastów mysich 3T3 [10]. Stąd, w celu otrzymania atrakcyjnych matryc dla inżynierii tkankowej postanowiono zastosować miesza-

## THE MECHANICAL AND THERMAL PROPERTIES OF POLY(VINYL ALCOHOL) /ELASTIN HYDROLYSATES BLENDS

J. SKOPINSKA-WISNIEWSKA\*, A. SIONKOWSKA, A. WIECZOREK, J. KOZŁOWSKA, A. PŁANECKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY,  
7 GAGARINA STR. 7, 87-100 TORUŃ, POLAND,  
\*JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 29-31]

### Introduction

Many natural and synthetic polymers have been extensively used in biomedical applications. The macromolecular biomaterials have to possess appropriate physicochemical and mechanical properties. They also should be degradable, biocompatible, non-toxic, and do not cause inflammatory response of the host tissues. The blends of synthetic and natural polymers are extensively investigated as a materials for medical applications. Synthetic component usually ensures appropriate mechanical and physical properties while biopolymer improves biocompatibility of the material [1,2].

Poly(vinyl alcohol) (PVA) is water-soluble synthetic polymer, with stable chemical properties and high elasticity. It is biocompatible and biodegradable. PVA because of its attractive properties is applicable in several biomedical applications such as contact lenses, bone and cartilage substitutes, delivery systems and membranes, for tendon repair or scaffolds for tissue engineering. PVA exhibits low protein adsorption and cell adhesion [2-6].

Elastin is a fibrous protein, one of the main components of extracellular matrix. It provides resilience to many organs, e.g. blood vessels, skin, ligaments and lung. In amino acids sequence of the protein two kinds of domains are observed. One, are glycine-rich, very mobile hydrophobic regions, which possesses  $\beta$ -structure and are responsible for elastin elasticity. Second kind alterate domains are alanine-rich,  $\alpha$ -helical regions. They consist also lysine residues which participate in creation of multifunctional cross-linking bonds, desmosine (DES) and isodesmosine (IDES). They are responsible for the formation of three-dimensional network of this protein and ensure the stability, elasticity and flexibility of elastin [7,8]. Due to its remarkable mechanical properties and biological activity, elastin is becoming more and more popular as a biomaterial, e.g. as a skin substitutes, vascular grafts and cartilage [9]. However, high insolubility of elastin gives problems with processing of this protein. That is why elastin hydrolysates are more useful for biomedical applications. Elastin hydrolysates have similar chemical properties to native protein and improve the biocompatibility of materials [10].

Our previous investigations showed, that the elastin hydrolysates promotes 3T3 cells adhesion and proliferation [10]. So, for the purpose of obtaining an attractive scaffolds for tissue engineering the blends of PVA and elastin hydrolysates were used. As the mechanical properties of elastin hydrolysates are unsatisfactory, the aim of first stage of our work was to study the mechanical parameters of poly(vinyl alcohol)/elastin hydrolysates blends. Tensile strength and elasticity of these materials depends on occurrence of crosslinking bounds and water molecules in the material structure. Thermal analysis was carried out due to determine these factors.

ny poli(alkoholu winylowego) z hydrolizatami elastyny. Ponieważ właściwości mechaniczne hydrolizatów elastyny nie są zadowalające, dlatego celem pierwszego etapu badań było określenie wpływu dodatku tego białka na parametry wytrzymałościowe uzyskanych materiałów. Wytrzymałość i elastyczność materiałów PVA/hydrolizaty elastyny jest warunkowana między innymi obecnością wiązań sieciujących oraz cząsteczek wody w strukturze materiału. By oszacować te dwa parametry przeprowadzono analizę termiczną badanych materiałów.

## Materiały i metody

PVA zakupiono w firmie Fluca (stopień hydrolizy 90,98%). Nierozpuszczalną elastynę oczyszczono metodą Lansing'a. Suchy materiał rozdrobniono w ciekłym azocie i poddano hydrolizie alkalicznej [10]. Przygotowano roztwory PVA i hydrolizatów elastyny o odpowiednich stężeniach, a następnie mieszaniny zawierające 3 i 5% hydrolizatów elastyny.

**TABELA 1. Wartości naprężenia zrywającego ( $\sigma$ ) oraz wydłużenia względnego przy zerwaniu ( $\epsilon_r$ ) dla filmów PVA i jego mieszanin z hydrolizatami elastyny.**

**TABLE 1. The values of ultimate tensile strength at breaking point ( $\sigma$ ) and ultimate percentage elongation at breaking point ( $\epsilon_r$ ) of PVA films and its blends with elastin hydrolysates.**

Próbka/Specimen	I etap/stage		II etap/stage		III etap/stage	
	$\Delta m$ [%]	$T_{max}$ [°C]	$\Delta m$ [%]	$T_{max}$ [°C]	$\Delta m$ [%]	$T_{max}$ [°C]
PVA	4,96	269	78,72	426	14,95	
PVA + 3%	5,17	269	72,66	437	15,90	
PVA + 5%	5,49	264	71,46	443	16,83	
Elastyna/Elastin	11,3	298	55,77	-	-	-

Właściwości mechaniczne uzyskanych filmów badano przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Zwick&Roell Z 0.5. Analizę termiczną przeprowadzono wykorzystując aparat TA Instruments SDT 2960. Badanie prowadzono z szybkością grzania 10°C/min w zakresie temperatur 20-600°C w atmosferze azotu.

## Wyniki i dyskusja

Zgodnie z oczekiwaniami, najwyższą wytrzymałością mechaniczną charakteryzują się filmy z poli(alkoholu winylowego). Dodatek hydrolizatów elastyny obniża odporność na zerwanie badanych materiałów (TABELA 1.). Zauważono jednak, że obecność tego białka poprawia elastyczność filmów. Elastyna jest bardzo hydrofobowym polimerem, lecz by mogła być elastyczna konieczna jest obecność wody. Obecnie rozważa się różne modele elastyczności elastyny. Jeden z nich zakłada, że z hydrofobowych domen zrelaksowanej cząsteczki białka wystają nieliczne polarne reszty aminokwasowe biorące udział w jej zwilżaniu. Przy rozciąganiu odsłonięty zostaje hydrofobowy rdzeń. Po zwolnieniu naprężenia cząsteczka wraca do pierwotnego kształtu wskutek występowania oddziaływań hydrofobowych reszt aminokwasowych z polarnym środowiskiem [7,8]. Z tego powodu suche filmy elastynowe są zbyt kruche by mogły zostać poddane badaniu wytrzymałościowemu. Stwierdzono jednakże, że suche filmy zawierające oba polimery wykazują większą elastyczność niż jednoskładnikowe. Prawdopodobnie grupy hydroksylowe pochodzące z PVA pełnią funkcję zbliżoną do cząsteczek wody i dzięki temu wartość wydłużenia przy zerwaniu filmów z mieszanin ulega zwiększeniu. Tezę tę zdają się potwierdzać wyniki analizy termicznej. Pierwszy etap przemian termicznych wszystkich

## Materials and methods

PVA was obtained from Fluca (90,98% degree of hydrolysis). Insoluble elastin was purified from pig's aortas by Lansing's method. Dry material was minced in liquid nitrogen. After this procedure elastin powder was hydrolysed in alkaline medium [10]. The solutions of PVA, elastin hydrolysates, and PVA/elastin hydrolysates blend were prepared. The ratio of elastin in PVA blends was: 97:3, 95:5.

The mechanical properties have been investigated by Zwick&Roell Z 0.5. 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.

## Results and discussion

As it was expected, the films of poly(vinyl alcohol) exhibits the highest tensile strength. The elastin hydrolysates addition causes decrease of the mechanical strength (TABLE

1). However, the presence of elastin improves the elasticity of materials. Elastin is very hydrophobic polymer but it is elastic only in wet state. Nowadays various models of elastin elasticity are discussed. One theory is based on the assumption that in relaxed state polar amino acids residues stick out the hydrophobic domains of the protein and participate in the moisture of the biopolymer chain. During stretching the hydrophobic core is exposed. The interactions between hydrophobic residues and polar environment causes recovery to previous conformation after force elimination [7,8]. For this reason dry samples of elastin were to fragile to be tested on Zwick&Roell. Dry films of blends were more elastic than samples made from pure polymers. Probably the hydroxyl groups which are present in PVA work like a water

**TABELA 2. Wartości temperatur i ubytków masy występujące w procesie degradacji termicznej filmów z PVA, hydrolizatów elastyny i ich mieszanin; temperatura w maksimum szybkości procesu ( $T_{max}$ ) i ubytek masy następujący w czasie ogrzewania ( $\Delta m$ ).**

**TABLE 2. The parameters of the thermal decomposition of PVA, elastin hydrolysates and PVA/elastin films; the temperature of the maximum speed of the process ( $T_{max}$ ) and the mass decrement during the heating ( $\Delta m$ ).**

Próbka/Specimen	$\sigma$ , [Mpa]	$\epsilon_r$ , [%]
PVA	38,44	10,85
PVA + 3%	30,70	13,09
PVA + 5%	20,92	14,63



rodzajów próbek związany jest z parowaniem wody obecnej w materiale. Na podstawie wyników zaprezentowanych w TABELI 2. stwierdzono, że najwięcej wody zaabsorbował film elastynowy. Choć układy mieszane wykazują tylko nieznacznie większą ilość wody związanej niż filmy PVA, to jednak materiały tego typu zyskują większą elastyczność.

Analiza termiczna wykazała, że degradacja termiczna hydrolyzatów elastyny przebiega w dwóch etapach, natomiast PVA i mieszanin w trzech. Wartość  $T_{max}$  drugiego etapu degradacji termicznej jest najwyższa w przypadku hydrolyzatów elastyny (298°C). Niewielkie dodatki białka do PVA nie zmieniają znacząco temperatury w maksimum szybkości przebiegu tego procesu (264-269°C). Jednocześnie, najmniejszy ubytek masy na tym etapie degradacji termicznej charakteryzuje filmy z hydrolyzatów elastyny (56%), a największe filmy z PVA (79%). Próbkę z mieszanin PVA/elastyna wykazują ubytek masy nieco niższy niż w przypadku filmów z PVA (71%, 73%). Te różnice w stabilności termicznej materiałów z PVA, hydrolyzatów elastyny oraz mieszanin obu polimerów mogą być spowodowane obecnością wiązań sieciujących DES i IDES w strukturze białka. Trzeci pik, występujący tylko na krzywej DTG poli(alkoholu winylowego) i mieszanin pojawia się przy temperaturze 426°C. Zwiększenie zawartości elastyny w materiale powoduje wzrost  $T_{max}$  oraz ubytków masy w trzecim etapie degradacji termicznej badanych próbek. To sugeruje obecność oddziaływań pomiędzy łańcuchami polimeru syntetycznego i naturalnego. Jednak by określić naturę tych oddziaływań konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

## Podsumowanie

Dodatek hydrolyzatów elastyny obniża wytrzymałość mechaniczną materiałów z PVA, lecz jednocześnie zwiększa ich elastyczność. Prawdopodobnie wynika to z obecności dużej ilości grup hydroksylowych wzdłuż łańcucha PVA oraz silnie hydrofobowego charakteru łańcuchów hydrolyzatów elastyny. Uzyskane wyniki sugerują, że oddziaływania hydrofobowo-hydrofilowe pomiędzy oboma polimerami mają większy wpływ na właściwości mechaniczne mieszanin niż obecność niewielkiej liczby wiązań sieciujących (DES, IDES).

molecules necessary for elastin elasticity and improve the ability to elongation of the blends materials. Also the results of thermal analysis stay in agreement with this thesis. The first stage of thermal decomposition of all samples is connected with evaporation of water absorbed to polymer chains. The results presented in TABLE 2. showed that elastin film contains much more water molecules than PVA and blends. The elasticity of blends increases, despite they absorb only a few more water molecules than PVA films.

Thermal analysis demonstrates that elastin hydrolyses destruction had been proceeded in two stages but PVA and blends in three stages. It was observed that  $T_{max}$  of the second stage of thermal degradation is the highest for elastin hydrolyses (298°C). The small additions of the protein to poly(vinyl alcohol) do not change significantly temperature of the process (264-269°C). At this stage the lowest value of weight loss was noted for elastin sample (56%) and the highest for PVA film (79%). The mass decrements of PVA/elastin samples are a little lower than in case of pure PVA film (71%, 73%). This differences in thermal stability of elastin, PVA and blends are caused by presence of cross-linking bounds – desmosine and isodesmosine in the protein structure. The third peak on the DTG curve of poly(vinyl alcohol) samples appeared with a maximum at 426°C. The higher amount of elastin in the sample causes increase of  $T_{max}$  but also increase the mass decrement of third stage of thermal decomposition. It suggests the presence of interactions between protein and synthetic polymer chains. However, further analysis are necessary for determination of the interactions nature.

## Summary

The addition of elastin hydrolyses decreases mechanical strength but increases elasticity of PVA materials. It is probably caused by the presence of hydroxyl groups in PVA chains and highly hydrophobic nature of elastin hydrolyses. It is suggested that hydrophobic-hydrophilic interactions between polymer macromolecules are more important for mechanical properties than small amount of crosslinking bounds (DES, IDES).

## Piśmiennictwo

- [1] A. Sionkowska, "Current research on the blends of natural and synthetic polymers as a new biomaterials: Review", *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 1254-1276.
- [2] M.S. Shoichet, *Polymer scaffolds for biomaterials applications*, *Macromolecules* 43 (2010) 581-591.
- [3] A. Sionkowska, J. Skopinska, M. Wisniewski, Photochemical stability of collagen/poly(vinyl alcohol) blends, *Polym. Degrad. Stab.* 83 (2004) 117-125.
- [4] M.-H. Huang, M.-C. Yang, Evaluation of glucan/poly(vinyl alcohol) blend wound dressing using rat models, *Int. J. Pharm.* 346 (2008) 38-46.
- [5] Y.-S. Pan, D.-S. Xiong, R.-Y. MA, A study on the friction properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels as articular cartilage against titanium alloy, *Wear* 262 (2007) 1021-1025.
- [6] S. Moscato, L. Mattii, D. D'Alessandro, M.G. Cascone, L. Lazzeri, L.P. Serino, A. Dolfi, N. Bernardini, "Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges" *Micron* 39 (2008) 569-579.

## References

- [7] L. Dabelle, A.M. Tamburro, Elastin: molecular description and function, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 261-272.
- [8] L. Dabelle, A.J.P. Alix, The structures of elastins and their function, *Biochimie* 81 (1999) 981-994. [6] T.B.W.N.T. Sosokel, L.B. Sandberg, Isolation and characterization of insoluble and soluble elastin, *Methods of Enzymology* 144 (1987) 196-214.
- [9] W.F. Daamen, J.H. Veerkamp, J.C.M. van Hest, T.H. van Kuppevelt, Elastin as a biomaterial for tissue engineering, *Biomaterials* 28 (2007) 4378-4398.
- [10] J. Skopińska-Wiśniewska, A. Sionkowska, A. Kamińska, A. Kaźnica, R. Joachimiak, T. Drewa, "Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration", *Applied Surface Science*, 2009, 255, 8286-8292

DANUTA STRÓŻ

UNIWERSYTET ŚLĄSKI, INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLSKA  
EMAIL: DANUTA.STROZ@US.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 32-35*]

## Wstęp

Materiały wykazując pamięć kształtu należą do grupy tzw. materiałów inteligentnych. Nazwa ta pojawiła się w latach 80. XX wieku a kolejne lata przyniosły niezwykle duże zainteresowanie i burzliwy rozwój badań naukowych w obszarze tych materiałów. Należy zaznaczyć, iż nie ma powszechnie akceptowanej definicji materiałów inteligentnych, spotyka się także zróżnicowane nazewnictwo: intelligent materials, smart materials, adaptive materials, a nawet multifunctional materials. Takagi [1] wprowadza rozróżnienie między smart i intelligent materials. Jego zdaniem materiał inteligentny to taki, który jest zdolny do reagowania na bodźce zewnętrzne przez istotną zmianę swych właściwości dla pożądanego i skutecznego odpowiedzenia na te bodźce. Występowanie tylko 2 lub 3 z wymienionych cech nie wystarcza do zaliczania materiału do klasy materiałów inteligentnych. Wśród materiałów inteligentnych rozróżnia się następujące grupy: materiały zmieniające kolor, temperaturę, ciecze zmieniające gęstość, materiały emitujące światło, materiały samogrupujące się, czy sam naprawiające się, czy wreszcie materiały zmieniające kształt lub wielkość, do której należą materiały wykazujące efekt pamięci kształtu. Są to dwa rodzaje materiałów: stopy z pamięcią kształtu oraz polimery wykazujące efekt pamięci kształtu.

## Zjawiska pamięci kształtu w metalach

### Charakterystyka odwracalnej przemiany martenzytycznej

Stopy z pamięcią kształtu mają zdolność powracania, w odpowiednich warunkach, do nadanego im wcześniej kształtu. Związane z tym odkształcenia wynoszą dla polikryształów 1-8%, a dla monokryształów do 15%. Zjawiskiem fizycznym wywołującym zmianę kształtu jest odwracalna, termosprężysta przemiana martenzytyczna, polegająca na rekonfiguracji atomów i zmianie struktury materiału. Jest to przemiana pierwszego rodzaju a jej głównymi cechami są bezdyfuzyjność oraz przemieszczeniowy charakter, który polega na skoordynowanym przesunięciu atomów w obszarze przemiany. Termodynamiczną siłą napędową przemiany jest zmiana energii swobodnej układu. Powstanie zarodka martenzytu w kształcie dysku o promieniu  $r$  i grubości  $2t$  ( $r \gg t$ ) powoduje zmianę energii swobodnej układu:

$$\Delta G = \pi r^3 t \Delta g_c + 2\pi r^2 \sigma + \pi r t^2 A + \pi r t^2 B \quad (1)$$

gdzie:

$\Delta g_c$  jest chemiczną energią swobodną na jednostkę objętości,

$\sigma$  – energią rozdziału faz na jednostkę powierzchni, czynniki  $A$  i  $B$  – wyrażają energie odkształcenia sprężystego i odpowiednio plastycznego na jednostkę powierzchni.

Tak więc zmiana energii swobodnej układu spowodowana powstaniem zarodka martenzytu złożona jest z czterech członów: zmiany energii chemicznej, spowodowanej zmianą temperatury układu, zmiany energii spowodowanej powsta-

## SHAPE MEMORY MATERIALS

DANUTA STRÓŻ

UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, 12  
BANKOWA STR., 40-007 KATOWICE, POLANDE  
EMAIL: DANUTA.STROZ@US.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 32-35*]

## Introduction

Shape memory materials belong to a group of so called intelligent materials. The name appeared in 80-ies of the last century and the following years brought great interest and development of these materials studies. There is no generally accepted definition of the intelligent materials. Also the name can be different, one can meet: intelligent materials, smart materials, adaptive materials, and even multifunctional materials. Takagi [1] makes difference between smart and intelligent materials. He believes that intelligent material is able to react on the external stimulus by a significant change of the properties in order to make the proper and successful response on the stimulus. If there exist only one or two of these characteristics, the material cannot be called "intelligent". Among intelligent materials the following groups are distinguished: materials that change their color or temperature, fluids changing density, light emitting materials, self-organising or self-repairing materials or materials changing their shape or size. The shape memory materials (SMA) belong to the last group. One can distinguish two types of SMA's: shape memory alloys and polymers exhibiting the shape memory effect. In this paper only the NiTi alloys, as the materials that are utilised in medicine, will be discussed. The shape memory polymers are the subject of different studies.

## Shape memory effects in metals

### Characteristics of reversible martensitic transformation

SMA's are able to come back to their original shape, if proper conditions are restricted. The connected strains are of order of 1-8% for polycrystals and up to 15% for single crystals. The shape recovery is caused by the reversible, thermoelastic martensitic transformation that occurs in these alloys. The transformation consists in atoms shuffling and change of the material structure. It is the first order transformation and it is diffusionless and occurs in a coordinated movement of atoms. The thermodynamical driving force is a change of the system free energy. If a nucleus of martensite in

$$\Delta G = \pi r^3 t \Delta g_c + 2\pi r^2 \sigma + \pi r t^2 A + \pi r t^2 B \quad (1)$$

where:

$\Delta g_c$  is chemical free energy per volume,

$\sigma$  – interface free energy per surface unit,

the factors  $A$  and  $B$  are free energies of elastic and plastic strain per surface unit, respectively.

Thus, the change of the free energy of the system consists of four components: change of the chemical free energy, caused by change of the system temperature, change of the free energy caused by appearance of the interface, and changes of the elastic and plastic energies. At  $M_s$  (the martensite start temperature), at which the nucleus radius reaches the critical value, the first component is larger than the sum the of the others and the nucleus starts to grow. In case of the martensitic transformation in steels the value

niem powierzchni rozdziału faz, zmiany energii sprężystej oraz energii spowodowanej odkształceniem plastycznym. W temperaturze  $M_s$  (temperatura początku przemiany martenzytycznej), w której promień zarodka osiągnie wartość krytyczną, pierwszy człon przekracza sumę trzech pozostałych i zarodek zaczyna rosnąć a więc przemiana postępuje. W przypadku przemiany martenzytycznej w stalach wartość tej sumy energii nie chemicznych jest tak duża, że wymagane jest przechłodzenie rzędu  $200^\circ\text{C}$ . Natomiast w stopach z pamięcią kształtu wymagane przechłodzenie jest rzędu  $5\text{--}30^\circ\text{C}$  [2]. Dzieje się tak dlatego, że w tych stopach dwa człony w wyrażeniu (1) są tak małe, iż praktycznie można je zaniedbać. Są to: zmiana energii swobodnej związanej z powierzchnią rozdziału faz oraz zmiana energii spowodowana odkształceniem plastycznym. Jest to możliwe w materiałach, gdzie zmiany struktury, a w konsekwencji zmiany objętości, są małe i występuje koherencja pomiędzy sieciami fazy macierzystej i martenzytycznej. Najogólniej, te warunki są spełnione, gdy faza macierzysta jest fazą uporządkowaną [2]. Tak więc, w wyrażeniu na zmianę energii swobodnej układu pozostają tylko człony związane ze zmianą temperatury oraz człony związane ze zmianą energii odkształceń sprężystych. Ich równość zapewnia równowagę termodynamiczną układu faza macierzysta - martenzyt, jednak jakakolwiek zmianę któregoś z nich powoduje dalszy wzrost płytki martenzytu lub jej zanik. Stąd ten rodzaj przemiany został nazwany termosprężystą przemianą martenzytyczną i jest ona z natury swej przemianą odwracalną.

#### Mechanizm efektu pamięci kształtu

Przemianom martenzytycznym towarzyszą określone zmiany kształtu a te zmiany są realizowane poprzez odkształcenia typu ścinania, zachodzące równoległe do pewnej niezmienniczej płaszczyzny, zwanej płaszczyzną habitus.

Nawet jeśli próbka w stanie fazy macierzystej jest monokryształem, podczas przemiany tworzą się różne warianty płytek martenzytu, o krystalograficznie równoważnych płaszczyznach habitus. Schłodzenie próbki do temperatury poniżej  $M_f$  (temperatura końca przemiany), spowoduje powstanie takich wariantów martenzytu, dzięki którym zostanie zachowany makroskopowy kształt próbki. Przyłożenie zewnętrznego obciążenia w tej niskiej temperaturze powoduje odkształcenie martenzytu polegające na wzroście uprzywilejowanych względem tego obciążenia wariantów kosztem pozostałych. W efekcie można uzyskać monokryształ martenzytu (o ile próbka wyjściowa była także monokryształem).

Dalsze odkształcenie spowodowałoby deformację plastyczną martenzytu. Jeżeli jednak w tym stanie próbkę podgrzejemy do temperatury powyżej  $A_f$  (temperatura końca przemiany odwrótej), wówczas zajdzie przemiana odwrótne a próbka wróci do kształtu wyjściowego. Tak więc jednokierunkowy efekt pamięci kształtu polega na odkształceniu próbki w stanie martenzytycznym i następnym jej podgrzaniu do temperatury, w której występuje faza macierzysta (RYS. 1).

Podobnie, jeżeli zaindukujemy martenzyt poprzez przyłożenie zewnętrznego obciążenia, zanik odkształcenia spowodowanego przemianą nastąpi tylko poprzez nagrzanie próbki do temperatury powyżej  $A_f$ . Odpowiednia obróbka materiału może spowodować, iż już podczas chłodzenia z fazy macierzystej tworzą się określone warianty płytek martenzytu. Powoduje to makroskopową zmianę kształtu także przy przemianie faza macierzysta  $\rightarrow$  martenzyt a w efekcie tzw. dwukierunkowy efekt pamięci kształtu.

#### Zjawisko nadspężystości

Zjawisko nadspężystości związane jest z przemianą martenzytyczną wywołaną zewnętrznym naprężeniem.

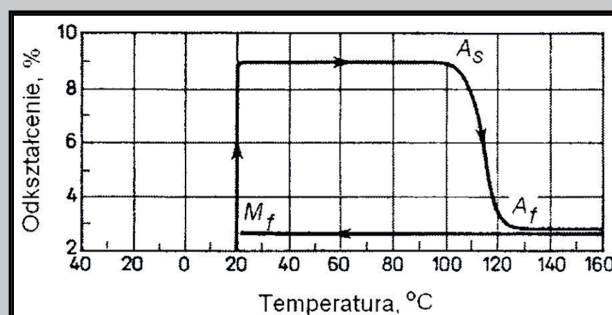
of this sum is so large that the supercooling of  $200^\circ\text{C}$  is necessary to start the transformation. However, in shape memory alloys the required supercooling is equal to  $5\text{--}30^\circ\text{C}$  [2]. This is because two components in the equation (1) are so small that they can be neglected. These are: the free energy connected with the interface and with the plastic deformation. This is only possible in materials, where the change of structure and consequently change of volume are small and there exists coherency between the parent and martensite phase. Generally, these conditions are fulfilled when the parent phase is an ordered phase [2]. Thus, in the total free energy change there exist only two components: the chemical one i.e. the thermal one and the change connected with elastic strain caused by transformation. If they are equal, the system is in equilibrium, but any change of any of them causes that the martensite plate grows or shrinks. That's why the transformation is called thermoelastic and it is reversible.

#### Shape memory effect mechanism

Martensitic transformations are accompanied by change of shape and these are realised by shear strains parallel to the habit plane. During transformation different variants of the martensite plates are formed, even if the parent phase is a single crystal. The variants shows crystallographically equivalent habit planes and they are formed in such a way that macroscopic shape of the specimen remains is not changed. The external strain applied at this low temperature causes growth of these variants that are privileged for the strain, while the other variants shrink. In result, a single crystal of martensite can be obtained. Further strain may cause the plastic deformation of the martensite. However, if we heat the specimen to temperature above  $A_f$  (austenite finish temperature), the reversible transformation will take place and the specimen comes back to the original shape. Thus, the one-way shape memory effect consists in deformation of the specimen at low temperature (in the martensitic state) and then heating it up to temperature exceeding the austenite finish temperature (FIG. 1). Similarly, if we induce martensite by external strain, it will be recovered by heating the specimen. Proper treatment can cause that already during cooling from the parent phase specific variants of the martensite are formed which causes macroscopic shape change. In result two-way shape memory effect is observed.

#### Superelasticity effect

Superelasticity is connected with the transformation caused by external stress. Material deformed at temperature above  $A_f$  undergoes the martensitic transformation and in result the strain of an order from a few to a dozen percents is obtained. This strain is completely recovered when the external stress is released [3]. FIG. 2 shows the mechanism of the superelasticity effect. From A to B the elastic strain



RYS. 1. Schemat jednokierunkowego efektu pamięci kształtu.

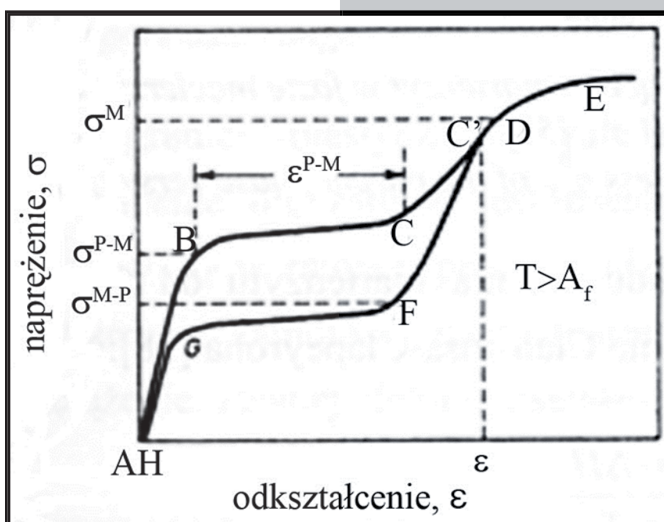
FIG. 1. Scheme of the one-way shape memory effect.

Materiał odkształcany w temperaturze powyżej  $A_f$  ulega przemianom martensytnym, po czym następuje wzrost uprzywilejowanych wariantów martensytu, dając w efekcie odkształcenie rzędu kilku do kilkunastu procent. Odkształcenie to całkowicie zanika podczas odciążenia [3]. Schemat zjawiska nadspężystości przedstawiono na RYS. 2. Na odcinku AB następuje odkształcenie sprężyste fazy macierzystej, w odcinku BC następuje przemiana martensytna oraz rozrost uprzywilejowanych płytek martensytu, a odcinek CD jest związany ze sprężystym odkształceniem martensytu. W punkcie D osiągnięta zostaje granica plastyczności martensytu,  $\sigma_M$ ; jego dalsze odkształcenie przebiega klasyczną drogą ruchu dyslokacji.

Jeżeli w punkcie C' naprężenie zostaje usunięte, to odkształcenie zanika. Wpierw na odcinku C'F zanika odkształcenie sprężyste martensytu, później (odcinek FG) zachodzi przemiana odwrotna, aż wreszcie zanika odkształcenie sprężyste fazy macierzystej GH. Naprężenie jakie jest konieczne do zainicjowania przemiany wzrasta liniowo z temperaturą, natomiast granica plastyczności fazy macierzystej maleje z temperaturą. Przecięcie się tych dwóch linii wyznacza temperaturę  $T_d$  powyżej której zjawisko nadspężystości nie zachodzi.

### Stopy NiTi wykazujące pamięć kształtu

Najlepszymi z punktu widzenia właściwości funkcjonalnych oraz jedynymi, które znalazły zastosowania jako biomateriały są stopy z pamięcią kształtu na bazie Ni-Ti. Są to stopy o składzie bliskim równoatomowemu a przemiana ulega fazą B2, regularną, przestrzennie centrowaną. Martenzyt w tych stopach jest fazą z układu jednoskośnego typu B19'. Temperatura  $M_s$  silnie zależy od zawartości niklu w stopie i gwałtownie spada przy wzroście tej zawartości powyżej 50%at. Co więcej, jeżeli zawartość Ni w tych stopach przekracza 50,5% at. wówczas można wywołać proces wydzieleniowy. Sekwencja tego procesu jest złożona i zależy od temperatury starzenia [4]. Istotną rolę z punktu widzenia możliwości sterowania efektami pamięci kształtu odgrywają tu wydzielenia nierównowagowej fazy  $Ni_4Ti_3$ , które są koherentnymi z osnową cząstkami w kształcie soczewek. Ich obecność w stopie powoduje powstanie wewnętrznych naprężeń wokół cząstki, a to z kolei zmienia sekwencję przemiany martensytną w fazę B19' poprzedza przemianę w fazę R, która ma także charakter termosprężystej odwracalnej przemiana-



RYS. 2. Schemat zjawiska nadspężystości dla monokryształu.

FIG. 2. Diagram of the superelasticity effect for a single crystal.

of the parent phase takes place, between B and C the transformation occurs and the privileged martensite variants grow, the part CD is connected with elastic strain of the martensite. At the point D the yield stress of martensite,  $\sigma_M$  is reached and further deformation of the material involves dislocations movement. However, if at C' the external stress is released, the strain is completely recovered. At first in C'F the elastic strain of martensite disappears, then (FG) the reverse transformation takes place and finally the elastic strain of the parent phase is released (GH). The stress necessary for inducing the transformation

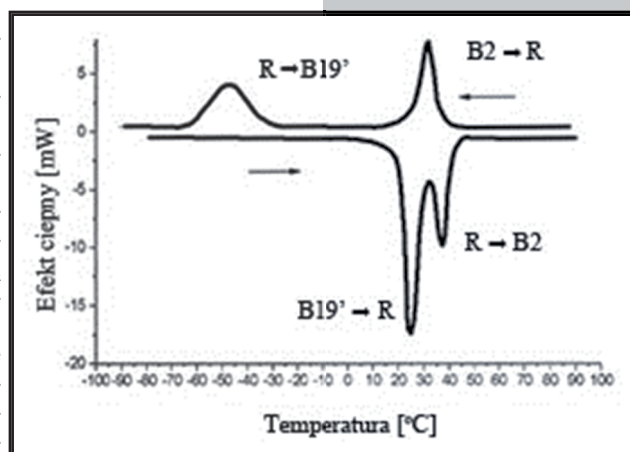
increases linearly with temperature, the martensite yield stress decreases with temperature. The intersection of these two lines gives the  $T_d$  temperature, above which the superelasticity does not occur.

### NiTi shape memory alloys

Ni-Ti based alloys are not only the best shape memory materials, but also these are the only SMA's that found applications as biomaterials. These are alloys of near equiatomic composition at which the B2, body centred cubic phase undergoes the martensitic transformation. The martensite phase B19' belongs to the monoclinic system. The  $M_s$  temperature strongly depends on the nickel content and violently decreases when the Ni contents exceeds 50%. Moreover, if the nickel content is higher than 50.5 at.% the precipitation process may occur in the alloy. The sequence of the precipitating phases is complex and depends on ageing temperature [4]. An important role, from the point of view of shape memory effect, play precipitates of non-equilibrium phase  $Ni_4Ti_3$ . These are lenticular coherent particles. Their presence causes internal stresses in the surrounding matrix.

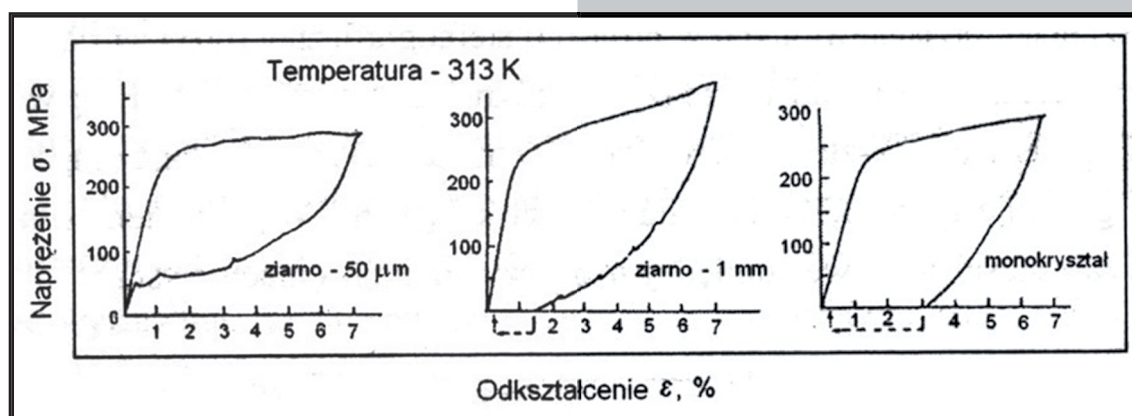
This changes the transformation sequence: the B19' martensite is preceded by the R-phase transition. The R-phase transformation is also martensitic and reversible and gives the shape memory effect. The effect is weaker than this caused by the B2→B19' transformation, but the thermal hysteresis of the R-phase transition is much lower (FIG. 3).

The functional properties of NiTi alloys strongly depend on their structure, deformation degree, texture and the grain size. It was found, for example, that good superelasticity effect is obtained for specimens



RYS. 3. Krzywe DSC dla stopu Ni51%at.-Ti poddane go starzeniu w 500°C/1 godz.

FIG. 3. DSC curves for the Ni51%at.-Ti alloy aged at 500°C/1 godz.



RYS. 4. Wpływ wielkości ziaren na efekt nadspężystości stopu NiTi [5].  
 FIG. 4. Effect of the grain size on superelasticity of NiTi alloy [5].

ny martenzytycznej i wywołuje efekt odzysku kształtu. Co prawda jest on znacznie słabszy, niż w przypadku przemiany w martenzyt B19', ale histereza termiczna przemiany jest bardzo mała (RYS. 3), co jest korzystne z punktu widzenia niektórych zastosowań.

Właściwości funkcjonalne stopów NiTi bardzo silnie zależą od ich szeroko pojętej struktury, w tym stopnia zdefektowania, tekstury a także wielkości ziaren. Stwierdzono na przykład, że dla uzyskania dobrego efektu nadspężystości korzystna jest mikrostruktura drobnoziarnista (RYS. 4).

W ostatnich latach poszukuje się więc możliwości polepszenia tych właściwości poprzez amorfizację stopu i następnego jego wyżarzanie, tak aby uzyskać pożądaną wielkość ziaren. Stwierdzono, że przy wielkości ziaren poniżej 50 nm przemiana martenzytyczna nie występuje. Użytkano także zmniejszenie histerezy termicznej przemiany martenzytycznej oraz polepszenie stabilności cyklowania.

Podsumowując, właściwości stopów NiTi są bardzo czułe na wszelkie zmiany składu chemicznego i struktury, co powoduje trudności w uzyskaniu powtarzalnych wytopów. Z drugiej zaś strony ta możliwość szerokiego sterowania np. temperaturą odzysku kształtu pozwala na ich różnorodne zastosowania.

## Podziękowania

Badania finansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu nr N N507 446834.

with small grain size (FIG. 4). Therefore, recently there are studies carried out on nanocrystalline NiTi alloys obtained by amorphisation followed by proper annealing. It was found that if the grain is smaller than 50 nm the martensitic transformation does not occur. However, it was also found that the thermal hysteresis of the B19' transformation is smaller for these alloys and the cycling stability is improved. Summarizing, the NiTi are very sensitive to changes of chemical composition and structure, this causes significant difficulties at obtaining casts of the same parameters. On the other hand, however, this gives wide possibilities of controlling the properties and thus wide range of applications.

## Acknowledgments

The studies were financially supported by the Ministry of Education and Sciences, the project number N N507 446834.

## Piśmiennictwo

- [1] T. Takagi, Journal of Intelligent Material Systems and Structures April 1990 vol. 1 no. 2 149-156.
- [2] H. Funakubo, Shape memory alloys, Gordon and Breach Science Publisher, 1987 Amsterdam.
- [3] R.V. Krishnan, L. Delaey, H. Tas, H. Warlimont, J. Mat. Sci., 9, 1974, 1536.

## References

- [4] M. Nishida, C.M. Wayman, T. Honma, Metall. Trans. 17A, 1986, 1505.
- [5] T. Saburi, Proc. MRS Int. Meet. on Adv. Mat. Vol. 9, 1989, p. 77-91.

## DETEKCJA ENZYMÓW Z WYKORZYSTANIEM MACIERZY POLIMER-SUBSTRAT

RÓŻA TRZCIŃSKA<sup>1</sup>, ALICJA UTRATA-WESOŁEK<sup>1</sup>, PIOTR SUDER<sup>2</sup>,  
ANDRZEJ DWORAK<sup>1</sup>, JERZY SILBERRING<sup>1,2</sup>, BARBARA TRZEBICKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN,  
UL. M. CURIE SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA  
EMAIL: ROZA.TRZCINSKA@CMPW-PAN.EDU.PL

<sup>2</sup>AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

### Streszczenie

Ocena aktywności enzymów jest kluczowym zagadnieniem w badaniu kinetyki reakcji enzymatycznych i inhibicji. Ostatnio, macierze polimerowo-peptydowe, gdzie peptyd jest specyficznym substratem dla enzymu wzbudzają coraz większe zainteresowanie wśród biochemików. W połączeniu z czułymi metodami detekcji takimi jak spektrometria mas i fluorescencja macierze mogą znaleźć zastosowanie jako niezwykle użyteczne narzędzia do detekcji enzymów i oceny ich aktywności w diagnostyce klinicznej.

Macierze peptydowe składają się z powierzchni, na której immobilizowana są peptydy. Peptydy mogą być przyłączone bezpośrednio do sfunkcjonalizowanej powierzchni lub poprzez polimerowy linker. Obecność polimerowego linkera pomiędzy powierzchnią a peptydem przynosi wiele korzyści. Zastosowanie linkera z poli(tlenku etylenu) minimalizuje niespecyficzną adsorpcję biomolekuł na podłożu, zapewnia niskie tło w pomiarach fluorescencyjnych i ułatwia dostęp steryczny centrum aktywnego do peptydu.

W niniejszej pracy koniugaty peptydów z poli(tlenkiem etylenu) zostały otrzymane na drodze syntezy na nośniku stałym metodą Fmoc. Otrzymane koniugaty immobilizowano na powierzchni krzemu zmodyfikowanej aminopropylotrietoksylanem. Powierzchnię scharakteryzowano techniką AFM i zbadano jej kąty zwilżania. Tak otrzymane macierze peptydowe poddano inkubacji z enzymami a produkty reakcji analizowano za pomocą techniki ESI MS.

**Słowa kluczowe:** macierze peptydowe, koniugaty polimer-peptyd, enzymy, powierzchnie, peptydy

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 36]

### Podziękowania

Praca była współfinansowana przez Polskie Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant NN 209 756740) oraz ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego poprzez projekt RFSD 2 (R. Trzcińska).

## ENZYME ASSAYS BASED ON POLYMER-SUBSTRATE ARRAYS

RÓŻA TRZCIŃSKA<sup>1</sup>, ALICJA UTRATA-WESOŁEK<sup>1</sup>, PIOTR SUDER<sup>2</sup>,  
ANDRZEJ DWORAK<sup>1</sup>, JERZY SILBERRING<sup>1,2</sup>, BARBARA TRZEBICKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 MARIE CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND  
EMAIL: ROZA.TRZCINSKA@CMPW-PAN.EDU.PL

<sup>2</sup>AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
30 A. MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

### Abstract

Enzyme assays are methods for measuring enzymatic activity, they are vital to study enzyme kinetics and enzyme inhibitors. Recently, polymer-peptide arrays where the peptide is specific substrate for the enzyme have attracted high attention. Such arrays can be applied as invaluable tools for enzyme recognition when connected to fluorescence or mass spectrometry detection.

Peptide arrays consist of peptides immobilized on solid support directly or through polymeric linker. It was shown that the presence of poly(ethylene oxide) as a linker between surface and the peptide offers many advantages. It minimizes non-specific binding of biomolecules on the surface, provides low background in fluorescence measurement, avoids steric hindrance, and thus makes linked peptide fully accessible the active site of an enzyme.

In this work, conjugate of peptide and poly(ethylene oxide) were synthesized on the Tentagel resin using solid phase Fmoc chemistry, and then covalently immobilized by grafting-to method on the silica surface. Silica plates before grafting were modified by 3-aminopropyltriethoxysilane and characterized by AFM and contact angle measurement. The obtained peptide arrays were incubated with enzymes and products of these reactions were analyzed by ESI MS.

**Keywords:** peptide arrays, conjugates polymer-peptide, enzymes, surfaces, peptides

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 36]

### Acknowledgement

This work was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education Grant NN 209 756740. The work of Róża Trzcińska was supported by the European Community from the European Social Fund within the RFSD 2 project.

## OCENA TROMBOGENNOŚCI POWIERZCHNI POLEROWANEGO STOPU TYTANU Ti6Al7Nb MODYFIKOWANEGO CIENKĄ WARSTWĄ FOSFORANU WAPNIA

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO<sup>1\*</sup>, W. OKRÓJ<sup>2</sup>, M. WALCZYŃSKA<sup>2</sup>,  
P. SKWIERCZYŃSKI<sup>3</sup>, B. WALKOWIAK<sup>2</sup>

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,  
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA

<sup>1</sup> ZAKŁAD BADAŃ MATERIAŁÓW,

<sup>2</sup> ZAKŁAD BIOFIZYKI,

<sup>3</sup> ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,

\*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 37-38*]

Tytan oraz jego stopy są materiałami szeroko wykorzystywanymi w implantologii. Ostatnio wprowadzony stop Ti6Al7Nb charakteryzuje się dużą odpornością na korozję i nie wykazuje reakcji uczuleniowych i toksycznych. Podwyższenie biokompatybilności oraz osteointegracji stopu Ti6Al7Nb można uzyskać wytwarzając cienką warstwę fosforanu wapnia (CAP) na powierzchni implantu. Materiał ten stanowi mineralne rusztowanie dla tkanki i przyczynia się do łatwiejszego i szybszego integrowania się z kością. Niemal wszystkie implanty, w tym implanty kostne, mają pierwotny, bezpośredni kontakt z płynami biologicznymi, w szczególności z krwią. Dobre ukrwienie sąsiadujących z implantem tkanek zapewnia optymalne funkcjonowanie wszczepu. Adhezja płytek krwi do powierzchni implantu jest jednym z pierwszych etapów kontaktu biomateriału z krwią. Płytki krwi, w wyniku adhezji przybierają formy morfologiczne odpowiadające narastającej ich aktywacji. Początkowo prezentują kształt dyskoidalny, następnie przyjmują formy dendrytyczne lub całkowicie rozpostarte. Kontaktujące się z powierzchnią implantu krwinki płytkowe ulegają pobudzeniu i mogą adherować do powierzchni, ale też z różnych powodów mogą pozostać w krążeniu gdzie wykazują stan spontanicznej aktywacji i agregacji. Niesie to ze sobą ryzyko pobudzenia układu krzepnięcia.

Próbki ze stopu Ti6Al7Nb wykonano w formie krążków o wymiarach 3 mm grubości oraz 8 mm średnicy. Surowe próbki szlifowano na wodnych papierach ściernych o malejącej gradacji ziaren: 80, 260, 600, 800, 1200, a następnie polerowano zawieszoną na bazie koloidalnego roztworu krzemionki (Struers). W dalszym etapie wydzieloną grupę krążków ze stopu Ti6Al7Nb pokryto cienką warstwą fosforanu wapnia. Do tego celu wykorzystano metodę zmiennoprądowego rozpylania magnetronowego (AC-MS). Równolegle przygotowano próbkę referencyjną, którą stanowił krążek polerowanej stali medycznej AISI 316L o dobrze scharakteryzowanych właściwościach biologicznych, pełniący rolę standardu wewnętrznego w Zakładzie Biofizyki PŁ. W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem cytometru przepływowego dodatkowo wprowadzono jako kontrolę pełną krew, która nie została poddana kontaktowi z żadnym z biomateriałów.

W celu oceny stopnia zaadherowania płytek krwi do powierzchni badanych materiałów próbki poddano inkubacji przez 1h w pełnej krwi cytrynianowej w 37°C, zapewniając rotacyjny ruch probówek zawierających krew i badany materiał. Następnie krążki płukano dwukrotnie w buforze fosfo-

## THROMBOGENICITY OF THIN LAYER CALCIUM PHOSPHATE CREATED ON POLISHED SURFACE OF Ti6Al7Nb ALLOY

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO<sup>1\*</sup>, W. OKRÓJ<sup>2</sup>, M. WALCZYŃSKA<sup>2</sup>,  
P. SKWIERCZYŃSKI<sup>3</sup>, B. WALKOWIAK<sup>2</sup>

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
STEFANOWSKIEGO STR., 90-924 LODZ, POLAND:

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF MATERIALS' RESEARCH,

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING,

\*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 37-38*]

Titanium and its alloys are among the most wide-spread materials used in implantology. Recently introduced Ti6Al7Nb alloy has a high resistance to corrosion and it does not show any allergic and toxic reactions. Increase of its biocompatibility and osseointegration can be achieved by production of thin layer of calcium phosphate (CAP) on the implant's surface. This material acts as mineral scaffolding for tissues and it contributes to easier and faster integration with bone. Almost all implants, including bone's implants, have primeval direct contact with biological fluids, especially with blood. Appropriate blood supply to implant surrounding tissues ensures optimal functioning of this implant. Adhesion of blood platelets to the implant's surface is one of the first step of biomaterial-blood interaction. As a result of adhesion, platelets form a differential morphological shapes corresponding to the level of their activation. Initially, they represent discoidal shape, then they reach dendritic forms or become completely spread. Platelets that had a contact with implant's surface can easily become stimulated and may adhere to the surface, but, for some reasons, they can also stay in circulation system, where they indicate the state of spontaneous activation and aggregation. This increases the risk of activation of the coagulation system.

Samples made of Ti6Al7Nb alloy were discs-shaped, 8 mm in diameter and 3 mm thick. They were grinded on abrasive papers of decreasing grain grit: 80, 260, 600, 800, 1200, then polished with silica-based paste (Struers). Then, some samples were covered with thin layer of calcium phosphate (CAP). To achieve this aim AC Magnetron Sputtering (AC-MS) method was used. At the same time a reference sample, which was a polished medical steel AISI 316L, was prepared. Medical steel has well-defined biological properties and serves as the inter-laboratory standard in Department of Biophysics, Technical University of Lodz. Additionally, for the flow cytometry experiments, among material contacting blood samples, the whole blood free from any contact with examined materials was used as a control sample.

In order to evaluate the rate of blood platelets' adhesion to the biomaterials' surfaces, the materials were incubated with the whole citrated blood for one hour at 37°C, ensuring end-to-end move of tubes containing blood and examined biomaterials. Then, the samples were washed twice with phosphate buffer and fixed in 2,5% glutaraldehyde solution for 1 hour at 4°C. The next step was dehydration of examined surfaces in gradually increasing concentration of ethanol (50%, 70%, 80%, 90%, ABS) Surfaces of air-dried samples were observed with the use of fluorescence microscope Olympus GX-71.

ranowym i utrwalono w 2,5% roztworze glutaraldehydu przez 1h w 4°C. Kolejnym etapem było odwodnienie badanych powierzchni w etanolu o wzrastającym stężeniu (50%, 70%, 80%, 90%, ABS), następnie próbki suszono i poddano obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus GX-71 (FIG.1)

Do zliczenia płytek krwi zaadherowanych do poszczególnych powierzchni wykorzystano program Image J. Otrzymane wyniki zestawiono w TABELI 1.

Do oceny aktywacji oraz agregacji krwinek płytkowych we krwi podanej kontaktowi z badanymi biomateriałami zastosowano cytometrię przepływową wraz z fluorescencyjnie znakowanymi przeciwciałami: CD-61, CD-62 i PAC-1. Próbkę krwi utrwalono w Cell-fix i pozostawiono na 12h w 4°C. Ekspresję aktywnego receptora fibrynogenu na powierzchni płytek krwi badano z użyciem znakowanych FITC przeciwciał PAC-natomiast ekspresję selektyny P oceniano przy użyciu znakowanych PE przeciwciał CD62. Wyniki zestawiono w TABELI 2.

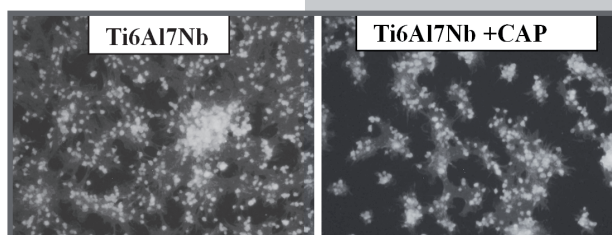
Agregację płytek w pełnej krwi badano rejestrując w cytometrze światło rozproszone do przodu i w bok. Na uzyskanych wykresach kropkowych wyodrębniono obszar zajmowany przez pojedyncze płytki (obszar R1) oraz przez płytki tworzące agregaty (obszar R2). Wyniki te zestawiono w TABELI 3.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- Powierzchnie Ti6Al7Nb oraz Ti6Al7Nb pokryta fosforem wapnia wykazują znaczną trombogenność (widoczne masywne agregaty płytkowe).
- Nie zaobserwowano zmian w ekspresji aktywnego receptora dla fibrynogenu w próbkach krwi poddanych kontaktowi ze stopem Ti6Al7Nb. Natomiast ekspresja selektyny P była w tym przypadku znacząco wyższa niż w próbkach kontrolnych.
- Próbka Ti6Al7Nb+HPA powodowała bardzo znaczący wzrost ekspresji zarówno aktywnego receptora fibrynogenu, jak i selektyny P.
- Badane materiały mają nieznaczny wpływ na spontaniczną agregację płytek krwi

## Podziękowania

Badania finansowane w ramach projektu „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.



**RYS. 1. Agregaty płytkowe zaadherowane do powierzchni badanych materiałów, mikroskop fluorescencyjny, pow. 500x.**

**FIG. 1. Aggregates of blood platelets adhered to the surface of examined biomaterials observed in fluorescence microscope, magnification 500x.**

**TABELA 1. Liczba płytek przypadająca na 100  $\mu\text{m}^2$  powierzchni dla stopów tytanu z niobem, stopu pokrytego warstwą fosforanu wapnia oraz stali medycznej AISI 316 L.**

**TABLE 1. Number of blood platelets adhered to surfaces of Ti6Al7Nb alloy and its modified surface covered with thin layer of calcium phosphate presented as a percent of reference sample made of medical steel AISI 316 L.**

Liczba płytek krwi na 100 $\mu\text{m}^2$ % stali medycznej Percent of reference sample [%]	AISI 316 L	Ti6Al7Nb	Ti6Al7Nb+CAP
	100,0 $\pm$ 35,3	99,2 $\pm$ 23,9	91,9 $\pm$ 90,0

**TABELA 2. Aktywacja płytek krwi. Wyniki przedstawiono jako % kontroli.**

**TABLE 2. Activation of blood platelets. Results are presented as % of control.**

Przeciwciała / Antibodies	PAC-1/FITC	anty CD62/PE
	Mediana / Median (% of control)	
1. kontrola \ control	100,0	100,0
2. AISI 316	168,2	122,6
3. Ti6Al7Nb	99,1	140,8
4. Ti6Al7Nb+CAP	247,4	188,3

**TABELA 3. Agregacja płytek krwi – wyniki przedstawiono jako % populacji płytek krwi.**

**TABLE 3. Aggregation of blood platelets – results shown as a % of blood platelets' population.**

	Kontrola Control	AISI 316	Ti6Al7Nb	Ti6Al7Nb + CAP
R1	84,5	84,0	75,6	82,2
R2	12,3	12,8	13,0	13,3

The total number of platelets adhered to examined surfaces was counted with the use of Image J program. The data are collected in TABLE 1.

In order to evaluate activation and aggregation of blood platelets in blood that had a contact with examined biomaterials, the flow cytometry with fluorescence labeled antibodies: CD-61, CD-62 and PAC-1 was used. Samples of blood were fixed in Cell-fix and incubated

for 12 h at 4°C. The expression of active fibrinogen receptor on the blood platelets' surfaces was studied using PAC-1 antibody labeled with FITC, and the expression of selectin P was evaluated using CD62 antibody labeled with PE.

The results of this experiment are presented in TABLE 2.

Aggregation of blood platelets was evaluated by recording the light, which was forward, and side scattered in cytometer. In the obtained dot-gaps (data not shown) the areas with single platelets (area R1) and with platelets forming aggregates (area R2) were separated. The results are shown in TABLE 3.

On the grounds of obtained results the following conclusions were made:

- The surfaces of Ti6Al7Nb and Ti6Al7Nb with calcium phosphate layer seem to be highly thrombogenic (the huge platelets' aggregates were easily noticed), although the

number of adhered does not differentiate the examined samples.

- The changes in expression of active fibrinogen's receptor in the blood samples that had a contact with Ti6Al7Nb alloy were not observed, whereas the expression of selectin P was, in that case, significantly higher than in control samples.
- Ti6Al7Nb+CAP caused significant increase in the expression of both active fibrinogen receptor and selectin P.
- Examined materials have insignificant influence on spontaneous aggregation of blood platelets.

## Acknowledgements

This study was financially supported by „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.



## PROLIFERACJA OSTEOBLASTÓW SAOS-2 ORAZ KOMÓREK ENDOTELIALNYCH EA.HY 926 NA POLEROWANYCH I PIASKOWANYCH POWIERZCHNIACH STOPÓW TYTANU Ti6Al4V I Ti6Al7Nb

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO<sup>1\*</sup>, M. WALCZYŃSKA<sup>2</sup>,  
P. KOMOROWSKI<sup>2</sup>, L. KLIMEK<sup>1</sup>, B. WALKOWIAK<sup>2</sup>

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,  
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA:

<sup>1</sup> ZAKŁAD BADAŃ MATERIAŁÓW

<sup>2</sup> ZAKŁAD BIOFIZYKI

MAILTO:\*MMWALKOWIAK@WP.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 39-41]

Współcześnie za najbardziej biozgodne spośród biomateriałów metalicznych uznaje się stopy na bazie tytanu. Z tego względu stanowią one wysoce atrakcyjne materiały dla zastosowań w różnych obszarach medycyny i implantologii. W ortopedii, protetyce stomatologicznej i kardiochirurgii od lat powszechnie stosuje się stop tytanu z aluminium i wanadem, Ti6Al4V. Jednakże, według niektórych doniesień, ze względu na obecność wanadu, który okazał się toksyczny w warunkach eksploatacji implantu środowisku biologicznym, stop ten należy używać z ostrożnością. W tym kontekście duże nadzieje budzi stop tytanu Ti6Al7Nb z lepiej tolerowanym niobem, który ponadto wykazuje większą odporność na korozję, niż powszechnie stosowany stop Ti6Al4V.

W adhezji komórek do powierzchni implantów dużą rolę odgrywa topografia powierzchni, energia powierzchniowa oraz skład chemiczny. W celu oceny wpływu modyfikacji powierzchniowej stopów Ti6Al4V i Ti6Al7Nb na proliferację, przeżywalność i różnicowanie osteoblastów linii Saos-2 oraz komórek śródbłonna linii EA.hy 926, hodowle komórkowe prowadzono na dwóch rodzajach powierzchni: polerowanej i piaskowanej prezentowanych stopów tytanu. Obróbka powierzchni poprzez piaskowanie zapewnia rozwinięcie powierzchni biomateriału, a tym samym potencjalnie lepszą integrację tkankową, przy zachowaniu niskich kosztów wytworzenia zmodyfikowanej powierzchni.

Próbki z wymienionych rodzajów materiałów stanowiły krążki o wymiarach 3 mm grubości oraz 20 mm średnicy. Surowe próbki szlifowano na wodnych papierach ściernych o malejącej gradacji ziaren: 80, 260, 600, 800, 1200, a następnie polerowano zawiesiną tlenkową na bazie koloidalnego roztworu krzemionki (Struers). Część krążków poddano następnie piaskowaniu ziarnem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o grubości 110 μm, padającym pod kątem 45° przy ciśnieniu 4-5 Bar. Wszystkie próbki myto w acetonie w myjce ultradźwiękowej przez 10 min, a następnie w wodzie dejonizowanej przez kolejne 10 min.

Ocenę stopnia proliferacji osteoblastów na polerowanych i piaskowanych powierzchniach Ti6Al4V i Ti6Al7Nb poprzedzono sterylizacją parową badanych krążków. Po sterylizacji próbki inkubowano przez 48h z zawiesiną osteoblastów linii Saos-2 w pełnym medium hodowlanym (McCoy's 5a Modified Medium z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), penicyliny i streptomycyny) w temperaturze 37°C, przy wilgotności względnej 100%, w obecności 5% CO<sub>2</sub>. Równolegle przygotowano próby kontrolne,

## PROLIFERATION OF HUMAN OSTEOBLAST-LIKE CELLS SAOS-2 AND HUMAN ENDOTHELIAL CELLS EA.HY 926 ON POLISHED AND SANDBLASTED SURFACES OF TITANIUM ALLOYS Ti6Al4V AND Ti6Al7Nb

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO<sup>1\*</sup>, M. WALCZYŃSKA<sup>2</sup>,  
P. KOMOROWSKI<sup>2</sup>, L. KLIMEK<sup>1</sup>, B. WALKOWIAK<sup>2</sup>

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
1 STEFANOWSKIEGO STR., 90-924 LODZ, POLAND:

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF MATERIALS' RESEARCH,

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

\*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 39-41]

With their specific mechanical properties, titanium-based alloys are considered as the most biocompatible among metallic biomaterials. Thus, they constitute a very attractive materials for applications in various fields of medicine and implantology. The vast majority of implantable devices in orthopedics, dental prosthetics and cardiac surgery is made of the commonly known titanium alloy with aluminum and vanadium - Ti6Al4V. However, according to some researches, this alloy should be used with a proper care because of toxicity of vanadium during exploitation of the implant in the highly corrosive biological environment. This risk is eliminated for titanium alloy with aluminum and niobium - Ti6Al7Nb, which appears to have not only a higher biocompatibility but also increased resistance to corrosion than commonly used Ti6Al4V alloy.

Surface topography, energy and its chemical composition play a vital role in adhesion of cells to the implant's surface. To assess the influence of surface modification of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys on proliferation, viability and differentiation of osteoblastic and endothelial cells, the cells' cultures were grown on two kind of surfaces: polished and sandblasted. Sandblasting ensures, at low costs, development of biomaterial's surface and potentially better tissue integration.

Samples made of aforementioned materials were disc-shaped, 20 mm in diameter and 3 mm thick. They were grinded on abrasive papers of decreasing grain grit: 80, 260, 600, 800, 1200, then polished with silica-based paste (Struers). Additionally, some samples of each alloy were sandblasted with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> grains 110 μm in size which were hitting the surface at a 45° angle and a pressure of 4-5 Bar. Then all discs were cleaned in an ultrasonic bath in acetone for 10 minutes and in deionised water for the next 10 minutes.

Assessment of proliferation rate of Saos-2 cells on polished and sandblasted surfaces of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb was preceded with steam sterilized samples. After autoclaving the samples were incubated for 48h with suspension of osteoblastic cells Saos-2 in full medium (McCoy's 5a Modified Medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin) at 37°C, in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and relative humidity 100%. Control samples were prepared as well: cells that were not in contact with any examined material (control) and cells that were grown on the surface of polished medical steel AISI 316L (reference sample). Medical steel has well-defined biological proper-

które stanowiły komórki nie poddane kontaktowi z biomateriałem (kontrola) oraz komórki poddane kontaktowi z polerowaną powierzchnią stali medycznej AISI 316L (tzw. próbka referencyjna). Zastosowanie polerowanej stali medycznej jako standardu wewnętrznego wynika z konieczności uwzględnienia zmienności biologicznej badanych komórek, a materiał ten, dzięki wieloletnim badaniom prowadzonym w Zakładzie Biofizyki PŁ, posiada dobrze scharakteryzowane właściwości biologiczne. Po okresie inkubacji badanych próbek z zawieszoną osteoblastów przeprowadzono obserwację z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus GX-71 i mieszaniny znaczników fluorescencyjnych calcein AM/ethidium D1 (Invitrogen), znakujących odpowiednio komórki żywe na

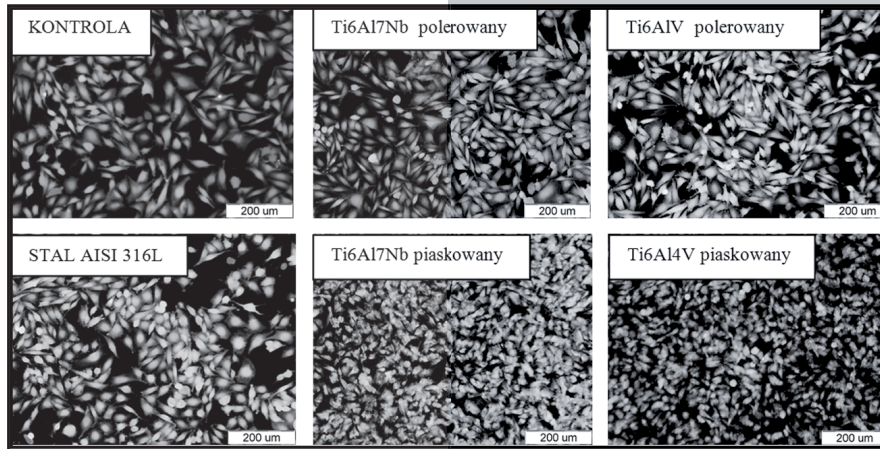
zielono i martwe na czerwono (RYS. 1 i 2).

Analogiczny eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem hodowli komórek śródbłonna linii Ea.hy 926 prowadzonej w Dulbecco's Modified Eagle's Medium z dodatkiem 10% FBS, glukozy, penicyliny, streptomycyny oraz HAT.

Dla obu linii komórkowych testy przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

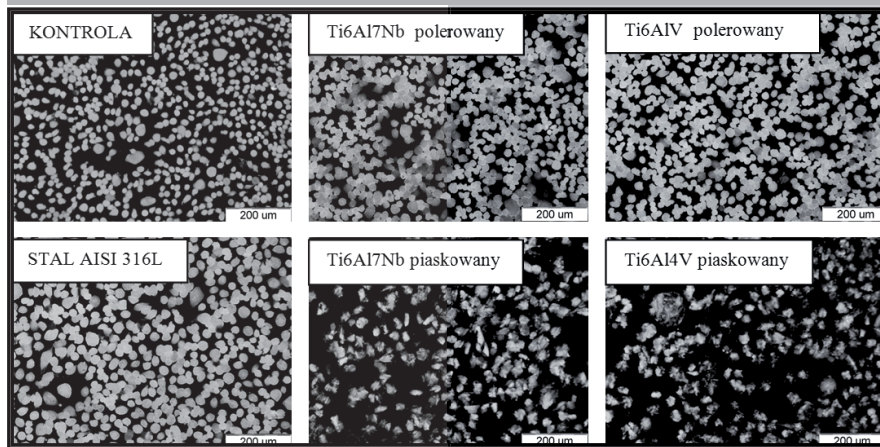
Do zliczenia całkowitej liczby komórek oraz komórek żywych i martwych na poszczególnych powierzchniach wykorzystano program Image J. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. W TABELI 1 przedstawiono zestawienie otrzymanych wyników z uwzględnieniem istotności statystycznej. Porównanie uzyskanych danych pozwala sformułować następujące wnioski:

- Polerowana powierzchnia stopów tytanu sprzyja zwiększonej proliferacji komórek endotelialnych, natomiast osteoblasty wykazują większą tendencję do zasiedlenia powierzchni piaskowanych.
- Najwyższy odsetek komórek martwych, zarówno osteoblastów, jak i komórek endotelium, znaleziono na piaskowanej powierzchni stopu Ti6Al4V. Dla powierzchni polerowanej Ti6Al4V tendencja ta została zaobserwowana w przypadku osteoblastów. Wyniki te potwierdzają cytotoxycznosc stopu tytanu z wanadem w porównaniu do stopu tytanu z niobem.



RYS. 1. Osteoblasty Saos-2 na stopach tytanu, stali medycznej i kontroli, pow. 100x.

FIG. 1. Human osteoblasts Saos-2 on titanium alloys, medical steel and control; 100x magnification.



RYS. 2. Komórki śródbłonna EA.hy 926 na stopach tytanu, stali i kontroli, pow. 100x.

FIG. 2. Endothelial cells EA.hy 926 on titanium alloys, medical steel and control; 100x magnification.

ties and serves as the inter-laboratory standard in Department of Biophysics, assuring consideration of cells' biological variation. After incubation period the samples' surface were observed with the use of fluorescence microscope Olympus GX-71 and the mixture of fluorescent dyes: calcein AM/ethidium D1 (Invitrogen) which stain living cells green and dead cells red (FIGs.1 and 2).

A parallel experiment was conducted with the use of human endothelial cells culture line EA.hy 926 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS, penicillin, streptomycin and HAT. All of the tests were carried out in three independent experiments.

Total number of proliferating cells as well as the number of living and dead cells was counted with Image J program. Statistical

analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA). Obtained results with their statistical significance are collected in TABLE 1. Comparison of presented data allows to make the following conclusions:

- Polished surfaces of titanium alloys conduce highest proliferation rate of endothelial cells, whereas osteoblastic cells tend to proliferate more on sandblasted than polished surfaces.
- The highest number of dead osteoblastic as well as endothelial cells were found on sandblasted Ti6Al4V surface. For polished Ti6Al4V surface this tendency is observed for osteoblasts. These results confirm cytotoxicity of titanium-vanadium alloy when compared to titanium-niobium alloy.

## Acknowledgements

*This study was financially supported by „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.*

**TABELA 1. Proliferacja osteoblastów i komórek śródbłonka na badanych materiałach.**  
**TABLE 1. Proliferation of osteoblastic and endothelial cells on examined materials.**

	Kontrola Control (1)	AISI 316L (2)	Ti6Al7Nb polerowany polished (3)	Ti6Al7Nb piaskowany sandblasted (4)	Ti6Al4V polerowany polished (5)	Ti6Al4V sandblasted (6)	Istotność Significance (Test ANOVA)
<b>Proliferacja osteoblastów Saos-2 / Proliferation of osteoblasts Saos-2</b>							
Całkowita liczba komórek w polu widzenia (pow. 100x) Total number of cells at 100x magnification	694 ± 307 (100%)	647 ± 309 (100%)	791 ± 323 (100%)	866 ± 294 (100%)	607 ± 248 (100%)	764 ± 225 (100%)	4-5 p<0,05 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek żywych Number and percent of living cells	675 ± 298 (97,2%)	628 ± 301 (97,1%)	771 ± 316 (97,4%)	846 ± 289 (96,7%)	587 ± 241 (96,7%)	730 ± 208 (95,6%)	4-5 p<0,05 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek martwych Number and percent of dead cells	19 ± 11 (2,8%)	19 ± 9 (2,9%)	20 ± 10 (2,6%)	20 ± 11 (2,3%)	20 ± 17 (3,3%)	34 ± 20 (4,4%)	1-6, 2-6 p<0,01 3-6,5-6,4-6 p<0,05 pozostałe: p>0,05
<b>Proliferacja komórek śródbłonka EA.hy 926 / Proliferation of endothelial cells EA.hy 926</b>							
Całkowita liczba komórek w polu widzenia (pow. 100x) Total number of cells at 100x magnification	591 ± 240 (100%)	600 ± 272 (100%)	833 ± 202 (100%)	492 ± 183 (100%)	849 ± 182 (100%)	569 ± 150 (100%)	1-3,1-5,2-5,3-4,3-6,4-5,5-6 p<0,001 2-3 p<0,01 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek martwych Number and percent of dead cells	575 ± 240 (97,3%)	588 ± 270 (97,9%)	817 ± 203 (98%)	478 ± 181 (97,3%)	832 ± 180 (98%)	551 ± 149 (96,8%)	1-3,1-5,2-5,3-4,3-6,4-5,5-6 p<0,001 2-3 p<0,01 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek martwych Number and percent of dead cells	16 ± 6 (2,7%)	13 ± 4 (2,1%)	16 ± 7 (2%)	13 ± 8 (2,7%)	17 ± 7 (2%)	18 ± 5 (3,2%)	4-6 p<0,05 pozostałe: p>0,05

## Podziękowania

*Badania finansowane w ramach projektu „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.*

## COMPUTER AIDED EVALUATION OF POROACCESSIBILITY OF POROUS COATINGS OUTER LAYER OF INTRA-OSSEOUS IMPLANTS

RYSZARD UKLEJEWSKI<sup>1</sup>, MARIUSZ WINIECKI<sup>1\*</sup>,  
WOJCIECH RADOMSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KAZIMIERZ WIELKI UNIVERSITY IN BYDGOSZCZ,  
FACULTY OF MATHEMATICS, PHYSICS & TECHNICAL SCIENCES,  
DEPARTMENT OF FUNDAMENTALS OF MEDICAL BIOENGINEERING,  
BYDGOSZCZ, POLAND

<sup>2</sup>STUDENT OF INFORMATICS MASTER'S COURSE,  
POZNAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF INFORMATICS, POZNAN, POLAND

\*E-MAIL: WINIECKI@UKW.EDU.PL

The poroaccessibility of intra-osseous implant coating is the ability of the porous coating outer layer to accommodate the ingrowing bone tissue filling its pore space and effective new bone formation mineralizing in the pores to form biomechanically functional bone-implant fixation. The poroaccessibility determines the functional features of intra-osseous implant porous coating which are called its structural-osteoinductive properties [6,8]. The structural-osteoinductive properties can be characterized by the set of three-dimensional parameters of poroaccessibility describing the functional properties of microgeometry of implant porous coatings: the effective volumetric porosity  $\phi_{Vef}$ , the index of the porous coating space capacity  $V_{PM}$ , the representative surface porosity  $\phi_{Srep}$ , the representative pores size  $p_{Srep}$ , the representative angle of the poroaccessibility  $\Omega_{rep}$  and the bone-implant interface adhesive surface enlargement index  $\psi$  [3,7,1].

The original method of stereometric evaluation of the microstructural properties of intra-osseous implants porous coatings by means of the parameters of

poroaccessibility [4] is based the 3D roughness profilometry and was preliminary verified during experimental tests performed on the representative examples of porous coated femoral stems and acetabular cups of various hip endoprostheses [2,5,9].

In this paper we present the possibilities of computer aiding for evaluation of the poroaccessibility of porous coating outer layer of intra-osseous implants illustrated by the measurement data from the experimental tests performed on porous coated components of various hip endoprostheses.

The computer aided evaluation of the microstructure of implant porous coatings can be realized by the authoring application software PoroAccess\_1.0 elaborated for our purposes in our research team in Java programming language. The screen of the application software is presented in FIG.1. The PoroAccess\_1.0 software lets to perform the dynamic analysis of the surface porosity  $\phi_S$  in function of the pores depth  $pd$  which is showed as the map of porosity situated on the right side of the screen (see FIG.1). The application software imports results from the series of contact profilometry measurements as the 2D matrices in ASCII format and calculates the values of the poroaccessibility parameters of porous coating outer layer according to the mathematical formulas given in [3,11]. The applications software also has the module enabling 3D visualization of measured region of porous coating outer layer as the isometric plot.

The presented methodology provides the characterization of the effective part of porous coating – its outer layer, which is full of pores open for penetrating bone tissue with the diameter of many macro pores surpassing 100  $\mu\text{m}$ . Such size of pores, according to clinical research [1], is beneficial for bone tissue to grow into the coating, so the pore space of the porous coating outer layer participates in creating biomechanically functional bone-porous implant fixation. The set of poroaccessibility parameters characterizes some major aspects of porous coating outer layer features. The parameters describe spatial ( $\phi_{Vef}$ ,  $\phi_{Srep}$ ),

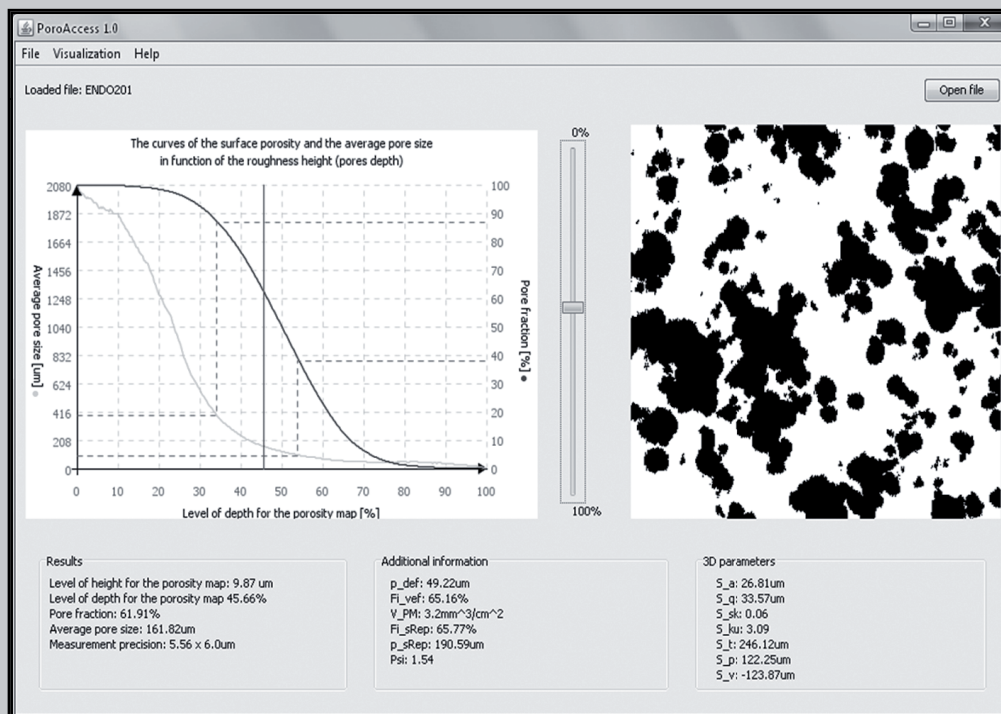


FIG. 1. Screen of the PoroAccess\_1.0.

volumetric ( $V_{PM}$ ), hybrid (pdef,  $\Omega_{rep}$ ) and some functional (physicochemical) properties of implant porous coatings outer layer, e.g. enhancement of the adhesive properties ( $\psi$ ), which can be indirectly interpreted in the aspect of its structural-osteoinductive properties [10].

The presented methodology of characterization of implant porous coatings with use of the poroaccessibility parameters is going to be applied as a specific tool in research on designing porous coatings with functionally graded pore distribution and designed poroaccessibility. Nowadays, the best potential to manufacture implant porous coatings with designed poroaccessibility have Direct Metal Manufacturing (DMM) technologies like Selective Laser Sintering/Melting (SLS/M) or Electron Beam Melting (EBM), so the next stage of this research is the investigation on the possibilities to manufacture the porous coating with designed poroaccessibility in one of DMM technologies.

The biostructural evaluation of the manufactured in DMM technologies porous coatings together with its biological evaluation in NHOst cultures is expected to provide more information about the representative features of the microstructure of the porous coatings and allow to evaluate the most advantageous poroaccessibility of their pore spaces for potential bone tissue ingrowth to be verified in further in vivo test on animal models.

**[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 42-43]**

## References

- [1] Brooker A.F., Collier J.P., Evidence of bone ingrowth into a porous-coated prosthesis, *J. Bone Joint Surg. Am.* 1984, 66, 619-621.
- [2] Uklejewski R., Winięcki M., Czapski T., Rogala P., Kochański J., Parametric evaluation of implant porous coatings – the results from representative examples of femoral stems measurements. *Inżynieria biomateriałów*, 2008, 11(77-80), 101-103.
- [3] Uklejewski R., Winięcki M., Mielniczuk J., Rogala P., Auguściński A., The poroaccessibility parameters for three-dimensional characterization of orthopedic implants porous coatings, *Metrology MS*, 2008, 15(2), 215-226.
- [4] Uklejewski R., Winięcki M., Mielniczuk J., Rogala P., Stereometryczna ocena strukturalno-osteoindukcyjnych właściwości porowatych powłok implantów dokostnych za pomocą parametrów porodostępności. *Mechanik*, 2009, 82(11), 918-921.
- [5] Uklejewski R., Winięcki M., Rogala P., Experimental investigations of porous coatings microstructure of model endosseous implants. *Inżynieria Biomateriałów*, 2009, 12(89-91), 112-114.
- [6] Uklejewski R., Winięcki 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, *Inżynieria Biomateriałów*, 2007, 10 (69-72), 93-95.
- [7] Uklejewski R., Winięcki M., Rogala P., On the characterization of orthopaedic implants porous coatings with three-dimensional roughness measurement, *Proceedings of the 11th International Conference on Metrology and Properties of Engineering Surfaces*, Huddersfield, UK, 16-20.07.2007, 2007, pp. 241-245.
- [8] Uklejewski R., Winięcki 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. *Inżynieria Biomateriałów*, 2006, 9(54-55), 1-13.
- [9] Uklejewski R., Winięcki M., Rogala P., Radomski W., The characterization of structural and osteoinductive properties of orthopaedic implants porous coatings with the set of 3D poroaccessibility parameters. *Proceedings of the 13th International Conference on Metrology and Properties of Engineering Surfaces*, London, UK, 12-15.04.2011, 2011, pp. 103-107.
- [10] Uklejewski R., Winięcki M., Rogala P., The stereometric characterization of the poroaccessibility of plasma sprayed porous coatings outer layer of intra-osseous implants. *Measurement Science and Technology*. (zgłoszony do druku).
- [11] Winięcki M., The Investigation on the Microgeometrical Constructional Properties of Porous Endosseous Implants and the Influence of these Properties on the Strength of the Bone-Implant Model Fixation, (in Polish), PhD Thesis (PhD supervisor: R.Uklejewski), Poznan University of Technology, Faculty of Working Machines and Transportations, Poznan, 2006.

## VIBRATIONAL SPECTROSCOPY INVESTIGATION OF MONTMORILLONITE – CHITOSANE NANOCOMPOSITE MATERIALS

C. PALUSZKIEWICZ, E. STODOLAK

AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

### Abstract

Biomaterials basing on natural polysaccharides, i.e. hialuronic acid, alginate, chitosane are an alternative for already applied bioresorbable synthetic materials basing on synthetic polyhydroxyacids. Their main advantages are good accessibility, low cost, easy forming and high biocompatibility. Additionally, they are a perfect matrix for bioactive nanoparticles i.e. hydroxyapatite (HAp), tricalcium phosphate (TCP) and silica (SiO<sub>2</sub>).

The work presents results of research on nanocomposite consisting of chitosane matrix (CS) modified with a nanofiller, which was natural montmorillonite (MMT). Nanocomposite foils were produced by the casting method. In order to induce better biocompatibility, the surface of the CS/MMT composite was neutralized (bath in NaOH solution). The nanocomposite foils were subjected to a bioactivity test by incubation in SBF at 37°C for 7 days. It was observed that the CS/MMT material surface showed a local supersaturation, which was a result of apatite nucleation. The CS/MMT nanocomposites were investigated using FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) and Fourier Raman Spectroscopy.

FTIR measurements of the samples were carried out on the transmission and reflection modes. The FTIR microscopy spectra were collected using Bio-Rad Excalibur with ATR attachment as well as microscope UMA500 equipped with MCT detector. Spectra were measured at 4 cm<sup>-1</sup> resolution in the region from 4000 cm<sup>-1</sup> to 600 cm<sup>-1</sup>. FT-Raman spectra were obtained using a FTS6000 Bio-Rad spectrometer with Ge detector. The samples were excited with a Nd-YAG laser (1064nm). Additional all materials in all steps experiments were observed under Scanning Electron Microscopy (Nova NanoSEM).

Vibrational spectroscopy methods (FT Raman and FTIR) can be used for investigation of nanocomposite foils basing on biopolymers. High sensitivity the applied spectroscopy techniques show that in the result of the neutralization of CS/MMT foil (via incubation in NaOH solution) the biopolymer chain breaks. This phenomena is visible by intensity ratio between COC/COH bands. Increase of reactivity of chitosane chain lead to entrapment of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, which is the origin of the apatite forms nucleation process.

Chemical treatment of the nanocomposite foils, i.e. NaOH washes influences their chemical structure and microstructure. Neutralisation of the foils is the first processing stage which precedes the potential use of CS/MMT foils in biomedical applications. The materials show a tendency to apatite crystallisation which may support regeneration of damaged bone

tissue. The applied spectroscopic methods allowed to observe changes in the whole volume of the sample.

Individual ATR measurements taken at various spectral ranges and penetration depths allow to observe subtle changes in the polymer matrix caused by chemical treatment (NaOH and SBF incubation). Results of the investigations indicate that in the CS/MMT systems new chemical bonds and related to them vibrations appear. Quantity and quality of the interactions is related to characteristics of the nanoparticle and the presence of forming apatite structures.

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 44]

### Acknowledgements

This work was supported by The Ministry of Science and Higher Education, grant No. N N507 370735.

## TRIBOLOGICAL INVESTIGATIONS OF MATERIALS USED FOR SPINE DISC IMPLANTS

M. GIERZYŃSKA-DOLNA, M. LIJEWSKI, T. WIŚNIEWSKI, J. MAGDA

METAL FORMING INSTITUTE  
14 JANA PAWŁA II STR., 61-139 POZNAŃ, POLAND  
WWW.INOP.POZNAN.PL

### Abstract

Ailments linked to back pain is a serious problem not only medical but also social. Not only elder people but also people in working age suffers from problems related to spine pain. The most common disorders of the spine are pain syndromes of the lumbar part where center of gravity of the human body is located and where major forces are acting on the vertebrae and intervertebral discs. The market currently offers a variety of spinal implant solutions (FIG. 1).

In the Metal Forming Institute there is realized research Project entitled Investigations and spine im-



FIG. 1. Examples of artificial discs: a) Bryan's disc, Acroflex implant, c) Charite disc, ProDiscII prosthesis, e) ProDisc prosthesis.



FIG. 2. Simulator for intervertebral spine disc investigations.

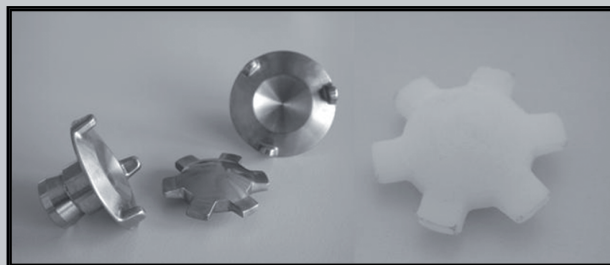


FIG. 3. Proposed solutions of spine implant liner.

couple materials tested: 316L steel - polyethylene UHMWPE – 316L steel, titanium alloy Ti6Al4V – polyethylene UHMWPE and nitrided Ti6Al4V titanium alloy – polyethylene UHMWPE.

Influence of number of cycles on friction coefficient, surface roughness and polyethylene liner thickness change illustrates FIG.4. As it results from performed investigations, too high hardness level of metal elements (upper and lower clasps) provides to accelerated wear of the polyethylene part. New challenge is application of "metal-metal" friction couple.

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 44-45]

### Acknowledgements

Investigations realized in the frame of research own Project founded by Ministry of Science and Higher Education. Agreement no. 4795/B/T02/2009/37, Investigations and spine implants functionality evaluation in material and tribological aspects

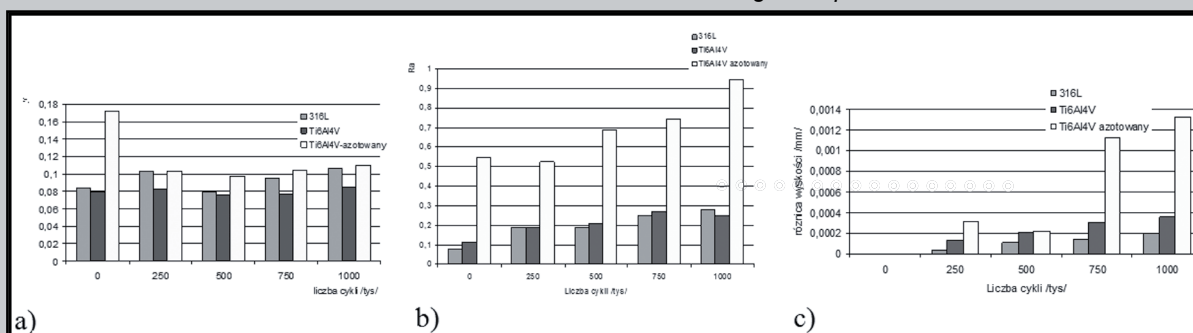


FIG. 4. Influence of number of cycles on friction coefficient (a), surface roughness (b), and polyethylene liner thickness (c).

plants functionality evaluation in material and tribological aspects.

In the frame of the Project it was designed and manufactured special simulator adapted for intervertebral spine discs implants investigations. Simulator scheme is presented on FIG.2.

Main goals of the realized Project are:

- Investigation of friction-mechanical processes during implant usage.
- Evaluation of wear intensity of various types of intervertebral discs and investigations of appearing wear products.
- Selection of optimal material and surface machining method providing minimal wear of intervertebral disc elements wear.

For experiments there was implant designed by K. Skalski and J. Skworodko selected [1], which consists of 3 elements: upper liner, lower liner and nucleus pulpous (FIG.3). Actually there are 3 types of friction

### References

- [1] J. Skworodko: Metodyka projektowania implantu międzykręgowego kręgosłupa lędźwiowego. Rozprawa doktorska, Warszawa 2008.
- [2] J. Skworodko, K. Skalski, Z. Kędzior, P. Borkowski: Implant krążka międzykręgowego kręgosłupa lędźwiowego. Przegląd lekarski 2004/61. Kraków str. 147-150.

## INFLUENCE OF HIP ENDOPROSTHESES IMPLANTATION ERROR ON IMPLANTS WEAR

W. WOŹNIAK<sup>1</sup>, M. LIJEWSKI<sup>2</sup>, A. MRÓZ<sup>2</sup>, M. GIERZYŃSKA-DOLNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POZNAŃ UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES,  
DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY  
135/147 28 CZERWCA STR., 61-545 POZNAŃ, POLAND

<sup>2</sup> METAL FORMING INSTITUTE  
14 JANA PAWŁA II STR., 61-139 POZNAŃ, POLAND  
WWW.INOP.POZNAŃ.PL

### Abstract

*Scientific goal of the Project is determination of femoral head and acetabular cup symmetry axes determination for patients after hip endoprosthesis implantation, investigation and adjudication of physicochemical and mechanical processes in hip joint implants exploitation taking account into tribological processes and wear intensity evaluation with different correlated femoral head and acetabular cup setting. Investigations also contains examination of amount of metal ions in patients bodies after hip replacement operations.*

*Planned effect of the Project is determination of parameters assigning operation technique quality and indication of optimal friction couple setting. In the frame of the Project friction moment run and friction work values for single cycle in dependence on correlated setting of endoprosthesis components and as a consequence influence of implant setting on amount of metal ions releasing to human body will be determined using simulator.*

*The extent of work contains:*

1. Computer tomography digital images of patients after hip replacement database preparation
2. Study the impact of prosthesis setting on amount of released metal ions: chromium and cobalt to the human organism.
3. The development of digital image processing method for endoprosthesis setting modeling using FEM.
4. Investigate the friction-wear investigations performance with different endoprosthesis settings.
5. Characterization of the wear products after tribological tests.
6. Optimal endoprosthesis settings database elaboration.
7. Verification and optimization of mounting through numerical analysis of implant-bone system in endoprosthesis.

*The final result of the Project is to improve the surgical navigation system by identifying in femoral head and acetabular cup setting that will provide the least resistance to motion, increased stability and the least amount of metal ions released during exploitation. Initiators intend to create a database containing the assignment of setting parameters for exploitation properties. In the future it is planned to use the developed database for surgical navigation software, enabling surgeons to avoid negative endoprosthesis mutual settings during operation.*

[*Engineering of Biomaterials*, 109-111, (2011), 46]

### Acknowledgements

*Project funded by the National Research and Development Centre from public education funds, project no NR03-0081-10 Fri: "Investigation of parameters of friction and wear at different mutual setting of endoprosthesis elements."*

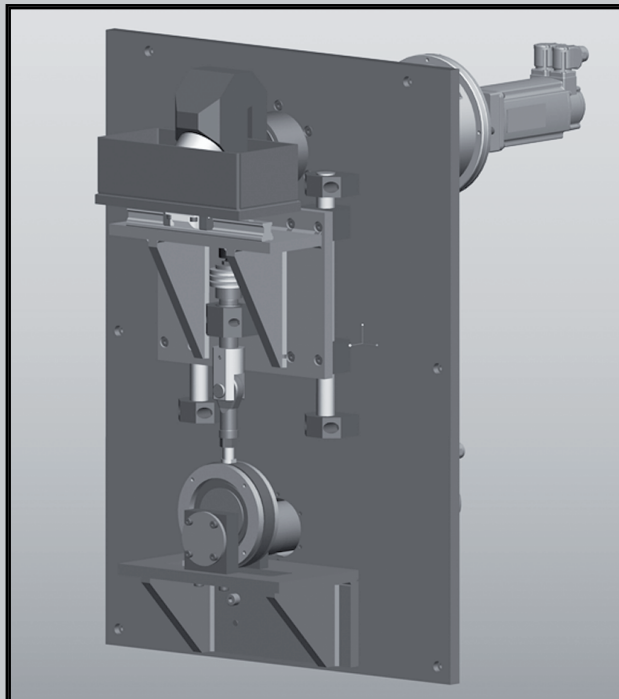


FIG. 1. Simulator for of hip endoprosthesis testing designed and manufactured in Metal Forming Institute in Poznan.



## MODYFIKACJA POWIERZCHNI STOPÓW NiTi

M. FREITAG<sup>1\*</sup>, J. LELAŃKO<sup>1</sup>, B. ŁOSIEWICZ<sup>1</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, T. GORYCZKA<sup>1</sup>

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

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

\*E-MAIL: MARLENA.FREITAG@US.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 47-50]

### Wstęp

Stopy NiTi znajdują praktyczne zastosowanie zarówno w medycynie jak i weterynarii oraz jako narzędzia chirurgiczne oferując małoinwazyjne zabiegi chirurgiczne [1]. Jednakże z długotrwałym zastosowaniem w organizmie materiału o tak wysokiej zawartości niklu wiąże się ryzyko uwalniania jego jonów do krwioobiegu. Nikiel jest znany ze swojej toksyczności oraz kancerogenności, dodatkowo może powodować alergie u wrażliwych osób [2]. Początkowo jony niklu uwalniane są bardzo powoli i ich wykrycie jest prawie niemożliwe ze względu na ich niski poziom w środowisku organizmu ludzkiego. Udowodniono jednak, iż szybkość uwalniania jonów niklu z czasem może znacząco wzrosnąć, w związku z czym istnieje potrzeba modyfikacji stopów NiTi w celu podniesienia ich odporności korozyjnej [3,4]. Tego rodzaju modyfikację można przeprowadzić np. poprzez zmianę składu chemicznego stopu czyli zmniejszenie zawartości niklu lub jego całkowitą eliminację. Otrzymane w ten sposób stopy nie wykazują jednak zadawalających efektów związanych z indukowaniem efektu pamięci kształtu. Z tego powodu główną metodą poprawy odporności korozyjnej stopów jest modyfikacja ich powierzchni.

## SURFACE MODIFICATION OF NiTi ALLOYS

M. FREITAG<sup>1\*</sup>, J. LELAŃKO<sup>1</sup>, B. ŁOSIEWICZ<sup>1</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, T. GORYCZKA<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, 141 WOŁOWSKA STR., 02-507 WARSAW, POLAND

\*E-MAIL: MARLENA.FREITAG@US.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 47-50]

### Introduction

In a practice NiTi alloys have been applied in both medicine and veterinary fields and also as surgical instruments offering low-invasive surgery [1]. However, with long-term use in the human body of these materials with such a high nickel content the risk of release of ions into the bloodstream is associated. Nickel is well known for its toxicity and carcinogenicity, and additionally may cause allergies in sensitive people [2]. Initially, nickel ions are released very slowly and their detection is almost impossible due to their low level in the environment of the human body. However, it has been proven in many studies that the release rate of nickel ions over time may increase significantly, thus there is the need for modification of NiTi alloys in order to increase their corrosion resistance [3,4].

This kind of modification can be performed for example by change of the alloy composition or reduction of nickel content or its complete elimination. The obtained in this way alloys do not exhibit satisfactory results related to the induction of shape memory effect. For this reason, the main method of improving the corrosion resistance of alloys is their surface modification.

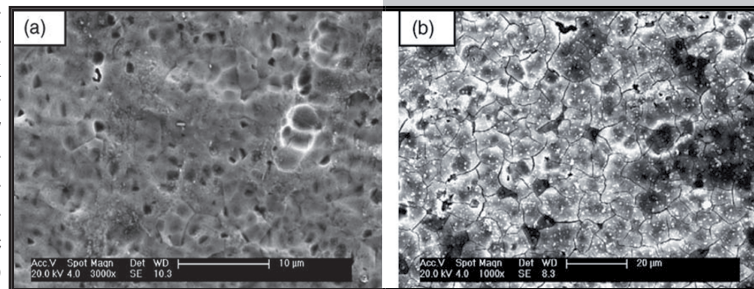
TABELA 1. Metody otrzymywania warstw pasywnych na stopach NiTi.  
TABLE 1. Methods for obtaining passive layers on NiTi alloys.

Modyfikacja Modification	Pasywacja w wodzie Passivation in water	Pasywacja w powietrzu Passivation in air	Pasywacja – implantacja jonów Passivation – ion implantation	Pasywacja laserowa Laser passivation	Pasywacja elektrochemiczna Electrochemical passivation	Pasywacja metodą zol- żel Sol-gel passivation	Passivation by autoclaving
Grubość warstwy Layer thickness	10 – 26 nm	-	-	25 nm	20 nm	200 nm	~3 nm
Struktura Structure	Nisko skry- stalizowany rutil i anataz Low-crystall- ized rutile and anatase	Amorficzna Amorphous	Amorficzna TiO <sub>2</sub> i krystaliczna Ti <sub>3</sub> Ni <sub>4</sub> Amorphous TiO <sub>2</sub> and crystalline Ti <sub>3</sub> Ni <sub>4</sub>	Amorficzna Amorphous	Amorficzna Amorphous	Amorficzna Amorphous	Amorficzna Amorphous
Odporność korozyjna Corrosion resistance	E <sub>kor</sub> =33 mV E <sub>pb</sub> =1227mV E <sub>cor</sub> =33 mV E <sub>br</sub> =1227mV	-	-	E <sub>kor</sub> = -327 mV E <sub>pb</sub> =1500 mV E <sub>cor</sub> = -327 mV E <sub>br</sub> =1500 mV	E <sub>kor</sub> = -208 mV E <sub>cor</sub> = -208 mV	-	E <sub>pb</sub> =1900 mV E <sub>br</sub> =1900 mV
Inne Other	Słaba adhezja Poor adhesion	Przy wyższych temp. Ni <sub>3</sub> Ti At higher temp. Ni <sub>3</sub> Ti	Duża grubość Large thickness	Strefa wpływu ciepła – 60 nm Heat-affected zone – 60 nm	Współczynnik chropowatości 0,04 Roughness factor 0,04	Współczyn- nik chropowato- ści 3,9 Roughness fac- tor 3,9	Dobra adhezja Good adhesion

Wytwarzanie tlenków tytanu, azotków tytanu, powłok diamentopodobnych, biopolimerowych czy apatytowych stanowi potencjalny sposób uzyskiwania powłok chroniących organizm ludzki przed szkodliwym wpływem niklu. Podnoszenie odporności korozyjnej poprzez pasywację powierzchni jest obecnie najbardziej rozpowszechnione. Pasywacja stopów NiTi prowadzi do powstania na ich powierzchni stabilnej powłoki  $TiO_2$ , która w istotny sposób ogranicza uwalnianie jonów niklu. Na chwilę obecną nie istnieje jedna, standardowa metoda wytwarzania warstw pasywnych. Jedną z najtańszych oraz najprostszych metod jest sterylizacja w parze wodnej (TAB. 1), w której duży dostęp tlenu oraz podwyższona temperatura i ciśnienie prowadzą do uzyskania amorficznych warstw  $TiO_2$ . Warstwy pasywne otrzymane w wyniku gotowania w  $H_2O_2$  składają się głównie z rutylu i anatazu, nie stwierdza się w nich obecności Ni jak to ma miejsce przy zastosowaniu pozostałych sposobów modyfikacji. Jednak pomimo dobrych rezultatów warstwy otrzymane w ten sposób wykazują słabą przyczepność do podłoża a na ich powierzchni można zaobserwować pęknięcia (RYS.1.), co skutkuje słabszą odpornością korozyjną.

Pasywacja w podwyższonej temperaturze w powietrzu może zostać zastosowana jako obróbka termiczna przed osadzeniem apatytu na powierzchni stopu. Przeprowadzone badania [6] wykazały, iż otrzymane w ten sposób warstwy tlenkowe są słabej jakości, natomiast po zainkubowaniu ich w roztworze symulującym środowisko organizmu ludzkiego już po 3 dniach (po obróbce termicznej w  $600^\circ C$ ) na powierzchni powstają zarodki apatytu, a po 14 dniach wytwarza się ciągła warstwa. Niewielka grubość warstw pasywnych wiąże się z dużą możliwością ich uszkodzenia a co za tym idzie możliwością uwalniania jonów niklu. Z kolei grube warstwy tlenkowe ulegają uszkodzeniu podczas indukowania efektu pamięci kształtu dając przesłanki do poszukiwania innych metod.

Inny, bardziej obiecujący sposób modyfikacji, stanowi wytwarzanie warstw azotkowych, które można otrzymać na kilka sposobów (TAB.2.). Wytwarzanie warstw azotkowych przy użyciu wysokich temperatur procesu obróbki, jak to ma miejsce w większości z metod, prowadzi do rozpadu fazy macierzystej z równoczesnym wytworzeniem podwarstwy  $Ni_3Ti$ , Ni-



RYS. 1. Fotografia SEM powierzchni stopu NiTi po: (a) polerowaniu mechanicznym, (b) utlenianiu w  $H_2O_2$  [5].  
FIG. 1. SEM image of NiTi surface after: (a) mechanical polishing, (b) oxidation in  $H_2O_2$  [5].

## Types of surface modification

Production of titanium oxides, titanium nitrides, diamond-like carbon coatings, biopolymers or apatites coatings is a potential way of obtaining protective layers that protect the human body against harmful effect of nickel. Nowadays, the most widespread is improvement of corrosion resistance by surface passivation. The passivation of NiTi alloys leads to obtainment a stable  $TiO_2$  coating on the surface, which significantly reduces the nickel ions release. At the present moment, there is no single, standard method for producing passive layers. One of the cheapest and simplest methods is steam sterilization (TAB. 1) in which the large access of oxygen and high temperature and pressure leads to obtainment of amorphous  $TiO_2$  coatings. The passive layers obtained by boiling in  $H_2O_2$  are mainly composed of rutile and anatase, there was no presence of nickel ions as it was ascertained using other methods of modification. Despite the good results, the layers obtained by such a method exhibit a poor adhesion to the substrate and one can observe cracks on their surface (FIG. 1) what results in weaker corrosion resistance.

Passivation at higher temperatures in air may be used as a thermal pre-treatment before apatite deposition on the alloy surface. The carried out studies [6] showed that the oxide layers obtained in this way are of poor quality but after incubation them in a solution simulating conditions of the human body already after 3 days (after heat treatment at  $600^\circ C$ ) there are apatite nucleus formed on the surface and after 14 days a continuous layer is formed. The small thickness of the passive layers is connected with a great possibility of their damage and hence with the possibility of release of nickel ions. In other hand, thick oxide layers can be damaged during the induction of shape memory effect giving reasons to search other methods.

Another more promising method of modification is the production of nitride layers that can be obtained in several

ways (TAB. 2). The production of nitride layers using high temperatures of treatment process leads to the disintegration of the parent phase with simultaneous creation of  $Ni_3Ti$ ,  $Ni_3Ti_4$  or  $NiTi_2$  sublayers as is the case in most of methods. Appearance of the sublayer of this type has a negative effect on the induction of shape memory effect.

TABELA 2. Metody otrzymywania warstw azotkowych na stopach NiTi.  
TABLE 2. Methods for obtaining nitride layers on NiTi alloys.

Modyfikacja Modification	Azotowanie - PIRAC Nitriding – PIRAC	Niskotemperaturowe azotowanie jarzeniowe Low-temperature glow discharge nitriding	Azotowanie laserowe Laser nitriding	Azotowanie – implantacja jonów Nitriding – ion implantation
Grubość warstwy Layer thickness	0,4 – 1,5 nm	6,22 – 47,4 nm	2 µm	-
Struktura Structure	-	Nanokrystaliczna Nanocrystalline	Dendrytyczne ziarna fazy TiN Dendritic grains of TiN phase	-
Odporność koro- zyjna Corrosion resis- tance	$E_{kor} = -130$ mV $E_{pb} = 540$ mV $E_{cor} = -130$ mV $E_{br} = 540$ mV	$E_{kor} = -400$ mV $E_{pb} = 2500$ mV $E_{cor} = -400$ mV $E_{br} = 2500$ mV	-	$E_{kor} = -163$ mV $E_{pb} = 1170$ mV $E_{cor} = -163$ mV $E_{br} = 1170$ mV
Inne Other	Mikrotwardość 4 – 18 GPa Microhardness 4 – 18 GPa	Podwarstwa – 39 nm Sublayer – 39 nm	Mikrotwardość 800 – 2000 HV Microhardness 800 – 2000 HV	Mikrotwardość 9,41 – 29,21 GPa Microhardness 9.41 – 29.21 GPa

$\text{Ti}_3$  czy  $\text{NiTi}_2$ . Powstanie tego rodzaju podwarstwy ma negatywny wpływ na indukowanie efektu pamięci kształtu. W przypadku użycia lasera, mimo iż nie występują tego rodzaju fazy, pojawiają się dendrytyczne ziarna fazy TiN, które formują się w wyniku reakcji stopionego tytanu z gazowym azotem a następnie szybkiego krzepnięcia produktów tej reakcji [7].

Możliwość eliminacji tego rodzaju zjawisk zapewnia metoda azotowania niskotemperaturowego, którą można przeprowadzić już w temperaturze poniżej 400°C.

Otrzymane w ten sposób warstwy mają strukturę nanokrystaliczną (RYS. 2), dużo mniejszą grubość oraz cechują się bardzo dobrą odpornością korozyjną oraz biogodnością [8].

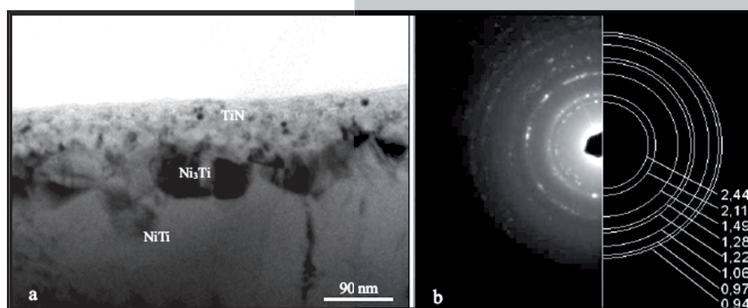
Warstwy diamentopodobne oraz hydroksyapatytowe stosowane są w elementach statycznych, gdyż charakteryzują się wysoką wytrzymałością mechaniczną, dobrą odpornością na zużycie czy też biokompatybilnością. Warstwy te nie spełniają swojej ochronnej funkcji w przypadku elementów wykorzystujących zjawisko pamięci kształtu ze względu na ich relatywnie dużą grubość oraz słabą przyczepność do podłoża - w czasie odkształcania łuszczą się i odpadają [9-11].

Warstwy biopolimerowe można otrzymywać w wyniku elektroosadzania na powierzchni stopu kilku, naprzemiennie ułożonych, cienkich warstw polietylenoiminy oraz heparyny - która ma zapobiegać tworzeniu się skrzepów na powierzchni stopu [12,13]. Zastosowana modyfikacja zapewnia lepszą odporność korozyjną, zwilżalność oraz biokompatybilność. Dodatkowo w tego rodzaju warstwach można zabudowywać różnego rodzaju cząstki zawierające leki, które można uwalniać w kontrolowany sposób.

## Podsumowanie

Istnieją różne metody modyfikacji powierzchni zapewniające otrzymanie grubych warstw na potrzeby zastosowań statycznych, które w wyniku indukowania pamięci kształtu ulegają niszczeniu. W przypadku modyfikowania powierzchni stopów przeznaczonych na implanty medyczne wykorzystujące efekt pamięci kształtu, konieczne jest wytworzenie warstw ochronnych zdolnych do odkształceń związanych z indukowaniem tego efektu. Do najbardziej obiecujących należą:

- Metoda sterylizacji w autoklawie prowadząca do wytworzenia cienkich, sprężystych warstw ok. 3 nm, które mogą pracować w warunkach dynamicznych. Ze względu na duże powinowactwo tytanu do tlenu, nawet w przypadku uszkodzenia tego rodzaju warstw, następuje szybka, samorzutna repasywacja w związku z czym jony niklu nie przedostają się do środowiska organizmu ludzkiego.
- Metoda azotowania jarzeniowego w niskich temperaturach (poniżej 400°C) pozwalająca na wytworzenie cienkich warstw, które zdolne są do małych odkształceń w zakresie indukowania efektu pamięci kształtu (3-6% odkształcenia). Jednocześnie metoda ta w małym stopniu wpływa na zmiany strukturalne w fazie macierzystej oraz daje możliwość pokrywania detali o skomplikowanych kształtach.



**RYS. 2.** Mikrostruktura przekroju poprzecznego warstwy azotkowej otrzymanej w temp. 400°C/5min (a), dyfraktogram dla wybranego obszaru warstwy TiN (b) [8].

**FIG. 2.** Microstructure of cross-section of the nitride layer obtained at 400°C/5min (a), diffraction pattern for a selected area of TiN layer (b) [8].

In the case of a laser use, even though such phases are not present, dendritic grains of TiN phase occur which are formed as the result of reaction of molten titanium with nitrogen gas, and then quick solidification of the products of this reaction [7]. Elimination possibility of this kind of phenomena gives a low-temperature glow discharge nitriding method, which can be carried out at temperature below 400°C. The

obtained in this way layers have a nanocrystalline structure (FIG. 2), they are much thinner and they have very good corrosion resistance and biocompatibility [8].

Diamond-like-carbon (DLC) and hydroxyapatite layers are applied in static elements as they are characterized by high mechanical strength, good wear resistance or biocompatibility. These layers do not fulfill their protective function in the case of elements using shape memory phenomenon due to their relatively high thickness and poor adhesion to the substrate - during deformation they peel and drop off [9-11].

Biopolymer layers can be obtained by electrodeposition on the alloy surface in a form of several alternate thin layers of polyethyleneimine and heparin were deposited where the latter was intended to prevent clot forming on the alloy surface [12,13]. The applied modification ensures better corrosion resistance, wettability and biocompatibility. Additionally, there is a possibility to embed into such layers particles of different types containing drugs that can be released in a controlled way.

## Summary

There are various methods of surface modification that ensure the production of thick layers for the needs of static applications, which are in the result of shape memory induction could be destroyed. In the case of surface modification of alloys assigned for medical implants exhibiting the shape memory effect, it is necessary to produce the protective layers able to deformations related with the induction of this effect. The most promising methods are the following:

- The method of sterilization by autoclaving leading to the formation of thin, elastic layer of about 3 nm which can work under dynamic conditions, and because of a high affinity of titanium to oxygen, even in the case of damage of such layers, fast and spontaneous repassivation proceeds so the nickel ions do not get into the environment of the human body.
- The method of low-temperature glow discharge nitriding (below 400°C) allowing to produce thin films which are able to small deformations in the range of shape memory induction (3-6% of deformation) without a major damage. Simultaneously that method in a small degree influences the structural changes in the parent phase and gives a possibility of covering parts with complicated shapes.

- [1] N.B. Morgan, Mater. Sci. Eng. A 378 (2004) 16-23.  
 [2] G.C. McKey, R. Mavnair, C. MacDonald, M.H. Grant, Biomater. 1996; 17:1339-44.  
 [3] S. Shabalovskaya, J. Anderegg, J. Van Humbeeck, Acta Biomater. 4 (2008) 447-467.  
 [4] G. Rondelli, B. Vicentini, J. Biomed. Mater. Res. 51 (2000) 47-54.  
 [5] C.L. Chua, C.Y. Chungb, P.K. Chub, Mater. Sci. Eng. A 417 (2006) 104-109.  
 [6] Y.W. Gu, B.Y. Tay, C.S. Lim, M.S. Yong, Appl. Surf. Sci. 252 (2005) 2038-2049.  
 [7] Z.D. Cui, H.C. Man, X.J. Yang, Appl. Surf. Sci. 208-209 (2003) 388-393.

- [8] J. Lelaćko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, ESOMAT 2009, DOI:10.1051/eso-mat/200905020.  
 [9] C. Liu, D. Hu, J. Xu, D. Yang, M. Qi, Thin Solid Films 496 (2006) 457-462.  
 [10] R. Hang, Y. Qi, Diamond Relat. Mater. 19 (2010) 62-66.  
 [11] F. Sun, K.N. Sask, J.L. Brash, I. Zhitomirsky, Colloids Surf., B 67 (2008) 132-139.  
 [12] P. Dong, W. Hao, X. Wang, T. Wang, Thin Solid Films 516 (2008) 5168-5171.  
 [13] D.O. Flamini, S.B. Saidman, Cor. Sci. 52 (2010) 229-234.

## BADANIA DOŚWIADCZALNE NOWEJ GENERACJI STABILIZATORÓW PŁYTKOWYCH PRZEZNACZONYCH DO LECZENIA ZNIEKSZTAŁCEŃ PRZEDNIEJ ŚCIANY KLATKI PIERSIOWEJ

A. KAJZER<sup>1\*</sup>, W. KAJZER<sup>1</sup>, J. MARCINIAK<sup>1</sup>, J. DZIELICKI<sup>2</sup>,  
I. JANICKA<sup>3</sup>, W. WOLAŃSKI<sup>4</sup>, B. GZIK-ZROSKA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>POLITECHNIKA ŚLĄSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY,  
INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, GLIWICE

<sup>2</sup>ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KLINIKA CHIRURGII WAD ROZWOJOWYCH DZIECI I TRAUMATOLOGII,  
KATOWICE

<sup>3</sup>ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KLINIKA CHIRURGII KLATKI PIERSIOWEJ, KATOWICE

<sup>4</sup>POLITECHNIKA ŚLĄSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY,  
KATEDRA MECHANIKI STOSOWANEJ, GLIWICE

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

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 50-53]

### Wprowadzenie

Zniekształcenia klatki piersiowej stanowią od lat istotny problem leczniczy i w ponad 90% obejmują: zniekształcenie typu: lejkowatego oraz kurzego. Wprowadzanie w ostatnich latach nowych, małoinwazyjnych technik operacyjnych bazuje na doświadczeniach zespołów interdyscyplinarnych inżynierii biomedycznej. Wytworzenie stabilizatorów płytkowych oraz instrumentarium chirurgicznego opracowanych w Centrum Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej oraz ich wdrożenie do produkcji w BHH Mikromed wielokrotnie obniża koszty zabiegu operacyjnego. Efektem tego jest rozpowszechnienie tej metody leczenia operacyjnego w wielu ośrodkach torakochirurgii w Polsce.

Uzyskane do tej pory efekty przeprowadzonych stabilizacji metodą Nussa są w ocenie klinicznej bardzo pozytywne. Niemniej jednak bieżące analizy doświadczeń klinicznych wskazują na konieczność dalszej weryfikacji i korygowania cech konstrukcyjnych i biomechanicznych stabilizatorów w odniesieniu do populacji wiekowej pacjentów oraz cech

## EXPERIMENTAL ANALYSIS OF THE NEW GENERATION PLATE STABILIZERS USED IN TREATMENT OF ANTERIOR SURFACE DEFORMITY OF CHEST

A. KAJZER<sup>1\*</sup>, W. KAJZER<sup>1</sup>, J. MARCINIAK<sup>1</sup>, J. DZIELICKI<sup>2</sup>,  
I. JANICKA<sup>3</sup>, W. WOLAŃSKI<sup>4</sup>, B. GZIK-ZROSKA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
GLIWICE

<sup>2</sup>MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>3</sup>MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>4</sup>SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF APPLIED MECHANICS, GLIWICE

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

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 50-53]

### Introduction

The anterior surface deformity of chest has been a significant treatment problem since years and in more than 90% it includes pectus excavatum and pectus carinatum types of deformation. Recently introduced new minimally invasive surgery procedures are based on the research of the interdisciplinary biomedical engineering teams. Creating new generation plate stabilizers and surgical tools developed in the Biomedical Engineering Center of the Silesian University of Technology and manufactured by BHH Mikromed significantly decrease costs of a surgical treatment. As a result, the surgical treatment has been widely used in many Thoracic Surgery Centers in Poland. Clinical results of the stabilization obtained so far and carried out using Nuss'es method are very positive. Nevertheless, current analysis of clinical research reveal a necessity of further verification and correction of the constructional and biomechanical features of the stabilizers with a reference to the age of patients and their individual reactivity features. So far it has been observed that in some cases the plate becomes loose and, as a consequence, rotates causing irritation of the inner structure of ribs and breastbone resulting in pain problems. Therefore, implementing new solution of the geometry of the stabilizer will undoubtedly contribute

reaktywności osobniczej. Dotychczas obserwowano przypadki obłuzowania płyty i w następstwie jej obrót powodujący drażnienie wewnętrznej struktury żeber i mostka stwarzając dolegliwości bólowe. Dlatego też zastosowanie nowego rozwiązania geometrii stabilizatora przyczyni się niewątpliwie do zwiększenia komfortu pacjenta po operacji zapewniając prawidłową korekcję wady [1-5].

Wyniki badań numerycznych i doświadczalnych stosowanych obecnie implantów potwierdziły spostrzeżenia klinicystów o konieczność modyfikacji ich geometrii. Dodatkowo przeprowadzone przez Autorów badania odporności korozyjnej płyt w stanie wyjściowym, jak również po określonym czasie użytkowania pozwoliły na opracowanie technologii modyfikacji powierzchni biomateriału metalowego uwzględniającą konieczność sterylizacji implantu [6-8].

W pracy przedstawiono wyniki badań doświadczalnych nowej generacji stabilizatora do leczenia zniekształceń klatki piersiowej o zmodyfikowanej geometrii i sposobie mocowania zapobiegającemu rotacji, obłuzowywaniu i jej przemieszczaniu się podczas stabilizacji. W szczególności wyznaczono wartości siły i przemieszczenia płyty podczas obciążania oraz sprawdzono skuteczność nowego sposobu stabilizacji.

## Metodyka

Do badań doświadczalnych stabilizatora płytkowego do leczenia zniekształceń przedniej ściany klatki piersiowej przygotowano specjalne stanowisko opracowane przez pracowników Zakładu Inżynierii Biomedycznej, które odpowiednio zamontowane w uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Firmy MTS Insight, umożliwiło pomiar wartości przemieszczeń wytypowanych obszarów płyty oraz sił obciążających F. Badaniu poddano płytę o wymiarach 16x3,5x400 mm wykonaną ze stali Cr-Ni-Mo – RYS. 1. Pomiar polegał na rejestrowaniu siły osiowej F w kierunku osi „z” oraz wartości przemieszczeń w kierunku osi „x” odczytywanych dla przemieszczenia osiowego w kierunku osi „z”. Założono możliwość przemieszczeń do 10 mm co 1mm, uwzględniając ugięcie klatki piersiowej. Taka wartość przemieszczeń nie powoduje dolegliwości bólowych.

Aby zasymulować prawidłową stabilizację zdeformowanej klatki piersiowej przed przystąpieniem do badań płytę odpowiednio dogięto do jej anatomicznej krzywizny przy pomocy specjalistycznego instrumentarium chirurgicznego i przymocowano do nowo opracowanej poprzeczki. Następnie zamocowano ją na stanowisku, za pomocą drutu chirurgicznego zgodnie z techniką operacyjną. Stanowisko umożliwiło różny sposób mocowania płyty – z wykorzystaniem podpór stałych (z niewielką możliwością przemieszczania się części bocznej płyty podczas obciążania wynikającą z elastyczności konstrukcji) oraz wykorzystaniem podpory ruchomej (zakładając ograniczenie przemieszczenia do max 10 mm z jednej strony).

to increasing patient's comfort after operation, providing an appropriate correction of the defect [1-5].

The results of numerical and experimental researches of currently used implants have proven the clinical researchers' observation about the necessity of modifying their geometry. Furthermore, conducted by the Author analysis of the corrosion resistance of the plates in initial state as well as after particular time of usage enabled to develop the modification technology of the surface of the steel biomaterial taking the necessity of sterilizing the implant into consideration [6-8].

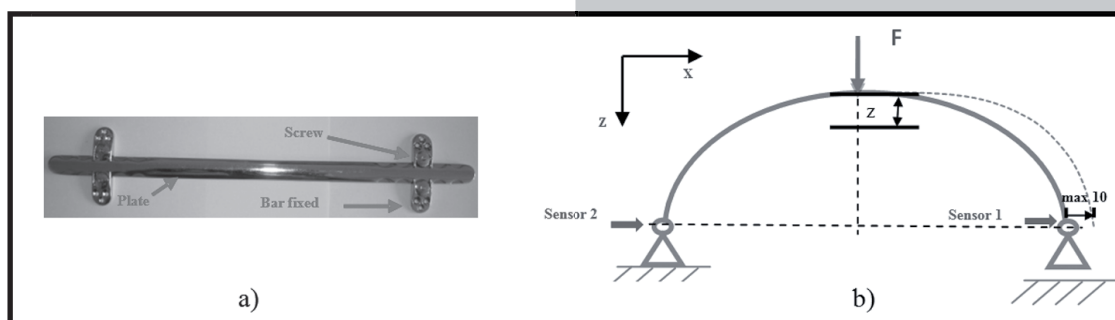
The paper presents the results of an experimental analysis of the new generation stabilizer used for anterior surface deformity treatment with a modified geometry and way of fixing preventing rotation, loosening and its displacement during stabilization. In particular, forces and displacements of the plate during loading were determined and the effectiveness of the new way of stabilizing was verified.

## Methods

In order to conduct experimental research of the plate stabilizer used in anterior chest deformity treatment, a special stand was created by the researchers of the Division of Biomedical Materials Engineering. The stand, properly fixed in universal testing machine manufactured by MTS Insight, enabled calculating results of displacements of chosen areas of the plate and loading forces F. The analysis was performed on the plate 16x3,5x400 mm made of Cr-Ni-Mo stainless steel - FIG. 1. The calculations were based on registering axial force F directed towards axis “z” and the value of displacements directed towards axis “x” interpreted for axial displacement directed towards axis “z”. The possibility of displacements up to 10 mm step of 1mm were assumed, considering chest bending. Such value of displacement does not cause any pain problems.

In order to simulate the correct stabilization of the deformed chest before starting the research the plate was appropriately fitted to its anatomical curvature with the use of the dedicated surgical tools and fixed to the newly designed bar. Then, it was fixed on the stand with surgical wire according to the operational technique. The stand enabled different types of fixing the plate with the use of fixed support (with the small possibility of displacement of the side part of the plate during loading caused by flexibility of the construction) and with the use of mobile support (assuming the limit of the displacement up to maximum 10 mm from one side).

Such way of limiting includes possibility of stabilizer's displacement in the place where it is fixed to ribs while patients breathing. In order to calculate the value of displacements in characteristic areas of the model (along the axis “x”) sensors were used (sensor 1 and sensor 2) according to the scheme shown in FIG.2. The values of displacement directed towards axis “z” were registered with the help of specialist program of the universal testing machine.



RYS. 1. a) konstrukcja stabilizatora płytkowego, b) schemat obciążenia i przemieszczeń.  
FIG. 1. a) The construction of the plate stabilizer, b) the scheme of load and displacements.

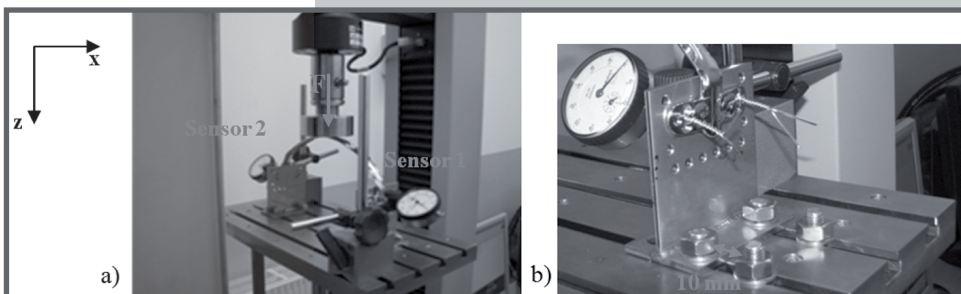
Taki sposób ograniczenia uwzględnia możliwość przemieszczania się stabilizatora w miejscu jej mocowania do żeber podczas oddychania pacjenta. W celu określenia wartości przemieszczeń w charakterystycznych punktach modelu (wzdłuż osi „x”) zastosowano czujniki zegarowe (Czujnik 1 i Czujnik 2) zgodnie ze schematem przedstawionym na RYS.2. Wartości przemieszczenia w kierunku osi „z” rejestrowane były przy pomocy specjalistycznego oprogramowania maszyny wytrzymałościowej.

## Wyniki

Wyniki badań przedstawiono na RYS.3 i w TABLICY 1.

Na ich podstawie można stwierdzić, że przy zadaniu maksymalnej wartości przemieszczenia osiowego „z”=10 mm uzyskuje się siły osiowe: F=888 N przy założeniu sztywnych podpór, natomiast przy możliwości przemieszczania się płyty z jednej strony o wartość max 10 mm siła ta zmalała do wartości F=442 N.

W pierwszym przypadku uzyskane wartości przemieszczenia rejestrowane w punkcie 1 i punkcie 2 wzdłuż osi „x”



RYS. 2. Stanowiska do badań doświadczalnych, mocowanie z wykorzystaniem podpór: a) stałych, b) jednej podpory ruchomej.

FIG. 2. Research stand, fixing with the use of support: a) fixed b) one mobile support.

## Results

The results of the research are presented in FIG.3 and in TAB.1.

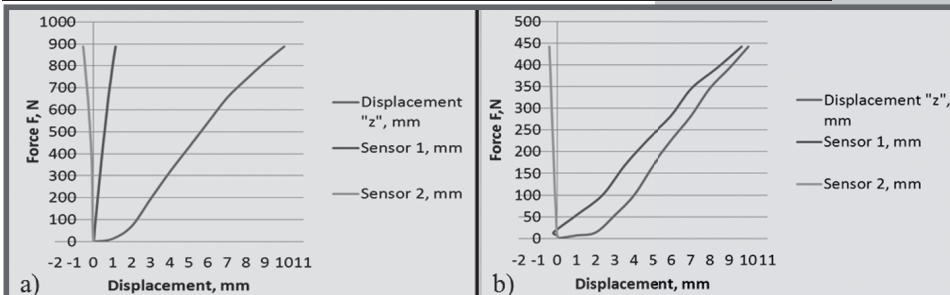
On the basis of the obtained results it can be stated that applying maximum value of axial displacement “z”=10mm, generates the axial force F=888 N for the fixed support, whereas with the possibility of plate displacement from one side with the maximum value of 10 mm, this force decreased to the value of F=442N.

In the first case, obtained displacement values registered in point 1 and point 2 along the “x” axis were respectively equal to: 1,16 mm and 0,54 mm, whereas for the mobile support: 9,65 mm and 0,42 mm.

TABLICA 1. Wartości sił F i przemieszczeń „x” zarejestrowanych przy wartościach przemieszczenia osiowego „z”: od 1 mm do 10 mm co 1 mm.

TABLE 1. The values of the force F and displacement “x” registered at the axial displacement values “z”- from 1 mm to 10 mm.

No	Przemieszczenie Displacement [mm]	Podpory stałe Fixed support			Podpora ruchoma Mobile support	
		Siła / Force F, [N]	Sensor 1 [mm]	Sensor 2 [mm]	Siła / Force F, [N]	Sensor 1 [mm]
1	1	13	0,030	-0,010	7	-0,004
2	2	70	0,080	-0,040	14	-0,200
3	3	195	0,220	-0,050	54	1,000
4	4	317	0,360	-0,070	100	2,350
5	5	429	0,490	-0,120	168	3,500
6	6	542	0,640	-0,200	227	4,700
7	7	654	0,780	-0,290	281	5,950
8	8	738	0,910	-0,380	346	7,050
9	9	817	1,030	-0,460	392	8,350
10	10	888	1,160	-0,540	442	9,650



RYS. 3. Wykres zależności wartości przemieszczenia w osi „x” i „z” od siły F: a) podpory stałe, b) podpora ruchoma.

FIG. 3. The diagram of the dependence of the values of the displacements in axis “x” and “z” on the F force: a) fixed support b) mobile support.

## Conclusions

Obtained in the experimental research values of the axial forces which cause the plate bend of 10 mm were respectively equal to: 888 N with the fixed support and 442 N with the mobile support. Relating obtained results to the results obtained in the analysis of the chest stiffness at children [9], where the maximum axial displacement which did not cause pain problems was obtained at the load of 100 N and ranged from 10 to 20 mm. It can be stated that in both cases, the plate has greater stiffness than a chest, which can be the subject of further research aiming at minimizing the stiffness of the stabilizer through optimizing its geometry – width and thickness of the plate. It was also concluded that the applied type of bars fixation by means of surgical wires ensures the appropriate stabilization of the system. While loading in the first stage, the elimination of clearances between the bar fixed with surgical wire and ribs occurred. The wires were not damaged as well as no clamps were observed to come loose.

Moreover, it was stated that the suggested innovative way of fixing the plate to the bars prevented from its rotation during loading. No mechanical damages of cooperating elements were observed i.e. seats of the plate, bars and locking screws, which

wynosiły odpowiednio: 1,16 mm i 0,54 mm, natomiast dla podpory ruchomej: 9,65 mm oraz 0,42 mm.

## Podsumowanie

Uzyskane w badaniach doświadczalnych wartości sił osiowych, które powodują ugięcie płyty o 10 mm wynosiły odpowiednio: 888 N przy założeniu podpór stałych, natomiast 442 N przy założeniu jednej podpory ruchomej. Odnosząc otrzymane wartości do wyników uzyskanych w badaniach sztywności klatki piersiowej u dzieci [9], gdzie maksymalne przemieszczenie osiowe, które nie powodowało dolegliwości bólowych osiągnięto przy obciążeniu 100 N i wynosiło od 10 do 20 mm można stwierdzić, że zarówno w jednym, jak i drugim przypadku płyta charakteryzuje się większą sztywnością, niż klatka piersiowa. Może to stanowić przedmiot dalszych badań dążących do zminimalizowania sztywności stabilizatora poprzez optymalizację jej geometrii – szerokości i grubości. Stwierdzono również, że sposób mocowania poprzeczek drutami chirurgicznymi, zapewnia odpowiednią stabilizację układu. Podczas obciążania w pierwszym etapie następowało kasowanie luzów pomiędzy poprzeczką mocowaną drutami chirurgicznymi, a żebrami. Druty te nie uległy uszkodzeniu, jak również nie zaobserwowano obluźnienia mocowania.

Ponad to stwierdzono, że zaproponowane nowatorskie mocowanie płyty do poprzeczek uniemożliwiało jej rotację podczas obciążania. Nie zaobserwowano uszkodzeń mechanicznych współpracujących ze sobą elementów, tj. gniazd płyty, poprzeczki i śrub blokujących co wskazuje na odpowiedni dobór cech geometrycznych i materiałowych tych elementów.

Podsumowując wyniki uzyskane w pracy można stwierdzić, że zaproponowany nowy sposób stabilizacji zapewnia prawidłową pracę płyty minimalizując niebezpieczeństwo jej rotacji co zdarzało się podczas standardowego mocowania płyty jedynie przy pomocy drutów. Natomiast w dalszych badaniach należy przeprowadzić analizy płyt o zmodyfikowanej geometrii zapewniającej mniejszą ich sztywność zbliżoną do sztywności klatki piersiowej.

## Podziękowania

*Prezentowana praca była finansowana z projektu badawczego nr 4159/B/T02/2010/38 na lata 2010-2012.*

indicates an appropriate choice of geometrical and material features of these elements.

Summarizing the results obtained in the paper it can be stated that the suggested new way of stabilizing ensures a proper work of the plate, minimizing the risk of its rotation, which took place during standard fitting of the plate by means of wires only. However, in further research analysis of plates with modified geometry providing their less stiffness related to the stiffness of the chest should be conducted.

## Acknowledgements

*Presented work was financed from the scientific funds No 4159/B/T02/2010/38 in the years 2010-2012 as a research project.*

## Piśmiennictwo

- [1] Dzielicki J., Korlacki W., Sitkiewicz T.: Małoinwazyjna metoda Nussa w leczeniu lejkowatej klatki piersiowej, *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 2000, 72, 6, ss. 524-530.
- [2] Kravarusic D., Dicken B.J., Dewar R., Harder J., Poncet P., Schneider M., Sigalet D.L.: The Calgary protocol for bracing of pectus carinatum: a preliminary report. *J.Pediatr.Surg.* 2006;41(5):923-926.
- [3] Lee S.Y., Lee S.J., Jeon C.W., Lee C.L., Lee K.R.: Effect of the compressive brace in pectus carinatum. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 2008;34:146-149.
- [4] Bohosiewicz J., Kudela G., Koszutski T.: Results of Nuss procedures for the correction of pectus excavatum, *European Journal of Pediatric Surgery* 2005, Vol.15, No.1, pp. 6-10.
- [5] Rzechonek A., J. Kołodziej: Leczenie lejkowatej klatki piersiowej sposobem Nussa – porównanie z metodą Ravitcha *Family Medicine Primary Care Review* 2005, 7, 2: 144-148.

## References

- [6] Krauze A., Kajzer W., Dzielicki J., Marciniak J.: Influence of mechanical damage on corrosion resistance of plates used in funnel chest treatment. *Journal of Medical Informatics & Technologies*, vol. 10, December 2006, pp. 133-141.
- [7] Krauze A., Marciniak J.: Numerical analysis of plates used in funnel chest treatment. October 11th – 14th 2007, Rytro, *Inżynieria Biomateriałów (Engineering of biomaterials)*, nr 67-68, vol X, December 2007, pp. 32-34.
- [8] Krauze A., Kajzer W., Walke W., Dzielicki J.: Physicochemical properties of fixation plates used in pectus excavatum treatment. *Int. J. Computational Materials Science and Surface Engineering*, Vol. 1, No. 3, 2007, pp. 351-365.
- [9] J. Dzielicki, W. Wolański, B. Gzik-Zroska, A. Kajzer, W. Kajzer: Pomiar sztywności klatki piersiowej u dzieci w wieku szkolnym. *Majówka Młodych Biomechaników 2011 19-22.05.2011 Wisła. Materiały Konferencyjne.*

## OCENA BIOMECHANICZNA NOWEJ GENERACJI STABILIZATORÓW DO LECZENIA ZNIEKSZTAŁCEŃ PRZEDNIEJ ŚCIANY KLATKI PIERSIOWEJ

W. KAJZER<sup>1\*</sup>, A. KAJZER<sup>1</sup>, J. MARCINIAK<sup>1</sup>, J. DZIELICKI<sup>2</sup>,  
I. JANICKA<sup>2</sup>, W. WOLAŃSKI<sup>3</sup>, B. GZIK-ZROSKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA ŚLĄSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY,  
INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, GLIWICE

<sup>2</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KLINIKA CHIRURGII WAD ROZWOJOWYCH DZIECI I TRAUMATOLOGII,  
KATOWICE

<sup>3</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KLINIKA CHIRURGII KLATKI PIERSIOWEJ, KATOWICE

<sup>4</sup> POLITECHNIKA ŚLĄSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY,  
KATEDRA MECHANIKI STOSOWANEJ, GLIWICE

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

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 54-57]

### Wprowadzenie

Zniekształcenia klatki piersiowej stanowią od lat istotny problem leczniczy i w praktyce dotyczą one dwóch wad rozwojowych, tj. lejkowatej klatki piersiowej oraz kurzej klatki piersiowej. Przez wiele lat leczenie tych wad łączyło się z rozległymi zabiegami operacyjnymi obejmującymi resekcje wielu żeber [1]. Obecnie jednak dominującą jest małoinwazyjna metoda Nussa polegająca na wprowadzeniu pod żebra przy pomocy laparoskopu odpowiednio przygotowanej płyty korygującej zniekształconą chorobowo klatkę piersiową [2-7].

Stosowane powszechnie w biomechanice komputerowe metody obliczeniowe przyczyniają się do szybszego opracowywania i wdrażania do praktyki klinicznej nowych, udoskonalonych implantów poprawiających jakość leczenia i komfort pacjenta podczas ich użytkowania. Na podstawie modeli fizycznych oraz matematycznych buduje się układy biomechaniczne, a metoda elementów skończonych pozwala determinować stan naprężeń i przemieszczeń w warunkach zbliżonych do rzeczywistych. Uzyskane wyniki dają podstawę do optymalizacji cech konstrukcyjnych poszczególnych elementów układu stabilizującego oraz doboru odpowiednich własności mechanicznych biomateriału, jak również pozwalają symulować różne warianty aplikacyjne dla różnych zniekształceń klatki piersiowej oraz cech antropometrycznych [8-10].

### Metodyka

W pracy analizowano płyty przeznaczone do rekonstrukcji zniekształceń klatki piersiowej. Przeprowadzona analiza obejmowała wyznaczenie stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń zredukowanych oraz reakcji w podporach występujących w układzie płyta-poprzeczeki-wkręty blokujące. W badaniach wykorzystano modele geometryczne płyty, poprzeczek i wkrętów blokujących sporządzone na podstawie dokumentacji technicznej. Analizowane płyty charakteryzowały się długością 340 mm, szerokością 11 mm i grubością 2,5 mm. Do takiej płyty zostały dobrane odpowiednie poprzeczeki i wkręty blokujące - RYS. 1. Dla potrzeb analizy przyjęto własności materiałowe implantu odpowiadające stali Cr-Ni-Mo o module Younga

## BIOMECHANICAL EVALUATION OF NEW GENERATION PLATE STABILIZERS USED IN TREATMENT OF ANTERIOR SURFACE DEFORMITY OF CHEST

W. KAJZER<sup>1\*</sup>, A. KAJZER<sup>1</sup>, J. MARCINIAK<sup>1</sup>, J. DZIELICKI<sup>2</sup>,  
I. JANICKA<sup>3</sup>, W. WOLAŃSKI<sup>4</sup>, B. GZIK-ZROSKA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
GLIWICE

<sup>2</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>3</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>4</sup> SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF APPLIED MECHANICS, GLIWICE

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

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 54-57]

### Introduction

Deformations of chest have been a significant treatment problem since years and in practice they concern two main malformations - pectusexcavatum and pectuscarinatum. Through many years treating those malformations was connected with extensive surgical procedures including costectomy of many ribs [1]. However, currently it is more common to use minimally invasive Nuss's method based on implanting under a rib with the use of laparoscope appropriately prepared plate to fixing deformed chest [2-7].

Commonly used in biomechanics computer calculating methods have contributed to a faster development and introduction into clinical practice new, better implants improving the quality of the treatment and patient's comfort while using them. On the basis of physical and mathematical models biomechanical systems are built and the finite elements method enables to determine the state of stresses and displacements in the conditions similar to natural. Obtained results provide the basis for optimizing constructional features of separate elements of the stabilizing system and for the selection of the appropriate mechanical features of the biomaterial as well as enable to simulate different variants of application for different deformations of chest and anthropometric features [8-10].

### Methods

In the paper fixing plates designed for chest deformation reconstruction were analyzed. Conducted analysis included calculating the state of displacements, deformations, stresses and reaction in supports present in the plate-bars-locking screws system. In the research geometrical models of the plate, bars and locking screws constructed on the basis of technical documentation were used. The analysis was carried out on the plate of 340 mm length, 11 mm width and 2,5 mm thickness. For such a plate appropriate bars and locking screws were selected-FIG.1. A stainless steel was assumed in order to carry out the analysis. The following material properties corresponding with Cr-Ni-Mo steel were set: Young modulus  $E=1,93 \cdot 10^5$  MPa, Poisson's ratio  $\nu=0,31$ , yield strength  $R_{p0,2}=690$  MPa and tensile strength  $R_m=1200$  MPa.

On the basis of geometrical models a mesh of finite elements was generated. For discretization of the model finite



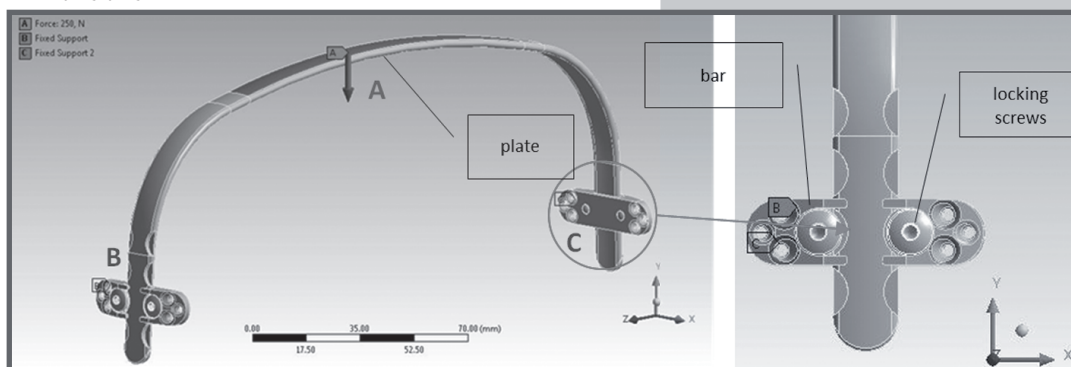
$E=1,93 \cdot 10^5 \text{ MPa}$ , liczbie Poissona'a  $\nu=0,31$ , umownej granicy plastyczności  $R_{p0,2}=690 \text{ MPa}$  i wytrzymałość na rozciąganie  $R_m=1200 \text{ MPa}$ .

Na bazie modeli geometrycznych wygenerowano siatkę elementów skończonych. Do dyskretyzacji modelu wykorzystano element skończony typu SOLID187, stosowany w analizie brył przestrzennych.

## Warunki brzegowe

W trakcie badań wyznaczano stan przemieszczeń, odkształceń oraz naprężeń w elementach układu oraz reakcje w podporach. Dla przeprowadzenia obliczeń niezbędne było określenie i nadanie warunków początkowych i brzegowych, które z odpowiednią dokładnością odwzorowywały zjawiska zachodzące w układzie rzeczywistym. Dla potrzeb analizy przyjęto następujące założenia:

- w miejscu występowania poprzeczki (punkty B i C) zostały odebrane węzłom leżącym na płaszczyźnie wszystkie stopnie swobody, co uniemożliwiało przemieszczanie się płyt i symulowało sposób przytwierdzenia poprzeczek do żeber – RYS.1.
- pomiędzy płytami, poprzeczkami i śrubami blokującymi założono kontakty, umożliwiające analizę wzajemnego oddziaływania tych elementów. W odniesieniu do obiektu rzeczywistego pominięto wszystkie luzy występujące w układzie,
- obliczenia przeprowadzono w 5-ciu krokach dla siły obciążającej  $F$  (punkt A) od 250N do 1200 N co 250 N.



**RYS. 1.** Model geometryczny układu i schematyczna prezentacja warunków brzegowych zastosowanych w analizie numerycznej: punkt A – siła obciążająca  $F$ , punkty B i C – miejsce przyłożenia podpór stałych.

**FIG. 1.** Geometrical model of the system and schematic presentation of the boundary conditions used in numerical analysis: point A – loading force  $F$ , points B and C – the point of attaching fixed support.

Naprężenia i odkształcenia uzyskane w wyniku analiz były wartościami zredukowanymi według hipotezy Hubera-Misesa-Henckiego.

## Wyniki

Uzyskane wartości przemieszczeń, odkształceń i naprężeń zredukowanych oraz wartości reakcji i momentów w podporach zestawiono w TABELI 1 i przedstawiono na RYSUNKACH 2 i 3.

Analiza uzyskanych wyników wykazała, iż maksymalne obciążenie, które dla stali Cr-Ni-Mo nie powoduje przekroczenia założonej wartości umownej granicy plastyczności  $R_{p0,2}=690 \text{ MPa}$  wynosi 300 N. Odpowiadające temu obciążeniu przemieszczenie zredukowane wynosi 2 mm, wartość reakcji w podporach  $R = 250 \text{ N}$  oraz moment reakcji  $M=4250 \text{ N}\cdot\text{mm}$  - RYS.2 a i b.

element SOLID187 used for special analysis of solids was applied.

## Boundary conditions

In the course of the work the state of displacements, deformations, stresses in elements of the system and reactions in supports were obtained. In order to carry out the calculations appropriate initial and boundary conditions reflecting phenomena in real system were determined. The following assumptions were set:

- in the place of bar presence (points B and C), all degrees of freedom of nodes lying on the plane were taken, which prevented the plates from displacements and simulated the way of attaching the bars to the ribs – FIG. 1.
- between the plates, bars and locking screws the contacts were set, which enabled to analyze mutual interaction of those elements. With the reference to the real object all the clearances present in the system were omitted.
- the calculations were conducted in 5 steps for loading force (point A) from 250N to 1200N every 250N.

The obtained displacements, strains and stresses are the reduced values according to the Huber-Mises-Henck hypothesis.

## Results

The obtained results of displacements, deformation and stresses and values of reaction and moments in supports are presented in TABLE 1 and FIGs. 2 and 3.

The analysis of the obtained results showed that the maximum loading force, which for Cr-Ni-Mo stainless steel do not cause exceeding the value of the assumed tensile strength  $R_{p0,2}=690 \text{ MPa}$  is equal to 300 N. Appropriate to that force reduced displacement equals to 2 mm, the value of reactions in supports equals to  $R=250 \text{ N}$  and reaction moment equals to  $M=4250 \text{ N}\cdot\text{mm}$  - FIG.2 a and b.

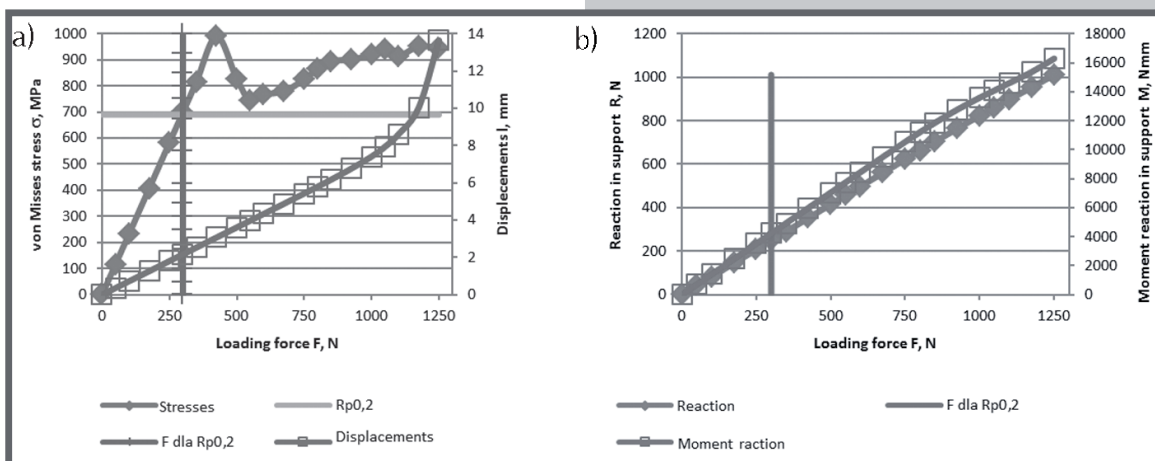
The areas particularly exposed to damages were located in the point of applying the force and especially in the point of fixing locking screws and bars to the plate-FIG.3 a, b and c. Obtained values of reactions and moments in the point of fixing bars to the ribs show as well that there is a possibility of damaging a bone structure by applying bigger forces to the plate.

## Conclusions

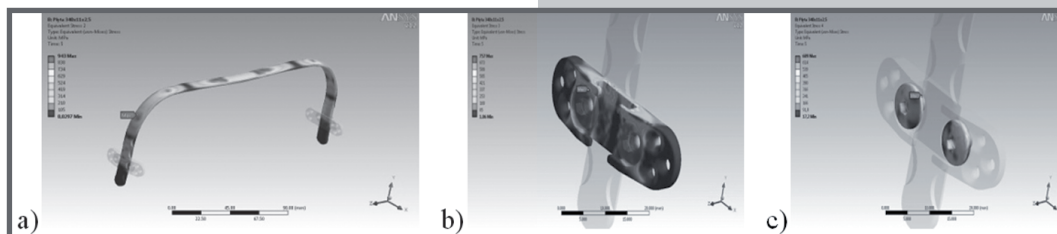
Previous researches of the stiffness of chest at children at the school age conducted by the authors of the paper showed that the maximum bend of chest which does not cause any pain problems varies from 10mm up to 20mm whereas forces causing such bend were equal to 100N [11]. However, in the paper, loading force up to 1250N was simulated to the system. Such force was also used in the next stage of the research during experiments conducted on

TABELA 1. Wyniki analizy numerycznej układu płyta-poprzeczki-wkręty blokujące.  
TABLE 1. The results of the numerical analysis of the system plate-bars-locking screws.

Krok obliczeń Step	Siła obciążająca Loading force F	Przemieszczenia zredukowane Displacements l	Odształcenia zredukowane von Misses strains $\varepsilon$	Naprężenia zredukowane von Misses stresses $\sigma$	Reakcja w podporach Reaction in suport R	Moment reakcji w podporach Moment reaction in supports M
	N	mm	mm/mm	MPa	N	N*mm
1	250	1,700	0,002	461,110	208,070	3452,400
2	500	3,401	0,004	746,500	416,130	6902,700
3	750	5,105	0,004	795,040	624,020	10343,000
4	1000	7,030	0,005	891,390	827,660	13556,000
5	1250	11,323	0,005	953,450	1026,800	16711,000



RYS. 2. Wykresy: a) naprężenie i przemieszczenie zredukowane w funkcji siły obciążającej, b) reakcje i momenty w podporach w funkcji siły obciążającej.  
FIG. 2. Graphical representation of obtained results: a) reduced stresses and displacement in the function of loading force, b) reactions and moments in support in the function of loading force.



RYS. 3. Przykładowy rozkład naprężeń zredukowanych w elementach układu płyta-poprzeczki-wkręty blokujące dla obciążenia siłą  $F=1250$  N: a) płyta, b) poprzeczki, c) wkręty blokujące.  
FIG. 3. Sample scheme of von Misses stresses in the elements of the system plates-bars-locking screws for loading force  $F=1250$  N: a) plate, b) bars, c) locking screw.

Obszary szczególnie narażone na uszkodzenia były zlokalizowane w miejscu przyłożenia siły oraz w szczególności w miejscu mocowania wkrętami blokującymi poprzeczek do płyt - RYS. 3 a, b i c. Również uzyskane wartości reakcji i momentów w miejscach przytwierdzenia poprzeczek do żeber wskazują na możliwość uszkodzenia struktury kostnej przy dużych siłach działających na płytę.

### Podsumowanie

Przeprowadzone przez Autorów wcześniejsze badania sztywności klatki piersiowej u dzieci w wieku szkolnym wykazały, iż maksymalne ugięcie klatki piersiowej nie powodujące dolegliwości bólowych waha się w przedziale od 10 mm do 20mm natomiast siły powodujące takie ugięcie wyniosły

the real object. Simultaneously the analysis of the obtained results showed that loading force up to 250N did not cause permanent deformation of the elements of the system indicating at the same time its big stiffness which resulted from insignificant values of displacement of the plate equal to 1,7mm in comparison to the obtained results in the research of the stiffness of chest at children.

In conclusion, it has to be stated that the obtained results of the numerical analysis were significantly influenced by assumed boundary conditions. In the real object particular interacting elements are joined with one another in the way which ensures appropriate clearances and the whole construction is prone to deformation. In the numerical model no clearances were assumed and all the elements were joined with one another stiffly with possible contact. That caused

do 100 N [11]. W pracy natomiast zasymulowano obciążenia układu siłą do wartości 1250 N. Siłę taką zastosowano również w kolejnym etapie badań podczas doświadczeń na obiekcie rzeczywistym. Przyjęcie takiej siły maksymalnej miało na celu wskazanie miejsc narażonych na trwałe uszkodzenia oraz na możliwość destabilizacji układu. Jednocześnie analiza uzyskanych wyników wykazała, że obciążenie siłą do 250 N nie spowodowało trwałego odkształcenia elementów układu jednocześnie wskazując na dużą jego sztywność, która wynikała z niewielkiej wartości przemieszczenia płyty równej 1,7 mm w porównaniu do uzyskanych wartości w badaniach sztywności klatki piersiowej u dzieci.

Podsumowując należy stwierdzić, iż na uzyskane wyniki analizy numerycznej duży wpływ miały założone warunki brzegowe. W obiekcie rzeczywistym poszczególne elementy współpracujące łączone są ze sobą w sposób zapewniający odpowiednie luzy, a cała konstrukcja jest podatna na odkształcenia. W modelu numerycznym nie założono luzów, a wszystkie elementy były połączone ze sobą sztywno z ewentualnym kontaktem. Spowodowało to zawyżenie uzyskanych wartości naprężeń, odkształceń i sił reakcji w podporach z jednoczesnym ograniczeniem możliwości przemieszczania się płyty. Ponad to mocowanie płyty do żeber w warunkach klinicznych jest elastyczne, wykonane za pomocą drutu chirurgicznego zapewniającego możliwość uzyskania odpowiedniego połączenia z kością. Mocowanie takie ogranicza możliwość uszkodzenia struktur kostnych czego w modelu numerycznym nie uwzględniono.

Wstępna analiza numeryczna stanowi punkt wyjścia zarówno do optymalizacji cech konstrukcyjnych płyt w celu zmniejszenia jej sztywności, jak również do pełnej analizy biomechanicznej uwzględniającej układ kostny z warunkami brzegowymi adekwatnymi do obiektu rzeczywistego.

## Podziękowania

*Prezentowana praca była finansowana z projektu badawczego nr 4159/B/T02/2010/38 na lata 2010-2012.*

inflation of the values of stresses, deformations and the reaction forces in supports limiting at the same time possibility of displacement of the plate. Moreover, fixing the plate to the rib in clinical conditions is flexible, made of surgical wire enabling possibility of obtaining the appropriate connection with a bone. Such fixing limits the possibility of damaging bone structures, which was not taken into consideration in numerical model.

The preliminary numerical analysis is a starting point both for optimizing constructional features of the plates aiming at decreasing its stiffness and for full biomechanical analysis considering skeleton with boundary conditions adequate to the real object.

## Acknowledgements

*Presented work was financed from the scientific funds No 4159/B/T02/2010/38 in the years 2010-2012 as a research project.*

## Piśmiennictwo

- [1] A. Rzechonek, M. Mraz, K. Kołodziej, G. Kacprzak: Chirurgiczne leczenie deformacji klatki piersiowej- sposoby postępowania. Pol. Med. Rodz. 2004, 6, 949-958.
- [2] D. Nuss, R.E. Kelly, P. Croitoru, M.E. Katz: A 10-year of minimally invasive technique for the correction of pectusexcavatum. Journal of Pediatric Surgery, 1998, 33(4), 545-552.
- [3] J. Dzielicki, W. Korlacki, T. Sitkiewicz: Małoinwazyjna metoda Nussa w leczeniu lejkowatej klatki piersiowej, Polski Przegląd Chirurgiczny, 2000, 72, 6, 524-530.
- [4] J. Dzielicki, W. Korlacki, I. Janicka, E. Dzielicka. : Difficulties and limitations in minimally invasive repair of pectusexcavatum – 6 years experiences with Nuss technique. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2006;30: 801-804.
- [5] J. Dzielicki, W. Korlacki: Możliwości leczenia zniekształcenia lejkowatych klatek piersiowych techniką małoinwazyjną. Lekarz, 1999;6, 40-41.
- [6] J. Dzielicki, M. Ostański, I. Janicka: Cardiovascular anomalies in children with chest wall deformities. Surg. Childh. Intern., 1997;V: 27-28.

## References

- [7] J. Dzielicki, W. Korlacki, I. Janicka, E. Dzielicka: Małoinwazyjna operacja lejkowatej klatki piersiowej wg Nussa - analiza 321 przypadków. Kardiologia i Torakochirurgia Polska, 2004, 1(supl. 1):51.
- [8] W. Kajzer, A. Kajzer, J. Szewczenko, J. Marciniak. FEM Analysis of Locked Intramedullary Nails Used For Femur Fractures Treatment. Engineering of Biomaterials, Number 96-98, Volume XIII, December 2010, pp. 54-57.
- [9] W. Kajzer, A. Kajzer, J. Marciniak: FEM analysis of expandable intramedullary nails in health and osteoporotic femur. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering, JAMME, vol. 37/2 December 2009.
- [10] W. Kajzer, A. Krauze, M. Kaczmarek, J. Marciniak: 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.
- [11] J. Dzielicki, W. Wolański, B. Gzik-Zroska, A. Kajzer, W. Kajzer: Pomiar sztywności klatki piersiowej u dzieci w wieku szkolnym. Majówka Młodych Biomechaników 2011 19-22.05.2011 Wisła. Materiały Konferencyjne.

## MODYFIKACJA POWIERZCHNI STOPÓW NiTi AZOTKOWYMI LUB TLENKOWO-AZOTKOWYMI WARSTWAMI WIERZCHNIAMI ZDOLNYMI DO ODKSZTAŁCEŃ

J. LELAŃKO<sup>1</sup>, M. FREITAG<sup>1</sup>, B. ŁOSIEWICZ<sup>1</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, T. GORYCZKA<sup>1</sup>

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

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

\*E-MAIL: JOZEF.LELATKO@US.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 58-61*]

### Wstęp

Stopy NiTi o składzie chemicznym zbliżonym do równoatomowego wykazują efekt pamięci kształtu i efekt nadsprężystości. Jako stopy o dużej zawartości tytanu cechują się dobrą biokompatybilnością [1]. Dlatego są one bardzo dobrym biomateriałem stosowanym w stomatologii, ortopedii, chirurgii naczyniowej i tkanek miękkich [2]. Aplikacje te, szczególnie w przypadku stosowania implantów długoterminowych, wymagają szczególnej uwagi ze względu na przenikanie jonów niklu do otaczających je tkanek. Wiadomym jest, że nikiel, gdy nie jest zatrzymany w stopie może wywoływać alergię i toksyczny efekt komórek, gdy jego ilość osiągnie dopuszczalne stężenie [3]. Sposobem na podniesienie odporności korozyjnej stopów NiTi i zapobieżenie przenikania jonów niklu jest modyfikacja ich powierzchni. Wytworzenie na powierzchni warstwy tlenków i azotków tytanu jest wystarczającym sposobem zabezpieczenia ludzkiego ciała [3,5]. Jednakże, warstwy o większej grubości wytwarzane są przy wyższych temperaturach. Wytworzone w tych warunkach warstwy cechują się mikrokryształiczną strukturą, a pomiędzy warstwą a podłożem z NiTi tworzy się warstwa złożona z równowagowej fazy międzymetalicznej ( $Ti_2Ni$  lub  $Ti_3Ni$ ) [4,6]. Takie warstwy nie posiadają odpowiednich właściwości niezbędnych podczas indukowania efektu pamięci kształtu i efektu nadsprężystości. Dlatego, zalecane jest wytwarzanie tych warstw w temperaturze poniżej 300°C. Wytworzone wówczas warstwy posiadają nanokryształiczną lub częściowo amorficzną strukturę i ograniczoną podwarstwą fazy międzymetalicznej [7].

W pracy badano azotowane i tlenoazotowane warstwy wierzchnie, wytworzone techniką jarzeniową w temperaturze 300°C na stopie NiTi.

### Materiał i metodyka badań

Azotkowe i tlenkowo-azotkowe warstwy wierzchnie nanoszono na stop NiTi o składzie chemicznym zbliżonym do równoatomowego: 50,6 at.% Ni. Stop o takim składzie chemicznym i po przesyleniu z temperatury 800°C w wodzie z lodem posiada temperaturę  $A_f$  równą -1,7°C. Oznacza to, że w temperaturze otoczenia posiada strukturę fazy B2 i nadsprężyste właściwości. Próbki do badań, o kształcie prostokątnym i wymiarach 14 mm x 12 mm x 0,8 mm były wstępnie polerowane mechanicznie na papierach do gradacji 1200, a następnie przy użyciu zawiesziny diamentowej o gradacji 1  $\mu m$ . Końcowe polerowanie przeprowadzono w zawieszynie tlenku krzemu - 0,1  $\mu m$ . Warstwy nanoszono

## MODIFICATION OF NiTi ALLOY SURFACE BY ELASTIC NITRIDE AND OXIDE LAYERS FORMATION

J. LELAŃKO<sup>1</sup>, M. FREITAG<sup>1</sup>, B. ŁOSIEWICZ<sup>1</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, T. GORYCZKA<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS POLAND

\*E-MAIL: JOZEF.LELATKO@US.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 58-61*]

### Introduction

NiTi alloys with near equiatomic chemical composition reveals unique features such as shape memory and superelasticity effects. Similar to the alloys with a high amount of titanium they possess good biocompatibility [1]. Therefore the NiTi alloys are an excellent biomaterial for dental, vascular, orthopedics and organ surgeries applications [2]. 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 chemically free, can cause allergies and taken a toxic effect on the cell if its concentration exceeds a certain level [3]. The way to improve the corrosion resistance of the NiTi alloy and suppress the release of nickel ions is modification of its surface. Titanium oxide and titanium nitride has been found as a good material for the layers, which sufficiently protect human body against nickel release [4, 5]. However, technology for the layers deposition requires application of elevated temperature. In these conditions the received layers reveal microcrystalline structure. Moreover, between this layer and the NiTi matrix intermediate layer, which is formed from intermetallic phase ( $Ti_2Ni$  or  $Ti_3Ni$ ) is created [4,6]. Both equilibrium phases do not possess the properties which are needed for induction of shape memory or superelasticity effect. Therefore the temperature lowers than 300°C is recommended for the creation of layers with nanocrystalline or partially amorphous structure and limited amount of sublayer of intermetallic phase [7].

In the present work the nitride and nitride-oxide layers, deposited at temperature of 300°C on NiTi, using the glow discharge technique, were investigated.

### Experimental procedure

The nitride and nitride-oxide layers were deposited on commercial NiTi alloy with nominal chemical composition: 50.6 at.% Ni. Such chemical composition of the alloy with a combination of quenching from 800°C to the iced water ensures that the  $A_f$  temperature equals to -1,7°C which means that alloy reveals the B2 structure at room temperature and possesses superelastic properties. Rectangular samples of the alloy with dimension of 14 mm x 12 mm x 0.8 mm were mechanically polished successively with SiC abrasive papers down to 1200 grit. Next, diamond suspensions up to 1  $\mu m$  were used. Final treatment was done using 0.1  $\mu m$  colloidal silica suspension. The layers were formed using glow discharge technique at temperature of 300°C and deposition time 0,5h.

The structure, thickness, surface roughness, interface roughness and density of obtained layers were examined

techniką jarzeniową w temperaturze 300°C w czasie 0,5h.

Badania struktury, grubości, gęstości i chropowatości zarówno powierzchni warstwy jak i podłoża przeprowadzono metodą rentgenograficzną z użyciem dyfraktometru X'Pert Pro firmy Philips. Strukturę warstw w skali nano badano używając transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 3010. Badania były prowadzone na poprzecznych przekrojach warstw. Próbkę do badań wykonywano metodą jonowego polerowania.

Właściwości korozyjne wytworzonych warstw badano w roztworze Tyrod'a używając metody potencjodynamicznej.

## Wyniki badań

Strukturę warstw azotowanych i tlenoazotowanych wytworzonych w temperaturze 300°C na stopie NiTi badano metodą reflektometrii rentgenowskiej. Stwierdzono, że podczas procesu azotowania tworzy się cienka warstwa azotku tytanu. Wprowadzenie w drugim etapie procesu tlenu powoduje wytworzenie się na warstwie azotku dodatkowej cienkiej warstwy tlenku tytanu (RYS. 1). Porównując dyfraktogramy, można na nich zauważyć poszerzenie refleksów należących do azotku tytanu otrzymanego w procesie azotowania. Oznacza to, że struktura warstwy azotowanej cechuje się mniejszą wielkością ziaren niż warstwy tlenoazotowanej.

Obserwacje mikroskopowe pozwoliły na scharakteryzowanie struktury warstw w nanoskali wzdłuż przekroju poprzecznego. Przy tych powiększeniach powierzchnia warstwy, cechuje się dużą gładkością (RYS. 2), natomiast powierzchnia podłoża ze stopu NiTi wykazywała zwiększoną chropowatość (RYS. 2a). Na obrazach mikroskopowych obserwowano kontrast świadczący o niejednorodności struktury warstw. W pobliżu górnego jak i dolnego obszaru warstwy są obserwowane pola o jaśniejszym kontraście. Oznacza to, że miejsca te posiadają mniejszą gęstość lub bardziej amorficzną strukturę. Miejsca ciemniejsze pochodzą od nanoziaren. Niektóre z ziaren w warstwie tlenkowo-azotkowej posiadają kolumnowy kształt (RYS. 2b). Pod wytworzonymi warstwami obserwowano strukturę silnie zdeformowanej fazy B2 (RYS. 2a).

Obserwacje mikroskopowe przy wysokiej rozdzielczości pokazały nanokrystaliczny charakter struktury warstw (RYS. 3). Struktura warstwy azotowanej posiadała dużą ilość fazy amorficznej (RYS. 3a). W strukturze warstwy tleno-azotowanej znajdowała się mniejsza ilość tej fazy, a warstwa cechowała się większym stopniem krystaliczno-

applying X-ray diffraction using X'Pert Pro diffractometer. The nanostructure of the layers was investigated using transmission electron microscopy JEM 3010. The microscopic observations were carried out on the cross sectioned specimens. The ion polishing method was applied for preparing of these specimens. The corrosion resistance was tested in the physiological Tyrod's solution using the potentiodynamic method.

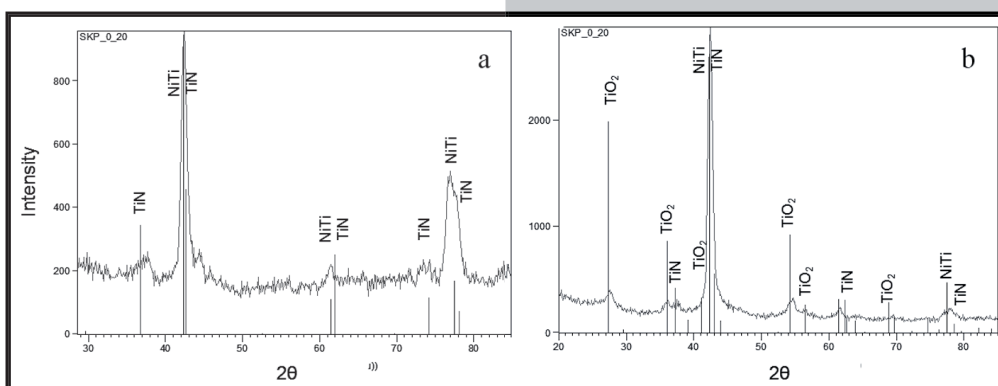
## Results and discussion

Structure of the layers, which were formed during nitriding and nitriding/oxidizing processes at 300°C, was determined from GIXD measurements. It has been found that during the nitriding process the thin layer of TiN was created. Adding, in the second period of process, oxygen created the thin layer of titanium oxide on the nitride (FIG. 1). It can be seen, from the comparison of both diffraction patterns, that nitrided sample reveals broaden diffraction line than oxidized. It means that the nitride layer shows lower crystalline structure.

The microscopic observations show the structure of the cross section of the layers in nanoscale. At these magnifications the layers reveals their high smoothness of the top surface (FIG. 2) and a significant roughness of the NiTi matrix (FIG. 2a). Inside the layers there exists the contrast, which proves an inhomogeneity of the structure. Near the top and bottom part of the layers the areas of brightness contrast can be seen. It means that these areas characterise the lower density or are more amorphous. Also, the darker areas are visible in the place of nanograins. Some of grains in nitride-oxide layer were columnar shape (FIG.2b). Under the layers strongly deformed regions of B2 matrix phase were observed (FIG.2a).

The high resolution TEM investigations revealed the nanocrystalline state of the layers (FIG.3). The nitride layer was characterized with high amount of amorphous phase (FIG.3a). The nitride/oxide layer posses smaller amount of this phase. However, higher step of crystallinity was noticed (FIG.3b). In both cases the nanograins of nitride and oxide phases were strongly deformed.

More information of the investigated layers, from larger areas, was obtained from the X-ray reflectivity measurement. Obtained values are presented in TABLE 1. Average thickness of the layers, which were formed from the TiN and TiN+TiO<sub>2</sub> phases at temperature of 300°C, varied between 47 and 57 nm. It is worth to notice that relatively low value of the surface roughness 4-5 nm was obtained in the op-



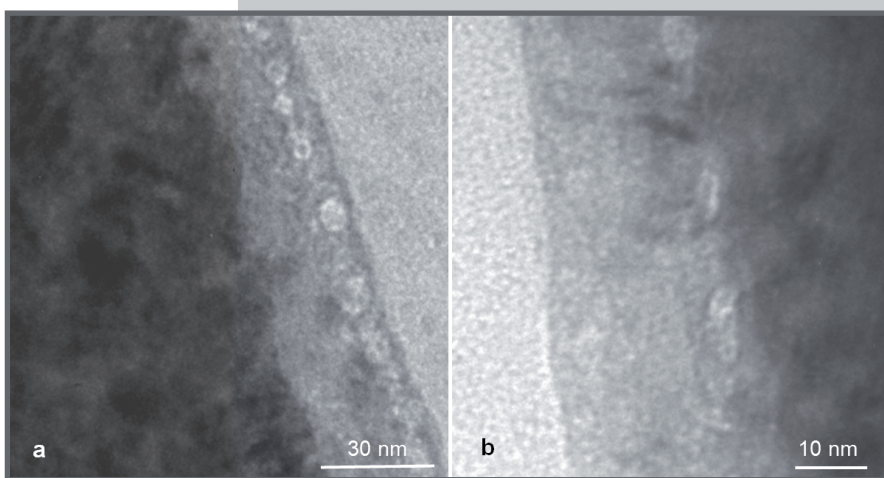
RYS. 1. Dyfraktogramy zmierzone przy stałym kącie padania wiązki pierwotnej: 0.2° z warstwą otrzymaną w wyniku azotowania (a) i tlenoazotowania (b) w temperaturze 300°C.

FIG. 1. X-ray diffraction patterns obtained at constant angle 0.2 degrees of alloy nitrided (a) and nitride/oxidized (b) at 300°C.

ści (RYS. 3b). W obydwu przypadkach ziarna azotku lub tlenku tytanu były silnie zdefektowane.

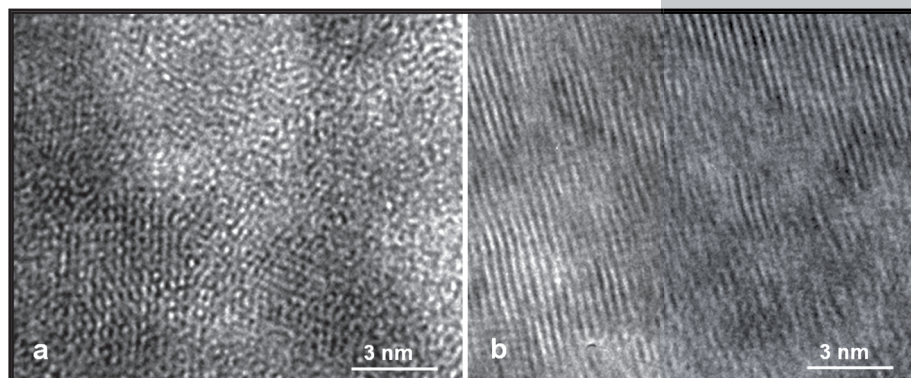
Więcej informacji dotyczących badanych warstw, z większych obszarów, uzyskano z pomiarów reflektometrycznych. Otrzymane wyniki zestawiono w TABELI 1. Średnia grubość warstw z TiN lub TiN+TiO<sub>2</sub> utworzonych w temperaturze 300°C wynosiła 47-57 nm. Warto podkreślić duży stopień gładkości powierzchni warstw, w przeciwieństwie do dużej chropowatości podłoża z NiTi. Mniejsza gęstość podłoża w pobliżu warstwy wierzchniej świadczy o dużym jego zdefektowaniu. Wszystkie otrzymane parametry świadczą jednak o dobrej jakości utworzonych warstw.

Wyniki badań korozyjnych metodą potencjodynamiczną wykazują wysoką odporność korozyjną azotkowych i tlenkowo-azotkowych warstw utworzonych



RYS. 2. Obrazy struktury przekroju poprzecznego azotowej i tlenkowo-azotkowej warstwy wierzchniej naniesionej an stopie NiTi.

FIG. 2. The image of the structure of the nitride (a) and nitride-oxide (b) cross-section surface layers deposited on the NiTi alloy.



RYS. 3. Obrazy wysokorozdzielcze warstw azotkowych (a) i tlenkowo-azotkowych (b).

FIG. 3. High resolution images of nitride (a) and nitride-oxide (b) layers.

TABELA 1. Wyniki badania warstw uzyskane metodą stałego kąta padania wiązki rentgenowskiej i metodą reflektometrii.

TABLE 1. The results obtained from the X-ray grazing diffraction (GIXD) and the reflectivity (XRR) measurements.

Parameters of the proces Parametry procesu	Phase composition Skład fazowy	Thickness Grubość [nm]	Surface roughness Chropowatość powierzchni [nm]	Density Gęstość [g cm <sup>-3</sup> ]
Nitriding Azotowanie 300°C/30 min.	NiTi	-	16.9	5.69
	TiN	46.9	4.1	4.34
Nitriding-oxidizing Tlenoazotowanie 300°C/30 min	NiTi	-	21.5	5.62
	TiN	25.7	8.5	4.57
	TiO <sub>2</sub>	31.6	5.1	3.91

na stopie NiTi w temperaturze 300°C (TABELA 2). Uzyskane wartości są porównywalne z wynikami otrzymanymi dla znacznie grubszych warstw utworzonych w wyższych temperaturach [4,6,8] oraz są znacznie wyższe od wartości dla warstw tlenkowych utworzonych w procesie pasywacji [7].

posite to surface roughness of NiTi matrix. Lower density of the matrix close to the surface layer attests the high structural perturbations in this phase. All these parameters prove high quality of deposited layers.

The results obtained from corrosion measurement proved high corrosion resistance of the nitride and nitride/oxide layers obtained at 300°C (TABLE 2). These values are comparable with the thicker layers deposited at higher temperatures [4,6,8]. Moreover, they are much higher than obtained for the TiO<sub>2</sub> layers after passivation [7].

TABELA 2. Odporność korozyjna azotowanych i tleno-azotowanych stopów NiTi określona w roztworze Tyrod'a metodą potencjodynamiczną.

TABLE 2. The corrosion resistance of the nitride and nitride/oxidize NiTi alloy measured in the Tyro's solution using the cyclic potentiodynamic polarization method.

Parameters of the proces Parametry procesu	E <sub>corr.</sub> [mV]	E <sub>br</sub> [V]	j <sub>br.</sub> [mA cm <sup>-2</sup> ]
Nitriding / Azotowanie - 300°C/30 min	-246	2.42	15.06
Nitriding-oxidizing / Tlenoazotowanie - 300°C/30 min	-249	2.35	2.37

## Summary

The nitriding and nitriding/oxidizing glow discharge process carried out at temperature of 300°C allowed to obtain the thin (47±57 nm) surface layer, which consisted of titanium nitride or titanium nitride/oxide phases. Such modification significantly improves the corrosion resistance of the NiTi alloy. Decrease of the processing temperature down to 300°C and shortening time of the process to 0,5h caused that between deposited layer and NiTi matrix an

## Podsumowanie

Proces azotowania i tlenoazotowania jarzeniowego prowadzony w temperaturze 300°C powoduje wytworzenie na powierzchni stopu NiTi cienkich warstw (grubości 47 – 57 nm), które zbudowane są odpowiednio z azotków lub mieszaniny tlenków i azotków tytanu. Taka modyfikacja powierzchni znacznie poprawia odporność korozyjną stopów NiTi. Obniżenie temperatury procesu do 300°C i skrócenie czasu do 0,5h spowodowało brak warstwy pośredniej złożonej z równowagowej fazy międzymetalicznej. W tym obszarze obserwowano natomiast silnie zdeformowaną strukturę fazy macierzystej B2. Wytworzone warstwy, charakteryzujące się nanokrystaliczną strukturą z dużą ilością fazy amorficznej i pozbawione podwarstwy fazy międzymetalicznej, mogą być wykorzystane do modyfikacji implantów medycznych ze stopów NiTi wykorzystujących efekt pamięci kształtu i efekt nadprężystości.

## Podziękowanie

Praca była finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - projekt N N507 230540.

intermediate layer of intermetallic phase did not appear. However, in the cost of the optimized processing parameters strongly perturbation of the B2 matrix structure was noticed. The deposited surface layers consisted of nanocrystalline structure with high amount of amorphous phase without sublayer of intermetallic phase. These layers can be used for modification of NiTi implants revealing shape memory effect or superelasticity properties.

## Acknowledgement

*This work was financially supported by the Ministry of Science and High Education (project no. N N507 230540).*

## Piśmiennictwo

- [1] C.M. Wayman, J. Met., 6 (1980), p. 129.
- [2] H. Morawiec, Z. Lekston, Implanty medyczne z pamięcią kształtu, Wyd. Pol. Śl. 2010.
- [3] G.C. McKay, R. Mac Macnair, C. MacDonald, M.H. Grant, Biomaterials, 17 (1996) p. 1339.
- [4] D. Starosvetsky, I. Gotman, Surf. and Coat. Tech., 148 (2001), p. 268.
- [5] Y. Fu, X. Wu, Y. Wang, B. Li, S. Yang, App. Surf. Sci., 157 (2000), p. 167.

## References

- [6] J. Lelątko, P. Paczkowski, T. Wierzchoń, H. Morawiec, J. Microscopy 223 (2006), p. 234.
- [7] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Solid State Phenomena 163 (2010) p. 127.
- [8] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Inżynieria Materiałowa, 5 (171) (2009) p. 429.

## IMPLANTY NiTi Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU ZASTOSOWANE W BADANIACH KLINICZNYCH

Z. LEKSTON, T. GORYCZKA, H. MORAWIEC

UNIWERSYTET ŚLĄSKI, INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, KATOWICE

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 62-65*]

### Wstęp

Stopy NiTi wykazujące zjawiska pamięci kształtu ze względu na bardzo dobre właściwości mechaniczne, wysoką odporność korozyjną oraz biokompatybilność stanowią atrakcyjny biomateriał metalowy do produkcji wyrobów medycznych [1,2]. Unikalne właściwości funkcjonalne tych stopów związane są z jedno- i dwukierunkowym efektem pamięci kształtu występującym podczas odwracalnej przemiany martenzytycznej aktywowanej cieplnie oraz efektem supersprężystości indukowanym naprężeniami [3,4]. Od stopów mających znaleźć zastosowanie na implanty medyczne oczekuje się wystąpienia zjawisk pamięci kształtu w temperaturach poniżej temperatury ciała pacjenta [5]. Dlatego prowadzone są badania nad optymalizacją struktury i własności stopów NiTi pod kątem specyfiki zastosowania medycznego [6,7].

Liczne zastosowania certyfikowanych wyrobów medycznych NiTi znane są z literatury światowej. Przykładem takim mogą być łuki ortodontyczne, stenty, filtry Simona, przewodniki dla chirurgii małoinwazyjnej czy implanty Amplatzera [8-11]. Inne, np. klamry do zespożeń złamań kości, stabilizatory kręgosłupa stosowane podczas leczenia skoliozy u dzieci lub spinki do anastomozy tkanek miękkich są w dalszym ciągu poddawane badaniom klinicznym w celu uzyskania akceptacji do powszechnego zastosowania [12-14].

Ostatnio zastosowano implanty NiTi wykazujące zjawisko supersprężystości w badaniach klinicznych w kranioplastyce. Do tej pory w leczeniu kraniostenoz u dzieci używano stalowych sprężynek mocowanych na sklepieniu czaszki wspomagając w ten sposób korekcję kształtu czaszki w pożądanym kierunku. Funkcję tę z powodzeniem mogą pełnić dystraktory ze stopów NiTi działające podczas rozprężania stałą siłą w wymaganym zakresie odkształceń [15-18]. Innym przykładem badań klinicznych może być zastosowanie kompresyjnych spinek NiTi do zespożeń jelit [19,20].

W pracy przedstawiono przykłady zastosowań w badaniach klinicznych prototypowych implantów medycznych ze stopów NiTi opracowanych i wykonanych w Instytucie Nauki o Materiałach Uniwersytetu Śląskiego.

### Materiał i metody badań

Do badań zastosowano druty NiTi i TiNiCo z własnych wytopów wykonanych w indukcyjnych piecach próżniowych oraz druty firm Smatec i Euroflex o różnych średnicach od 1 do 2 mm. W celu uzyskania pożądaných własności półwyroby po przeróbce plastycznej na gorąco i na zimno oraz implanty były poddane odpowiednio dobranej obróbce mechanicznej, cieplnej i powierzchniowej. Odzysk kształtu implantów mierzono na skomputeryzowanym stanowisku pomiarowym wyposażonym w czujniki temperatury i przemieszczenia. Własności supersprężyste implantów badano na maszynie wytrzymałościowej Instron 4469 oraz podczas odkształcania na stanowisku pomiarowym wypo-

## NiTi SHAPE MEMORY IMPLANTS APPLIED IN CLINICAL STUDIES

Z. LEKSTON, T. GORYCZKA, H. MORAWIEC

UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
12 BANKOWA STR., 40-007 KATOWICE, POLAND

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 62-65*]

### Introduction

Due to the very good mechanical properties, high corrosion resistance and biocompatibility shape memory NiTi alloys become an attractive material for the manufacturing medical devices with unique functional properties [1,2]. The unique properties are connected to one- and two-way shape memory effect, which occurs during the reversible martensitic transformation (thermally activated) as well as the pseudoelastic phenomena induced by external stress [3,4]. It is expected from the shape memory alloys, which have to be applied for medical implants, that appearance of the shape memory phenomena at temperatures below the temperature of the patient's body [5]. For that reason studies have been carried out to optimize the structure and properties of the NiTi alloy for individual medical application [6,7].

Numerous application of certified medical NiTi implants are known from the literature data. For example they are: orthodontic arches, stents, Simon filters, guide-wires for minimally invasive surgery or Amplatz implants [8-11]. Other NiTi implants as staples for fixation of bone fractures, stabilization of the spine during treatment of scoliosis in children or clips to the soft tissue anastomosis are used in clinical trials conducted in accordance with applicable regulations [12-14].

Recently, the cranial reshaping springs for craniostenosis have been applied in clinical studies. In the treatment of children, with craniostenosis, a steel spring was fixed on the vault of the skull forcing its proper shape correction. This function can be overtake by NiTi distractors, which expand with constant force in the required range of deformations [15-18]. Also, NiTi wires were used as the compression clips for anastomoses [19,20].

In presented papers application of clinical studies of prototype medical implants were described. The implants were designed and made in the Institute of Materials Science in University of Silesia.

### Materials and experimental methods

For the studies TiNiCo and NiTi alloys were obtained by melting of elements in a vacuum induction furnace. From the ingots thin wires were drawn. Also, commercial wires (Euroflex and Smatec) were used. The diameter of applied wires varied from 1 to 2 mm. In order to received proper properties they were thermomechanically treated including surface modification.

Recovery of the shape of the implants was measured on a computerized test bench equipped with temperature sensors and movement. Superelastic properties of the implants were tested with use of the Instron 4469 testing machine as well as during deformation using the dynamometer equipped with strain gauge force transducer and transformer linear displacement sensor.

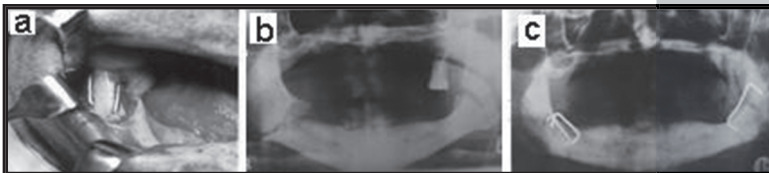


sażonym w tensometryczny przetwornik siły i transformatorowy czujnik przemieszczeń liniowych.

## Wyniki badań

### Zastosowanie klamer NiTi z pamięcią kształtu do zespalania złamań żuchwy u ludzi

Uwzględniając anatomiczną budowę żuchwy człowieka oraz rodzaje i umiejscowienie złamań zaprojektowano i wykonano do zespołów złamań kości kłamy NiTi o różnych kształtach i rozmiarach. Efekt pamięci kształtu indukowany był w kłamrach termicznie pod wpływem ciepła ciała pacjenta. Kłamy i spinki do zespołów tkanek działające kompresyjnie formowano na gorąco w płomieniu palnika gazowego z własnych drutów TiNiCo odzyskujących kształt w temperaturach poniżej 37°C. W latach 1991-1995 zespolono złamania pojedyncze i wieloodłamowe żuchwy u 82 chorych leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej SAM w Katowicach [12,13]. Przykład zespolenia złamania kłamrami NiTi i radiogramy zespołów pokazano na wybranych fotografiach (RYS.1).



**RYS. 1. Zespolenie złamania żuchwy kłamrami NiTi (a) oraz zdjęcia radiologiczne przed osteosyntezą (b) i po osteosyntezie (c). FIG. 1. Joining of mandible fractures by the shape memory NiTi staples (a) and radiographs before osteosynthesis (b) and after osteosynthesis (c).**

Przeprowadzone badania potwierdziły prawidłowe zespolenie i dobrą stabilizację odłamów kostnych oraz dobre połączenie implantów z kością. Zakładanie klamer podczas operacji jest łatwiejsze w porównaniu do stosowanego powszechnie zszywania odłamów drutem stalowym lub przykręcania wkrętami mikroplatek stalowych lub tytanowych. Stabilne połączenie odłamów umożliwia eliminację wiązania międzyszczękowego zapewniając chorym większy komfort leczenia. Histopatologiczna ocena 68 wycinków okostnej otaczającej kłamy pobranych w okresie od 6 tygodni do 2,5 roku po ich założeniu nie wykazała nietypowych reakcji tkankowych.

### Zastosowanie supersprężystych dystraktorów NiTi w leczeniu kraniostenoz

Podjęte w latach 1999-2001 badania ciągłego wydłużania kości żuchwy u młodych świń stanowiły podstawę podjęcia prób klinicznego zastosowania supersprężystych dystraktorów w kranioplastyce [21]. Implanty do korekcji kształtu czaszki wykonano z prostych drutów nadsprężystych zakończonych oczkowymi podgięciami umożliwiającymi umocowanie ich na czaszce.

Zadaniem takiego implantu uformowanego w kształcie napiętego łuku jest działanie z zaprogramowaną stałą siłą podczas dystrakcji. Prostsze w użyciu są implanty pierścieniowe wykonane z supersprężystych drutów NiTi wyginanych do kształtu okręgów o średnicach od 90-110 mm i spawanych na zakładkę w atmosferze ochronnej argonu przy użyciu lasera dentylistycznego o mocy 30W. Od 2002 roku w Klinice Chirurgii Plastycznej w Polanicy Zdroju wykonano około 20 operacji modelowania czaszki u dzieci wspomaganego prototypowymi supersprężystymi dystraktorami NiTi w kształcie łuku

## Results

### Application of the NiTi shape memory staples for joining of human mandible bone fractures

Concerning the anatomical structure of human mandible, the type and location of the fracture

NiTi staples of different shapes and sizes were designed and manufactured.

The shape memory effect in the implants were thermally induced using temperature of the patient's body. Shape of the clips and staples compression-acting for tissue anastomosis was formed using the hot flame of a gas burner with its own wires TiNiCo recovering shape at temperatures below 37°C. In the years: 1991-1995, 82 patients with single or multi bone fracture were successfully treated in the Department of Maxillofacial Surgery in Katowice, SAM [12, 13]. Example of the bone joining with use of the NiTi staples were shown in selected photographs (FIG.1).

Clinical studies, which were carried out, have proved correct fixation of the bone fractures, their good stabilization as well as proper joining between bone and implants. Use of the staples during surgical operation is easier in comparison to fixation with use of steel wire or screwing screws made from steel or titanium microplates.

Stable connection eliminates binding fragments giving patients more comfortable during medical treatment. Histopathological evaluation of 68 segments of the periosteum, which surrounded the staples, did not show any abnormal tissue reactions. The samples were taken in the period from 6 weeks to 2.5 years after implantation.

### Application of the superelastic NiTi distractors in the craniostenosis treatment

Results of the studies carried out in period of 1999-2001 on a continuous elongation of the jaw bone in young pigs were the basis to test the clinical use of superelastic distractors in the craniostenosis [21]. The NiTi distractors, developed at the Institute of Materials Science University of Silesia, were designed and made in the shape of arch or rings. Implants for the correction of skull shape were made from straight wire circle-ended. Function of such implant, formed in the shape of a stretched arch, was to distract a bone with programmed constant force. Simpler for medical use are NiTi implants made from superelastic NiTi wire bent into the shape of circles with diameters from 90-110 mm. The ends of wires were welded using a dental laser with power of 30W in a protective atmosphere of argon. Since 2002, in the Plastic Surgery Clinic in Polanica Zdrój more than 20 modelling operations of the skull in children, with use of superelastic distractor prototype, have been successfully done. No early or



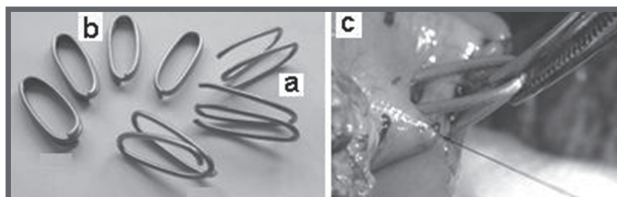
**RYS. 2. Fotografie sklepienia czaszki z dystraktorami NiTi w kształcie łuków(a) i pierścienia (b) raz kształt czaszki przed leczeniem (c) i po dystrakcji (d).**

**FIG. 2. Photography of skull with NiTi distractors in the shapes of arches (a) and flattened ring(b) and the shape of child's head before treatment (c) and after distraction (d).**

ków i pierścieni opracowanymi w Instytucie Nauki o Materiałach Uniwersytetu Śląskiego. Nie stwierdzono wczesnych ani późniejszych komplikacji podczas implantacji sprężyn jak również podczas ich usuwania. Poniżej na fotografiach przedstawiono sposób mocowania łuków i ściśniętego pierścienia na zdeformowanej czaszce dziecka bezpośrednio po rozcięciu szwów czaszkowych (RYS. 2a i 2b) oraz kształt głowy dziecka przed (RYS. 2c) i po dystrakcji (RYS. 2d).

#### Zastosowanie kompresyjnych klipsów NiTi do anastomozy jelit

W 2007 roku w Instytucie Nauki o Materiałach podjęto próby opracowania własnych spinek NiTi do kompresyjnej anastomozy jelit. Badania kliniczne zespalania jelit spinkami są prowadzone w Klinice Chirurgii Przewodu Pokarmowego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach [22]. Na RYS. 3 przedstawiono prototypy opracowanych klipsów z zaindukowaną dwukierunkową pamięcią kształtu w stanie rozwartym (RYS. 3a) i ściśniętym (RYS. 3b) oraz klips wprowadzany do tkanki w celu mechanicznego zszycia jelita (RYS. 3c).



RYS. 3. Kompresyjne, zespalające klipsy NiTi w stanie rozwartym (a) i ściśniętym (b) oraz klips wsuwany w nacięcia ścianek jelita (c).

FIG. 3. NiTi compression anastomosis clips in opened (a) and compressed (b) state and the clip inserted into the incision walls of the intestine (c).

#### Zastosowania implantów NiTi do zespolenia złamań wyrostka kłykciowego żuchwy oraz złamań kości twarzy

Stopy NiTi zastosowano również w zespoleniach fragmentów kostnych w obrębie twarzoczaszki. Do zespolenia wyrostka kłykciowego żuchwy oraz złamań kości twarzy wykorzystano prototypowe supersprężyste klamry NiTi. Odpowiednie kształty oraz wielkość klamer były programowane w zależności od indywidualnego przypadku klinicznego. Przykładowy typoszereg klamer zastosowanych w Klinice Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego przedstawiono na RYS. 4a. Prototypy formowano a następnie testowano na modelu czaszki (RYS. 4b). Fiksacja odłamów kostnych klamrami supersprężystymi podczas operacji chirurgicznej jest łatwiejsza i szybsza w porównaniu do zespolenia klamrami aktywowanymi termicznie [22]. Na RYS. 4c przedstawiono radiogram wykonany po operacji zespolenia złamań kości jarzmowej klamrami NiTi.

#### Podsumowanie

Wieloletnie badania prowadzone w Instytucie Nauki o Materiałach umożliwiły zoptymalizowanie temperatur i czasów obróbki stopów NiTi w postaci drutów charakteryzujących się odpowiednimi własnościami umożliwiającymi ich zastosowanie na implanty medyczne. Wykazano możliwość regulowania temperatur odzysku kształtu oraz supersprężystości drutów NiTi przeznaczonych dla chirurgii poprzez zastosowanie odpowiedniej obróbki cieplno-mechanicznej. Z drutów odzyskujących kształt w temperaturach poniżej

late complications were observed during springs implantation as well as during the operation of their removal. Below, the photographs shows fixation of arches (FIG. 2a) and flattened ring (FIG. 2b) on the child's skull immediately after suture cutting (Fig. 2a) and the shape of the child's head before (FIG. 2c) and after distraction (FIG. 2d).

#### Application of the NiTi compression clips for intestinal anastomosis

Since 2007, in the Institute of Materials Science University of Silesia the elaboration of own NiTi compression clips for intestinal anastomosis was started. The clinical investigations of intestinal anastomosis, with use of compression clips, were carried out in the Clinic Gastrointestinal Surgery, Medical University of Silesia in Katowice [22]. FIG.3 shows example of compression clips application: the clips with induced two-way shape memory in opened (FIG.3a) and compressed (FIG.3b) state as well as the clip inserted into the tissue for mechanical stapling of bowel (FIG.3c).

#### Application of the NiTi staples for joining of the mandibular condyle and the facial bone fractures

The NiTi implants were applied also for joining of bone fragments in the craniofacial region. Prototypes of the superelastic NiTi staples were used for fixation of mandibular condyle and face bone fractures [23]. Appropriate shape and size of the staple was programmed adequately to individual clinical case. Exemplified specification of the NiTi staples, applied in the Clinic of Cranio-Maxillofacial Surgery Medical University of Silesia, are shown in FIG. 4. Prototypes were formed and tested with use of the skull model (Fig. 4b). The fixation of bone fragments, applying the superelastic staples during surgical operation, is easier and quicker in comparison to joining with use of a thermal-activated staples [22]. Figure 4c shows radiograph performed after joining operation of zygomatic- orbital bone fractures.



RYS. 4. Supersprężyste klamry NiTi do zespolenia złamań kości twarzy (a), zespolenie złamań kości jarzmowej na modelu czaszki (b) radiogram wykonany po operacji zespolenia złamań klamrami NiTi (c).

FIG. 4. Superelastic NiTi staples for fixation of face bone fractures (a), the zygomatic bone fracture fixation on the model of the skull (b) and radiograph performed after bone fracture fixation with use the superelastic NiTi staples (c).

#### Summary

The long-term studies have been carried out in the Institute of Materials Science. The studies allowed to optimize temperature and time of the thermal treatment for NiTi alloys applied for medical implants. It has been shown that using appropriate thermal treatment enable to regulate temperatures and shape recovery of NiTi wires intended for use in surgery. From the wire, which recovers its shape below 37°C, clips and staples were designed and made for compression-acting tissue anastomosis. The wires, which revealed superelastic phenomena, distractors for skull modeling in craniostasis and clips for fixation of bone fractures of the face were designed, fabricated and practically applied. Forces of clamps and springs depending on the extent of

37°C opracowano i wykonano klamerki oraz spinki działające kompresyjnie do zespalania tkanek. Natomiast z drutów wykazujących zjawisko supersprężystości zaprojektowano i wytworzono dystraktory do plastyki czaszki w leczeniu kraniostenoz oraz klamerki do zespożeń złamań kości twarzy. Siły oddziaływań klamer i sprężyn w zależności od zakresu odkształceń, kształtu i rozmiarów oraz średnicy drutów z których zostały wykonane nie przekraczają wielkości około 15N.

Uzyskane wyniki w zakresie opracowania własnej technologii wytwarzania stopów NiTi, z pamięcią kształtu, badań struktury oraz kształtowania i optymalizacji własności opracowanych implantów NiTi a także pozytywne wyniki dotychczasowych badań klinicznych stanowią podstawę do podjęcia produkcji tych implantów w kraju i uzyskania wyrobów medycznych z certyfikatem CE, zarejestrowanych i dopuszczonych do stosowania w medycynie. Efektem prowadzonych prac są opracowane i wprowadzone do praktycznego zastosowania prototypy implantów. Implanty te z powodzeniem zastosowano w badaniach klinicznych przy współpracy z kilkoma ośrodkami krajowymi takimi jak: Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej ŚIAM w Katowicach, Klinika Chirurgii Plastycznej w Polanicy Zdroju oraz Kliniki Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Czaszko-Szczękowo-Twarzowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

deformation, the shape and size and diameter of wires from which they were made do not exceed a size of about 15N.

The results obtained in developing its own manufacturing technology NiTi alloys, shape memory, the structure of research and development and optimization of properties of NiTi implants developed and the positive results of previous clinical trials are the basis for the manufacture of these implants in the country and obtain a medical device with CE certificate, registered and authorized for use in medicine.

The final results of studies was introduction to practical application prototype of medical implants. These implants were successfully applied in clinical studies in cooperation with national clinics: Maxillofacial Surgery Clinic of Medical Academy in Katowice, Plastic Surgery Clinic in Polanica and Gastrointestinal Surgery and Cranio-Maxillo-Facial Surgery Clinics in Medical Univeristy of Silesia in Katowice.

## Piśmiennictwo

- [1] N. B. Morgan, *Materials Science and Engineering A* 378 (1-2) (2004) 16-23.
- [2] S. A. Shabalovskaya, *Bio-Medical Materials and Engineering* 12 (1) (2002) 69-109.
- [3] K. Otsuka, X. Ren, *Progress in Materials Science* 50 (5) (2005) 511-678.
- [4] T. W. Duerig, K. N. Pelton, D. Stockel, *Bio-Med. Mat. Eng.* 6 (1996) 255-66.
- [5] W. E. Giuntier, W. I. Itin, Ł. A. Monasevitch i in., *Effekty pamięci formy i ich primienienije w medycynie*. Tomsk 1992.
- [6] A. R. Pelton, J. DiCello, S. Miyazaki. *Min Invas Ther & Allied Technol.* 9 (1) (2000) 107-118.
- [7] K. W. K. Yeung, K. M. Cheung, W. W. Lu, C. Y. Chung, *Mat. Sci. Eng. A* 383 (2004) 213-218.
- [8] L'H. Yahia, *Shape Memory Implants*, Springer-Verlag, Berlin 2000.
- [9] L. Petrini, F. Migliavacca, *Journal of Metallurgy* 2011 (20011) 1-15.
- [10] T. Yoneyama, S. Miyazaki, *Shape memory alloys for biomedical applications*. Published by Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, England (2009).
- [11] D. Tarniță, D. N. Tarniță, N. Bîzdoacă, I. Mîndrilă, M. Vasilescu, *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 50(1) (2009) 15-21.

## References

- [12] J. Drugacz, praca habilitacyjna, Śląska Akademia Medyczna, Katowice, 1996.
- [13] J. Drugacz, Z. Lekston, H. Morawiec, K. Januszewski., *J. Oral Max. Surg.* 53 (1995) 665-701
- [14] L. G. Machado, M. A. Savi, *Brazilian J. Med. Biol. Research* 36 (6) (2003) 683-691.
- [15] H. Morawiec, Z. Lekston, *Implanty medyczne z pamięcią kształtu*. Wyd. Pol.Śl. Gliwice 2010.
- [16] L. R. David, P. Proffer, W. J. Hurst, S. Glazier, L. C. Argenta, *J. Craniofac. Surg.* 15 (5) (2004) 810-816.
- [17] K. Kobus, M. Węgrzyn, Z. Lekston, H. Morawiec, J. Drugacz., *J. Craniofac. Surg.* (2007).
- [18] H. Morawiec, Z. Lekston, K. Kobus, M. Węgrzyn, J. Drugacz., *J. Mat. Sci: Med. Mat.* (2007).
- [19] I. L. Nudelman, V. Fuko, N. Waserberg, Y. Niv, M. Rubin, M. A. Szold, S. Lelecu, *American J. of Surgery* 190 (2005) 434-438.
- [20] A. Szold, *Surg Endosc* 20 (2006) 1493-1496.
- [21] Z. Lekston, J. Drugacz, H. Morawiec, *Mat. Sci. and Engineering A* 378 (2004) 537-541.
- [22] P. Lampe, K. Kuśnierz, D. Zhavoronkov, H. Morawiec, *Polish J. Surg* 80 (6) (2008) 306-309.
- [23] M. Jędrusik-Pawłowska, Z. Lekston, J. Drugacz, M. Kromka-Szydek, T. Cieślík, *Engineering of Biomaterials*. No. 89-91, vol. XII (2009) 79-82.

## WYTWARZANIE NANORURKOWYCH WARSTW TLENKOWYCH NA STOPIE TYTANU Ti13Nb13Zr

A. OSSOWSKA\*, A. ZIELIŃSKI, M. SUPERNAK

POLITECHNIKA GDAŃSKA,  
UL. NARUTOWICZA 11/12., 80-952 GDAŃSK, POLSKA  
\*E-MAIL: AGNIESZKA.OSSOWSKA@PG.GDA.PL

### Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań utleniania i testów korozyjnych przeprowadzonych na stopie tytanu Ti13Nb13Zr w różnych warunkach. Warstwę tlenkową wytworzono metodą elektrochemiczną w środowisku 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+0.3%HF w czasie 30 min. i 1h, przy stałym napięciu 20V. Testy korozyjne przeprowadzono metodą potencjodynamiczną w środowisku roztworu Ringera. Stwierdzono obecność nanorurkowych warstw tlenkowych na stopie Ti13Nb13Zr zwiększających odporność korozyjną nawet w kwaśnym środowisku.

**Słowa kluczowe:** stop tytanu, utlenienia, struktura nanorurkowa

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 66-68]

### Wstęp

Wzrastające zapotrzebowanie w implantologii na tytan i jego stopy powoduje ciągłe poszukiwanie nowych procesów, które zwiększają odporność korozyjną, biogodność i czas użytkowania implantów [1]. Znaczącą poprawę właściwości implantów tytanowych można osiągnąć przez modyfikację składu chemicznego, tworzenie warstwy wierzchniej z metali nieszlachetnych lub powłok ceramicznych wykazujących korzystne właściwości fizyczne, chemiczne i mechaniczne [2,3]. Zastosowane modyfikacje warstwy wierzchniej mogą spowodować wzrost adhezji komórek na powierzchni metalu. Proces zachodzący na granicy implant–środowisko może być kontrolowany poprzez zmiany właściwości implantów.

Istotnym procesem wpływającym na odporność tytanu i jego stopów jest samorzutne tworzenie się na powierzchni cienkiej warstwy tlenku [4,5]. W wyniku utleniania elektrochemicznego przeprowadzonego w warunkach laboratoryjnych istnieje możliwość uzyskania

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na dwufazowym stopie tytanu Ti13Nb13Zr, którego skład chemiczny przedstawia Tabela 1.

Z blachy wycięto próbki o wymiarach 15x10x2 mm. Próbki były szlifowane i polerowane. Polerowanie zakończona na papierze o gradacji 2500. Następnie próbki poddano czyszczeniu w myjce ultradźwiękowej w trzech różnych roztworach- acetonie, izopropanolu i wodzie destylowanej. Warstwa tlenkowa została utworzona metodą elektrochemiczną w 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+0.3%HF w środowisku kwaśnym. Proces przeprowadzono w temperaturze 20°C przy potencjale 20 V przez czas 30 min. lub 1 h.

TABELA 1. Skład chemiczny stopu tytanu Ti13Nb13Zr.  
TABLE 1. Chemical composition of titanium alloy Ti13Nb13Zr.

Nb	Zr	Fe	C	N	O
13,5-14	13,5-13,8	0,05-0,06	0,04	0,013-0,019	0,11

## PREPARATION OF NANO-TUBULAR OXIDE LAYERS ON TITANIUM ALLOY Ti13Nb13Zr

A. OSSOWSKA\*, A. ZIELIŃSKI, M. SUPERNAK

GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
11/12 NARUTOWICZA STR., 80-952 GDANSK, POLAND  
\*E-MAIL: AGNIESZKA.OSSOWSKA@PG.GDA.PL

### Abstract

The article presents results of oxidation tests and corrosion investigations of titanium alloy Ti13Nb13Zr performed at different conditions. The oxide layers have been formed using electrochemical method in 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+0.3% HF solution for 30 min. and 1h at 20V constant voltage. The corrosion tests have been made with potentiodynamic method in Ringer's solution at pH ranged between 3 and 7. It has been shown that the nano-oxide films, which improved corrosion resistance of titanium alloy Ti13Nb13Zr even in acidic environment, have been formed.

**Keywords:** titanium alloy, anodic oxidation, nano-tubular structure

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 66-68]

### Introduction

Increasing demand for titanium and its alloys used in implantology results in searching of new processes which increase corrosion resistance, biocompatibility and lifetime of implants [1]. Significant improvement of properties of titanium implants can be achieved through modification of chemical composition, creation of surface layers or ceramic coatings with advantageous physical, chemical and mechanical properties [2,3]. Applied modifications of surface layer can improve adhesion of cells to the metal surface. Process which occurs at the implant–environment interface can be controlled through the changes of properties of implants.

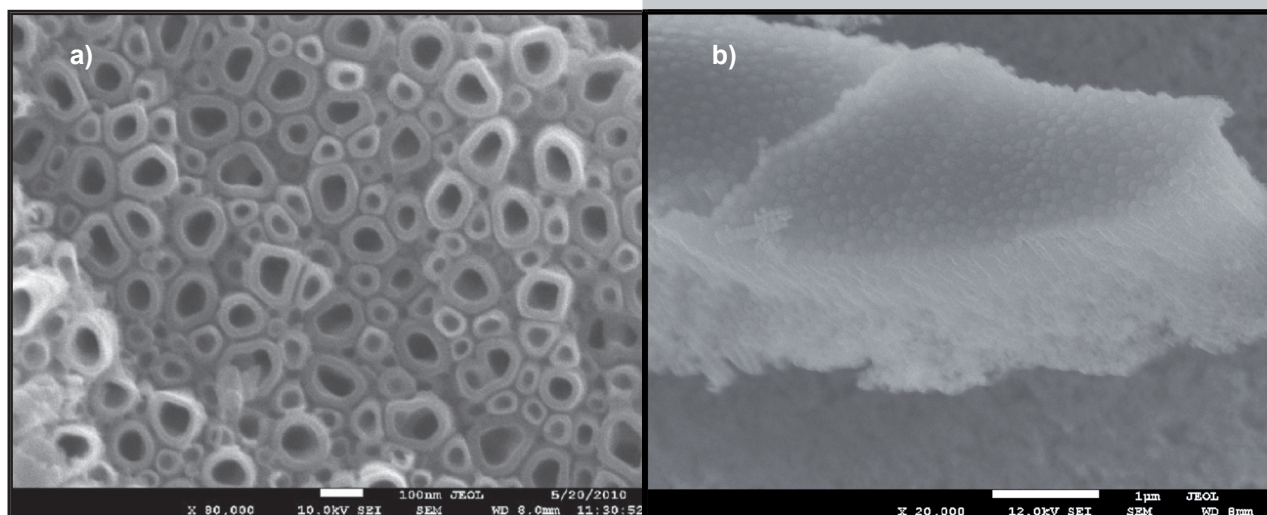
The substantial process which affects the corrosion resistance of titanium and its alloys is a spontaneous creation of thin oxide layer [4,5]. The artificial electrochemical oxidation made at laboratory conditions may result in the achievement of thicker passive layers on the surface of a metal and its alloys.

### Materials and methods

Tests were performed on two-phase titanium alloys Ti13Nb13Zr, which chemical composition is shown in Table 1.

The specimens of dimensions 15x10x2 mm were cut from the metal sheet. Then the specimens were polished with abrasive papers, No. 2500 as the last. Afterwards the specimens were cleaned in ultrasonic chamber filled, subsequently in acetone, isopropanol and distilled water.

The oxide layers have been created by electrochemical method in 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+0.3%HF acidic environment. The proc-



RYS. 1. Mikrostruktura stopu tytanu po procesie anodyzowania przy 20V, w środowisku 1M  $H_3PO_4+0.3\%HF$ , 30 min, 20°C: a) pow. 80.000, b) pow. 37.000x.

FIG. 1. Titanium alloy microstructure after being anodized at 20V above the 1M  $H_3PO_4+0.3\%HF$  solution, 30 min, 20°C: a) 80.000x, b) 37.000x.

Uzyskane struktury nanorurkowe obserwowano na mikroskopie skaningowym (SEM) (JEOL JSM-7600F, Japonia).

Potencjodynamiczne pomiary korozyjne przeprowadzono w roztworze Ringera przy różnych wartościach pH: 3, 5 i 7 uzyskanych przez dodatek kwasu chlorowodorowego, przy szybkości zmiany potencjału 10 mV/min.

## Wyniki i dyskusja

RYS. 1 przedstawia mikrostrukturę uzyskaną w procesie utleniania elektrochemicznego. Widoczna jest struktura nanorurkowa o parametrach; długość do 2  $\mu m$ , średnica 80-120 nm i grubość ścianek 10-25 nm. Odróżnić można co najmniej dwie grupy nanorurek o zróżnicowanych wymiarach, przypuszczalnie tworzące się na różnych fazach. Wyniki wskazują, że powstawanie warstwy nanorurkowej na badanym stopie jest stosunkowo łatwe, zaś otrzymane nanorurki mają wymiary ułatwiające późniejszą adhezję hydroksyapatytu i/lub osteoblastów. Czas miał niewielki wpływ na geometrię nanorurek.

RYS. 2 pokazuje krzywe potencjodynamiczne uzyskane przy pH=7 dla stopu nieutlenianego i pH=3 dla stopu utlenianego. Widoczny jest wzrost odporności korozyjnej nawet przy tak niskim pH.

ess was performed at 20°C at 20 V voltage for 30 min. or 1h.

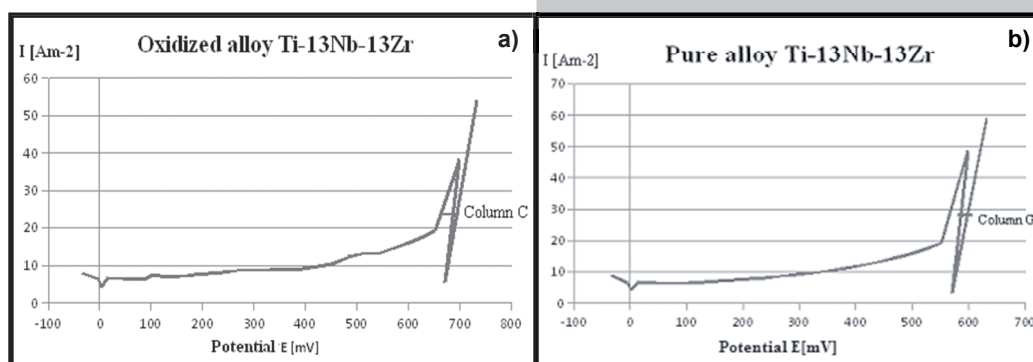
The obtained structures of nano-tubular oxide layers were observed using scanning electron microscopy (SEM Jeol JSM-7600F, Japan).

Potentiodynamic corrosion tests were made in Ringer's solution at pH - 3, 5 and 7 obtained with addition of hydrochloric acid at potential change rate 10 mV/min.

## Results and discussion

FIG. 1 shows microstructure obtained after electrochemical oxidation. The nanotubular structure is seen with following dimensions: length up to 2  $\mu m$ , diameter 80-120 nm and wall width 10-25 nm. At least two colonies of nanotubes can be distinguished, likely grown on different phases. The results prove that formation of nanotubular structure on tested alloy is relatively easy and obtained nanotubes have dimensions enhancing further hydroxyapatite and osteoblasts adhesion. Time had a small effect on nanotubes' geometry.

FIG. 2 present potentiodynamic curves obtained at pH=7 for non-oxidised alloy and pH=3 for oxidised alloy. The increase in corrosion resistance is observed even at such low pH.



RYS. 2. Krzywe anodowe uzyskane dla stopu: utlenianego, przy pH=3 (a) i nieutlenianego, przy pH=7 (b).

FIG. 2. Anodic curves obtained for the alloy: oxidised, at pH=3 (a), and non-oxidised, at pH=7 (b).

## Wnioski

W wyniku procesu utleniania elektrochemicznego w obecności kwasu fluorowodorowego wytworzone zostają na stopie Ti13Zr13Nb struktury nanorurkowe tlenku tytanu. Wymiary nanorurek mogą ułatwiać adhezję hydroksyapatytu i osteoblastów.

Uzyskana nanorurkowa warstwa tlenku tytanu poprawia istotnie odporność na korozję stopu tytanu Ti13Nb13Zr.

## Podziękowania

*Badania zostały wykonane w ramach Polsko-Islandzkiego projektu „Porous composite titanium alloy of high corrosion resistance, and bioactivity PORTAL” w ramach programu ERA-NET MATERA.*

## Conclusions

The nanotubular titania layers are formed on the Ti13Zr13Nb alloy as a result of its electrochemical oxidation in presence of hydrofluoric acid. The nanotubes` dimensions may enhance adhesion of hydroxyapatite and osteoblasts.

The obtained nanotubular layer of titanium oxide substantially improve corrosion resistance of the Ti13Nb13Zr alloy.

## Acknowledgements

*The research has been performed as a part of the Polish-Icelandic Project “Porous composite titanium alloy of high corrosion resistance, biocompatibility and bioactivity PORTAL” under ERA-NET MATERA Programme.*

## Piśmiennictwo

- [1] H. Gülerüz, H. Çimenoglu, *Biomaterials*, 25 (2004), 3325-3333.
- [2] J. Bieniaś, A. et al., *Biomaterials Engineering*, 58-60 (2006), 62-64.
- [3] T. Wierzchoń et al., *Surface engineering of biomaterials in the manufacture of titanium*. Publishing House of Warsaw Univ. Techn., 2004.(2009) 15-21.

## References

- [4] N.R. Van NR, *J. Mater. Res.* 22 (1987) 3801-3811.
- [5] J.L. Ong et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 6 (1995) 113-119.

# BADANIA BIOAKTYWNOŚCI Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK KOŚCIOTWÓRCZYCH NA TYTANIE POKRYTYM CHITOZANEM

MILENA SUPERNAK

POLITECHNIKA GDAŃSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I SPAJANIA,  
UL. GABRIELA NARUTOWICZA 11/12, 80-233 GDAŃSK  
E-MAIL: MILENA@SHL.PL

## Streszczenie

*Chitozan to naturalny polimer z grupy polisacharydów, który znalazł szerokie zastosowanie w aplikacjach biomedycznych w celu wywołania bioaktywności implantu. W opisanych badaniach przeprowadzono próbę nałożenia membran chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji na powierzchnię tytanu, a następnie sprawdzenie bioaktywności materiału w warunkach in vitro, przy wykorzystaniu komórek kościotwórczych MC3T3-E1. Powierzchnia tytanu przed nałożeniem powłoki chitozanowej została poddana utlenianiu. Po siedmiu dniach od nałożenia komórek na tytan pokryty powłoką chitozanową wykonano testy proliferacji, których rezultat analizowano na mikroskopie fluorescencyjnym Olympus BX 51. Zaobserwowany wzrost komórek wskazuje na uzyskanie dobrej bioaktywności powierzchni, jednak niewystarczającej adhezji pomiędzy tytanem a membraną chitozanową. Proponowana jest dalsza modyfikacja powierzchni tytanu i procesu nakładania powłok chitozanowych.*

**Słowa kluczowe:** chitozan, tytan, bioaktywność, komórki kościotwórcze

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 69-72]

## Wprowadzenie

Tytan i jego stopy są materiałami powszechnie stosowanymi na implanty, mają bardzo dobrą wytrzymałość i odporność korozyjną [1]. Jednak mimo doskonalenia ich powierzchni pozostaje problematyczna kwestia trwałego połączenia implant-tkanka kostna [2]. Rozwiązaniem tego problemu jest uzyskanie powierzchni o odpowiedniej bioaktywności umożliwiającej szybki i stabilny przerost implantu tkanką [3].

Na poprawę bioaktywności powierzchni tytanu może wpłynąć naniesienie powłoki chitozanowej [4]. Chitozan - należy do grupy polisacharydów produkowanych w procesie chemicznej deacetylizacji chityny [5]. Może uzyskiwać różne stopnie deacetylacji [6]. Niższy stopień zwiększa bioaktywność, wyższy sprzyja lepszemu przywiązaniu komórek [7]. Ten naturalny polimer jest nietoksyczny, biodegradowalny, biokompatybilny, a przede wszystkim działa antybakteryjnie [8,9]. Dzięki swym właściwościom znalazł szerokie zastosowanie w biotechnologii, farmacji i medycynie [10].

Celem badań było podjęcie próby nałożenia powłoki chitozanowej na powierzchnię tytanu, a w dalszym etapie sprawdzenie bioaktywności takiej powierzchni w warunkach in vitro, z wykorzystaniem komórek kościotwórczych.

# BIOACTIVITY STUDIES USING OSTEOGENIC CELLS ON TITANIUM COATED WITH CHITOSAN

MILENA SUPERNAK

GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
11/12 NARUTOWICZA STR., 80-952 GDANSK, POLAND  
E-MAIL: MILENA@SHL.PL

## Abstract

*Chitosan is a natural polymer from the group of polysaccharides, which has found wide application in biomedical applications to induce bioactivity of implant. The studies described were carried out test imposition of chitosan membranes with varying degrees of deacetylation on the surface of titanium, and then check the bioactivity of the material in vitro, using osteogenic cells MC3T3-E1. Titanium surface before imposition of chitosan coating has been subjected to oxidation. After seven days of the imposition of cells on titanium with chitosan coated, we performed proliferation test using fluorescent microscope Olympus BX51. The observed increase in cell indicates a obtain good bioactivity of the surface, however the adhesion between the titanium and the chitosan membrane is insufficient. Proposed a further modification of titanium surface and chitosan coating process.*

**Keywords:** chitosan, titanium, bioactivity, osteogenic cells

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 69-72]

## Introduction

Titanium and its alloys are materials commonly used for implants, they have very good strength and corrosion resistance [1]. However despite the improvement of their surface, remains a problematic question of a lasting connection implant-bone tissue [2]. The solution to this problem is to obtain a suitable surface bioactivity enabling fast and stable implant tissue overgrowth [3]. To improve bioactivity of titanium surface may affect drawing of chitosan coating [4].

Chitosan - belongs to a group of polysaccharides produced by chemical deacetylation of chitin [5]. May obtain different degrees of deacetylation [6]. Lower degree increases bioactivity, higher promotes better cell attachment [7]. This natural polymer is non-toxic, biodegradable, biocompatible and especially antibacterial [8, 9]. Thanks to their properties, has found wide application in biotechnology, pharmacy and medicine [10].

The aim of this study was to try to impose chitosan coating on titanium surface and at a later stage to check bioactivity of this surface using osteogenic cells in vitro.

## Materials and methods

### Materials

To test was used pure titanium 99.6% (AST B262), with dimensions 10x10x2 mm. The samples were polished on one side with waterproof paper to the final graduation 2400, and then subjected to ultrasonic cleaning in the reagents such as acetone, ethanol, deionized water. Prepared in this

**Materiały**

Do badań użyty został czysty tytan 99,6% (AST B262), o wymiarach 10x10x2 mm. Próbki były szlifowane jednostronnie na wodoodpornym papierze do końcowej gradacji 2400, a następnie poddane czyszczeniu w myjni ultradźwiękowej, w takich odczynnikach jak: aceton, etanol, woda dejonizowana. Tak przygotowane próbki zostały poddane utlenianiu w atmosferze powietrza w temperaturze 550°C, w czasie 3h. Po zakończonym procesie utleniania próbki poddano obserwacji mikroskopowej (RYS. 1) na skaningowym mikroskopie elektronowym (SUPRA 25 ZEISS), udostępnionym przez Islandzkie Centrum Innowacji.

Chitozan w postaci sproszkowanej (udostępniony przez Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) o różnym stopniu deacetylacji: DD 87% sigma, DD 87% , DD 96% został wykorzystany w procesie nanoszenia powłoki na powierzchnię tytanu.

W eksperymencie wykorzystano komórki kościotwórcze (udostępnione przez Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) pochodzące od myszy, typu MC3T3-E1. Komórki pobrane z organizmu żywego były przechowywane w temperaturze -80°C. W celu wykorzystania ich do badań doświadczalnych zostały one rozmrożone w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Komórki zostały umieszczone w inkubatorze w temperaturze 37°C z wilgotnością sięgającą 95% i dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. Jako pożywkę dla komórek zastosowano specjalny pokarm składający się z roztworu o nazwie handlowej α-MEM przygotowanego przez firmę GIBCO™ z dodatkiem 10% FBS (surowica bydlęca)

**Metody badań**

Membrany chitozanowe przygotowano wg procedury: 1% wagowy chitozanu rozpuszczonego w 0,5% wagowy kwasu octowego w wodzie, nanoszono na próbki tytanowe 3 krotnie, w odstępie czasowym 5 minut pomiędzy drugą aplikacją, w celu podsuszenia warstw. Następnie próbki zostały przeniesione do inkubatora w temp. 37°C, gdzie uległy wysuszeniu. Kolejnym etapem była neutralizacja membran w wodorotlenku sodu oraz sterylizacja z wykorzystaniem etanolu. Na tak przygotowanych próbkach zasiedlono komórki kościotwórcze MC3T3-E1, w ilości 5000 komórek na cm<sup>2</sup>. Komórki były karmione co 2 dni pokarmem o nazwie handlowej DMEM-F12 przygotowanym przez firmę GIBCO™ z dodatkiem surowicy bydlęcej (FBS) oraz penicyliny i streptomycyny (P/S).

Po siedmiu dniach przeprowadzono testy proliferacji komórek, wykorzystując w tym celu dwa odczynniki:

- CFSE (dioctan karboksyfluoresceina, sukcydimidowy ester) pokazujący rozrost komórek,
- DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol) pokazujący jądra komórkowe.

**Wyniki i dyskusja**

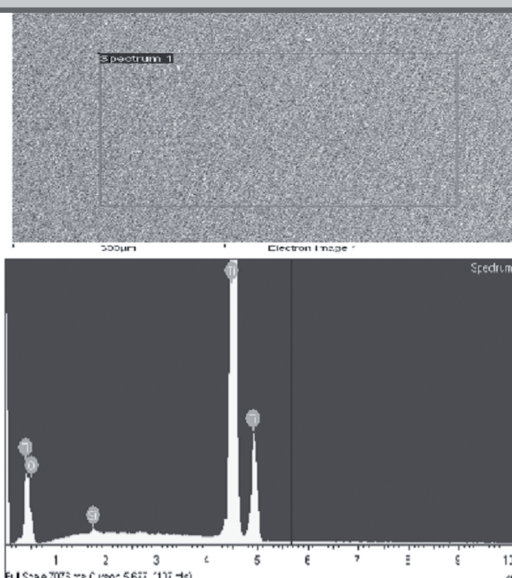
Próbki po badaniach proliferacji poddano obserwacji mikroskopowej na mikroskopie fluorescencyjnym Olympus BX

Spectrum processing :  
No peaks omitted

Processing option : All elements analyzed  
(Normalised)  
Number of iterations = 3

Standard :  
O 2440 CaCO3 15-Mar-2011 03:37 PM  
Si 3587 AISI 316 14-Dec-2010 02:09 PM  
Ti 2440 Ti 2-Dec-2010 03:56 PM

Element	Weight%	Atomic%
O K	13.40	31.62
Si K	0.26	0.35
Ti K	86.33	68.02
Totals	100.00	



**RYS. 1. Topografia powierzchni oraz skład chemiczny próbki tytanowej po utlenianiu.**  
**FIG. 1. Topography and surface composition of titanium samples after oxidation.**

way samples were subjected to oxidation in air atmosphere at 550°C during 3h. After the oxidation process, samples were subjected to microscopic observation (FIG.1) on scanning electron microscope (ZEISS SUPRA 25), shared by Icelandic Innovation Center.

Chitosan in powder (shared by Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) with different degrees of deacetylation: 87% DD sigma, DD 87% 96% DD were used in the process of applying a coating on the titanium surface.

In the experiment were used osteogenic cells (shared by Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital) coming from mouse, MC3T3-E1 type. Cells taken from a living organism were stored at -80°C. To use them for experimental studies they were unfrozen in a water bath at 37°C. The cells were placed in an incubator at 37°C with humidity up to 95% and the addition of 5% CO<sub>2</sub>. As a medium for the cells used a special food consisting of solution called α-MEM prepared by GIBCO™ with 10% FBS (bovine serum).

**Methods**

Chitosan membranes were prepared according the procedure: 1% by weight of chitosan dissolved in 0.5% by weight of acetic acid in water applied to the titanium sample 3 times, waiting five minutes between one application and another, to dry layers. Then samples were transferred to an incubator at 37°C, where they were dried. The next step was a neutralization of membranes in sodium hydroxide and sterilization using ethanol. At so prepared samples inhabited osteogenic cells MC3T3-E1, in an amount 5000 cells per cm<sup>2</sup>. Cells were fed every 2 days food DMEM-F12 prepared by GIBCO™ with the addition of FBS (bovine serum) and P/S (penicillin and streptomycin).

After seven days performed tests of cell proliferation, use for this purpose two reagents:

- CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) cell proliferation,
- DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindole) – cell nucleus.

**Results and discussion**

Samples after proliferation studies subjected to microscopic observation on fluorescence microscope Olympus BX 51. We analyzed four samples:

- sample with chitosan membrane DD87% sigma (FIG. 2),



51. Analizie zostały poddane 4 próbki:

- próbka z membraną chitozanową DD87% sigma (RYS. 2),
- próbka z membraną chitozanową DD87% (RYS. 3),
- próbka z membraną chitozanową DD 96% (RYS. 4),
- próbka tytanowa po procesie utleniania (RYS. 5).

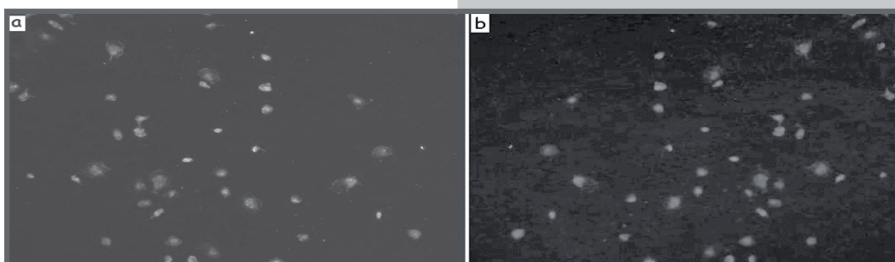
Na próbkach tytanowych z powłoką chitozanową DD 87%, (RYS. 3) i DD 96%, (RYS. 4) uzyskano oczekiwany wzrost komórek. Zaobserwować można znaczną ilość jąder komórkowych, co świadczy o stałym wzroście komórek, który w dalszym etapie prowadzi do narastania tkanki kostnej. Próbka z membraną DD87% sigma (RYS. 2) nie uzyskała oczekiwanego wzrostu komórek, zaobserwować można nieznaczną ilość jąder komórkowych, ale nie widać ich rozwoju. Spowodowane jest to niewystarczającą adhezją powłoki chitozowej do powierzchni tytanu (membrana nie utrzymała się na całej powierzchni próbki). Na próbkach tytanowych bez powłoki chitozowej (RYS. 5) obserwowany jest zbyt szybki wzrost komórek, który prowadzi do ich obumierania z powodu braku odpowiedniej ilości pożywienia.

Przeprowadzone badania są jednymi z pierwszych, które podjęły próbę połączenia tytanu z powłoką chitozanową bez stosowania szkodliwych substancji dla organizmu żywego, takich jak np. glutaraldehyd i silany [11, 12]. Uzyskane wyniki świadczą o zadowalającej bioaktywności po-

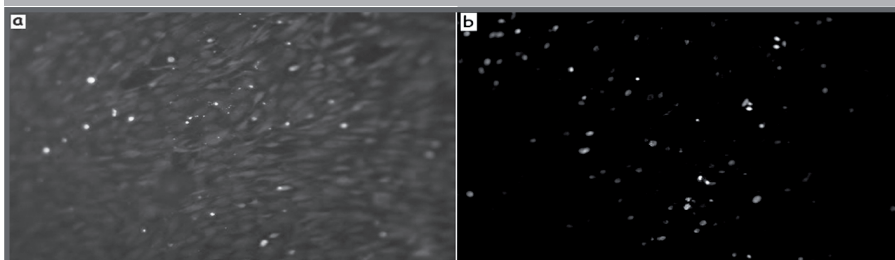
- sample with chitosan membrane DD87% (FIG. 3),
- sample with chitosan membrane DD96% (FIG. 4),
- titanium sample after oxidation (FIG.5).

On samples of titanium coated with chitosan DD 87%, (FIG.3) and DD 96% (FIG.4) obtained the expected growth of cells. May be observe a considerable amount cell nuclei, which shows steady growth of cells, which in a later stage lead to a build bone tissue. A sample of membrane DD 87% sigma (FIG.2) did not obtain the expected increase in cell, may be observe a slight amount cell nuclei, but can not see their growth. This is due to not sufficient adhesion chitosan coating to the surface of titanium (membrane is not kept over the whole surface of the sample). On samples of titanium without coating chitosan (FIG.5) observed is too fast cell growth, which will lead to their death because do not have enough medium.

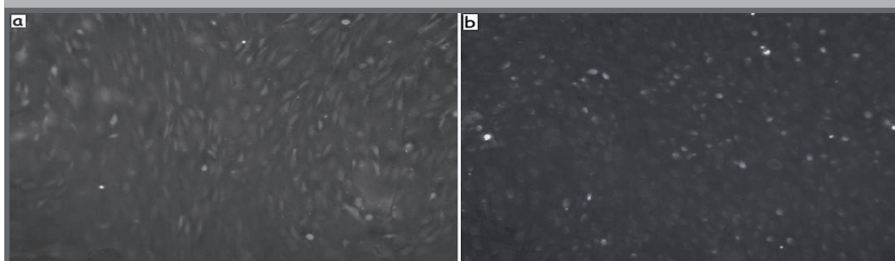
The research are one of the first, which attempted to connect the titanium with chitosan without using noxious substances for the living organism, such as glutaraldehyde and silanes [11,12]. The results show a satisfactory bioactivity of the surface, which leads to even better osseointegration of the implant tissue. However it is necessary to continue modification the surface of titanium and attempt to use its non-toxic alloys and coating process of chitosan, so that the the resulting material fulfills all the requirements for biomaterials.



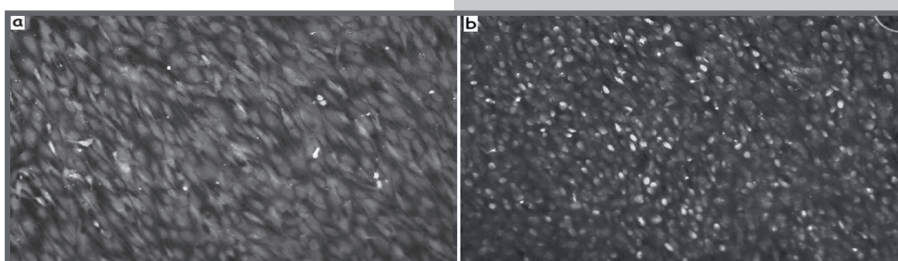
RYS. 2. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej membraną chitozanową DD87% sigma z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.  
FIG. 2. Image of the surface of titanium samples with chitosan membran DD87% sigma - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.



RYS. 3. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej membraną chitozanową DD87% z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.  
FIG. 3. Image of the surface of titanium samples with chitosan membran DD87% - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.



RYS. 4. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej membraną chitozanową DD96 z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.  
FIG. 4. Image of the surface of titanium samples with chitosan membran DD96% - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.



**RYS. 5.** Obraz powierzchni próbki tytanowej po procesie utleniania, z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI.

**FIG. 5.** Image of the surface of titanium samples after oxidation - effects of reagents: a) CFSE b) DAPI.

wierzchni, która prowadzi do jeszcze lepszej osteointegracji tkanki z implantem. Niezbędna jest jednak dalsza modyfikacja powierzchni tytanu oraz próba wykorzystania jego nietoksycznych stopów i procesu nakładania powłok chitozanowych, tak aby uzyskany materiał spełniał wszystkie kryteria stawiane biomateriałom.

### Podziękowania

Badania zostały wykonane częściowo dzięki środkom Polsko- Islandzkiego projektu "Porous composite titanium alloy of high corrosion resistance, biocompatibility and bioactivity PORTAL" w ramach programu ERA-NET MATERA, jak też stypendium z Funduszu Stypendialnego i Szkoleniowego (FSS).

Autorka pragnie również złożyć podziękowanie za współpracę następującym osobom: Dr. Gissur Örylgsson - Innovation Center Iceland, Dr. Ólafur E. Sigurjónsson - Bloodbank, Landspítali- Univ. Hospital, Reykjavik Univ.

### Acknowledgments

The study was done in part thanks to the Polish-Icelandic project "Porous composite titanium alloy of high corrosion resistance, biocompatibility and bioactivity PORTAL" under ERA-NET MATERA Programme, as well as scholarship FSS.

The author also wishes to thank the following people for their cooperation : Dr. Gissur Örylgsson - Innovation Center Iceland, Dr. Ólafur E. Sigurjónsson - Bloodbank, Landspítali- Univ. Hospital, Reykjavik Univ.

### Piśmiennictwo

- [1] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Surface engineering in the production of titanium biomaterials. Oficyna wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2000.
- [2] Marciniak J.: Problems use metallic biomaterials in orthopedic surgery. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2000.
- [3] Krupa D., Baszkiewicz J., Sobczak J.W., Bliński A., Barcz A.: Modifying the properties of titanium surface with the aim of improving its bioactivity and corrosion resistance. Journal of Materials Processing Technology 143-144 (2003) 158-163.
- [4] Vanzillotta P.S., Sader M.S., Bastos I.N., de Almeida Soares G.: Improvement on in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments. Dental Materials (2006) 22, 275-282.
- [5]. Gross R.A., Scholz C.: Biopolymers from polysaccharides and agroproteins. Waszyngton D.C., ACS 2001.
- [6]. Nagahama H., Maeda H., Kasjiki T., Jayakumar R., Furuike T., Tamura H.: Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. Carbohydrate Polymers 76 (2009) 255-260.

### References

- [7] Chatelet C., Damour O., Domar A.: Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials 22 (2001) 261-268.
- [8] Chitin Handbook. European Chitin Society 1997.
- [9] Prashant K.V.H., Tharanthan R.N.: Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. Trends Food Sci. Technol. 2007, 18, 117-131.
- [10] Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Tamura H.: Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances 29 (2011) 323-337.
- [11] Yuan et al.: Mechanical Property, Degradation rate, and Bone Cell Growth of Chitosan Coated on Titanium influenced by Degree of Deacetylation of Chitosan. Wiley InterScience DOI: 10.1002/jbm.b.31012.
- [12] Bumgardner et al.: Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. Implant Dentistry, Volume 16-Number 1.

## THE SOFT-TISSUE RESPONSE TO IMPLANTS OF CHITOSAN FOILS

CZESŁAWA PALUSZKIEWICZ<sup>1</sup>, ELŻBIETA MENASZEK<sup>2,3</sup>,  
MARIA ŻOŁNIEREK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF DEPARTMENT OF SILICATES CHEMISTRY, POLAND

<sup>2</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, POLAND

<sup>3</sup>UJ JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,  
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY, POLAND

### Abstract

The objective of our *in vivo* study was to investigate the biocompatibility of polymer foils enriched with chitosan.

**Methods:** three types of chitosan: non-modified (jp), and modified with montmorillonite K5 and montmorillonite K10 (p2-p3) were prepared.

The *in vivo* studies were carried out using the rat soft tissues as a model. Small pieces of foils (2mm x 4mm) used in the experiment were sterilized by UV radiation. Next they were implanted under sterile conditions into the gluteus muscle of adult male outbred Wistar rats. Each animal received two implants: the modified foil into the right muscle, and the unmodified foil used as a control into the left one. All procedures were conducted in sterile conditions and under anaesthesia. Animals were anesthetized with intraperitoneal injection of xylazine and ketamine (Biowet Puławy, Poland). Skin in the site of surgery was shaved and disinfected, and a small incision was made in the gluteus muscle. Equal pieces of foils were inserted into the such created pouch. The muscle and skin wounds were closed with 5/0 PDS II (polydioxanone) monofilament absorbable sutures (Ethicon Ltd., UK). All animals survived the surgery. No wound healing complications were observed after the surgery. The animals were maintained under standard conditions with free access to food and water. After 7, and 30 days from the surgery, at each time point 12 animals were sacrificed. Tissue specimens containing the implanted materials were excised and immediately frozen in liquid nitrogen. Next they were cut into 8 µm thick slides in a Shandon cryostat (Thermo-Scientific, UK) at -22°C. Obtained slides were investigated through histological and histochemical methods to estimate the intensity of inflammation, production of collagen, and metabolic activity of connective and muscle tissues surrounding implant. In order to estimate the effect of the implants on the metabolic state of surrounding tissues, activities of the marker metabolic enzymes: cytochrome c oxidase, and NADH dehydrogenase were examined. The activity of acid phosphatase was used to assess the extent of inflammation around the implants. The presence and thickness of fibrous capsule around the implants were estimated on slides stained by van Gieson's method.

**Results:** Differences between non-modified and modified with chitosan materials were not manifested in short, 7- and 30 days series. The activities of mitochondrial oxidative enzymes, cytochrome c oxidase

and NADH dehydrogenase, in muscle fibres in close proximity to the implants were slightly lower than in those further away. Probably one month was too short period to obtain the whole recovery after the surgery. At the same time the process of regeneration seemed to be intense: numerous regenerating muscle fibres infiltrated the granulation tissue around the implanted foils were observed. The inflammation response was visibly lower in 30 days series compared to 7 days ones what indicate that the inflammation was evoked in higher degree by surgery than by the presence of the implanted materials. The fibrous capsule around foils was thin or not present at all – there were places where pieces of foils were in direct contact with the muscle tissue. After one month experiment there were no signs of degradation of materials. The experiment has been continued to compare abilities of biomaterials in long term series.

**Conclusion:** The regeneration and enzymic activity of muscle tissue together with the lack of continuous fibrous capsule suggest that the materials used in our study are biocompatible and are suitable for the treatment of tissue injury.

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 73]

## SYNTEZA I WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI CHITOZANU MODYFIKOWANEGO KWASAMI TŁUSZCZOWYMI O POTENCJALNYM ZASTOSOWANIU JAKO PRZECIWDROBNOUSTROJOWE WARSTWY WIERZCHNIE NA ELASTOMERACH TERMOPLASTYCZNYCH

AGATA NIEMCZYK, JOANNA GAJOWY, MIROSLAWA EL FRAY\*

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY  
W SZCZECINIE, INSTYTUT POLIMERÓW,  
ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH,  
UL. PUŁASKIEGO 10, 70 – 322 SZCZECIN  
\*E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

### Streszczenie

W pracy przedstawiono próbę modyfikacji chitozanu kwasem tłuszczowym stosując kwas linoleinowy oraz chlorowodorek 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimidu (EDC·HCl) jako związek inicjujący reakcję pomiędzy grupami funkcyjnymi monomerów (karboksylowymi i aminoglikozydowymi). Analiza widm w podczerwieni potwierdziła zajście reakcji i utworzenie hydrofilowo-hydrofobowych makrocząsteczek, które w kolejnych badaniach zostaną poddane próbom wytwarzania nanocząstek o spodziewanych właściwościach antybakteryjnych.

**Słowa kluczowe:** chitozan, kwasy tłuszczowe, warstwy przeciwdrobnoustrojowe, biofilm

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 74-77]

### Wprowadzenie

Materiały i wyroby medyczne obejmują dużą grupę tworzyw sztucznych, przeznaczonych w leczeniu do czasowego lub długotrwałego kontaktu z organizmem. I choć materiały polimerowe stosowane do wyrobu implantów czy protez wykazują pożądaną dla danego zastosowania biokompatybilność, to wciąż często występującym problemem przy ich stosowaniu są infekcje, które mogą prowadzić do poważnych stanów chorobowych, a nawet śmierci pacjenta. Infekcje wywoływane są głównie przez mikroorganizmy, takie jak bakterie czy grzyby, które w wyniku adhezji do powierzchni materiału, rozmnażają się i tworzą biofilm (polisacharydową błonę redukującą aktywność metaboliczną mikroorganizmów, zwiększającą ich odporność na czynniki środowiska zewnętrznego, w tym również na antybiotyki) [1,2].

W interakcji pomiędzy biomateriałem a patogenem oraz zdolnością do tworzenia się biofilmu, główną rolę odgrywa charakterystyka powierzchni materiału jak zwilżalność, ładunek elektryczny, morfologia czy topografia. W profilaktyce powstawania antybiotykoopornych stanów zapalnych konieczne jest zahamowanie procesu powstawania biofilmu. Pierwszym etapem tego procesu (o charakterze odwracalnym), jest występowanie oddziaływań bliskiego za-

## SYNTHESIS AND SELECTED PROPERTIES OF CHITOSAN MODIFIED WITH FATTY ACID AS POTENTIAL ANTIMICROBIAL COATINGS FOR POLYMERIC IMPLANTS

AGATA NIEMCZYK, JOANNA GAJOWY, MIROSLAWA EL FRAY\*

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SZCZECIN,  
POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND  
MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES,  
10 PUŁASKIEGO STR.10, 70-322 SZCZECIN, POLAND  
\*E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

### Abstract

The paper presents preliminary investigation of chitosan modification with fatty acid using linoleic acid and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) as initiator for monomers functional (carboxyl and aminoglycoside) groups. The analysis of Infrared spectra confirmed the formation of hydrophilic-hydrophobic macromolecules, which further will be used for preparation of nanoparticles with antibacterial properties.

**Key words:** Chitosan, fatty acid, antimicrobial coatings, biofilm

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 74-77]

### Introduction

Materials and medical devices include a large group of polymers, intended for medical uses for temporary or prolonged contact with the organism. Although polymeric materials used in manufacturing of implants or prostheses are characterized by the desired biocompatibility for a given application, bacterial infections are still a frequent problem in many applications, what can lead to serious illnesses and even patients death. The main reason of infection are microorganisms, such as bacteria or fungi, which proliferate and form a biofilm (polysaccharide matrix reducing the metabolic activity of microorganisms, increasing their resistance to external environmental factors, including antibiotics) as a result of the adhesion to the material surface [1,2].

The surface characteristics like wettability, electric charge, morphology and topography play the major role in the biomaterial and pathogen interaction as well as in the ability to form a biofilm. The biofilm formation process needs to be inhibited in order to prevent the formation of antibiotic-resistant inflammation. The first stage of a process (which is reversible) is the occurrence of short-range interactions (mainly van der Waals) and a key factor for this step is a biomaterial surface wettability. The second (an irreversible) step is related to cell adhesion to the material surface, and revealing specific impact on different types of adhesion proteins on cell surfaces. Subsequently, the cells proliferate and create the layer of microorganisms on the surface. If the biological structure reach an extensive size, some elements are peeled off (by the action of shear forces) and transported to the another location on the material and surrounding tissues, where they are re-adhered to the surface [3,4]. In order to obtain antibacterial properties of biomaterials, various methods of surface modification, such

sięgu (głównie Van der Waalsa), a kluczowym czynnikiem tego etapu jest zwilżalność powierzchni biomateriału. Drugim etapem jest nieodwracalna adhezja komórek do powierzchni materiału związana ze specyficznymi oddziaływaniami różnego typu białek adhezyjnych występujących na powierzchni komórek. Kolejno dochodzi do namazania się komórek i pokrycia podłoża warstwą mikroorganizmów. Gdy struktura biologiczna zostanie odpowiednio rozbudowana, elementy tej struktury są odrywane (w wyniku działania sił ścinających) i przenoszone na dalsze odcinki materiału i sąsiednich tkanek, gdzie ponownie mogą ulec adhezji do podłoża. [3,4]. W celu uzyskania właściwości antybakteryjnych biomateriałów stosuje się różne metody modyfikacji powierzchni, takie jak naszczepianie związków posiadających właściwości antybakteryjne (np. odpowiednie białka) [2], wprowadzanie dodatków metali - głównie srebra, ale również miedzi, cynku, glinu i żelaza [5], impregnacja powierzchni lekami [6] oraz nakładanie powłok [3].

Chitozan, naturalny polielektrolit, o właściwościach powłokotwórczych, zbudowany z  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy i  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy (których udział zależy od stopnia deacetylacji, DD) jest nietoksycznym polisacharydem, biodegradowalnym, biokompatybilnym, biofunkcyjnym o szerokim spektrum bakterio- i fungistatycznym [7]. Ponadto, dzięki licznie występującym w cząsteczce grupom funkcyjnym (hydroksylowym i aminowym) w prosty sposób można poddać go modyfikacji chemicznej. I tak, poprzez naszczepienie na hydrofilowe łańcuchy chitozanu cząsteczek o charakterze hydrofobowym, można otrzymać cząsteczki amfifilowe, mające zdolność do samoorganizacji i tworzenia się mieli [8].

Celem pracy była chemiczna modyfikacja chitozanu kwasami tłuszczowymi i otrzymanie cząsteczek o charakterze hydrofilowo/hydrofobowym zdolnych do samoorganizacji i tworzenia nanocząstek. Cząsteczki takie zostaną w kolejnych pracach wykorzystane do tworzenia chitozanowo-tłuszczowych powłok antybakteryjnych na powierzchni elastomerów termoplastycznych stosowanych w kardiologii i urologii.

## Materiały i metody badawcze

Chitozan (Sigma-Aldrich, lepkość 20-300 cP 1% w 1% kwasie octowym, DD 75-85%) rozpuszczono w 1% kwasie octowym. Roztwór kwasu linoleinowego (LA) i chlorowodoru 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimidu (EDC·HCl) (1:1 mol/mol) w metanolu wkroplono do roztworu chitozanu, inicjując reakcję grup karboksylowych z grupami aminoglikozydowymi (0,34/1 mol/mol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Produkt wytrącono w roztworze amoniaku, odwirowano, przemyto wodą destylowaną i metanolem. Osad suszono pod obniżonym ciśnieniem w 30°C przez 24 h. Ocenę budowy chemicznej zmodyfikowanego chitozanu wykonano na podstawie analizy widm podczerwieni. Stopień deacetylacji (DD, %) chitozanu oznaczono miareczkowaniem konduktometrycznym, na podstawie analizy pierwszej pochodnej funkcji przewodnictwa roztworu chitozanu w 0,1 mol HCl, do objętości roztworu miareczkującego (0,1 mol NaOH) oraz korzystając z równania:

$$DD=203,2 \cdot 100 / (42,0 + 1000m \cdot 0,1(V_2 - V_1))^{-1}$$

gdzie  $m$  odpowiada ilości chitozanu (g), a  $V_2 - V_1$  objętości NaOH potrzebnej do odmiareczkowania grup aminowych chitozanu [8].

as grafting of antibacterial compounds (eg. some protein) [2], the implementation of metal ions, especially silver, but also copper, zinc, aluminum and iron [5], surface impregnation with drugs [6] and different coatings have been used [3].

Chitosan, a natural polyelectrolyte, with film-forming properties, consist of  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose and  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (with ratio depending from the deacetylation degree, DD) is a non-toxic polysaccharide, biodegradable, biocompatible, biofunctional with broad bactericidal and fungicidal spectrum [7]. Moreover, through numerous functional groups (hydroxyl and amine) in chitosan molecule, chemical modification can be carried out in a simple way. Thus, through grafting of hydrophobic chains onto hydrophilic chitosan, amphiphilic molecules, which can self-assembly to form micelle can be obtained [8].

The aim of this work was chemical modification of chitosan by the fatty acids grafting to obtain hydrophilic-hydrophobic macromolecules with self-assembling and nanoparticles formation ability. Such nanoparticles will be used for creating chitosan-fatty antibacterial coatings on the surface of thermoplastic elastomers applied in cardiology and urology.

## Materials and methods

Chitosan (Sigma-Aldrich, viscosity 20-300 cP 1% in 1% acetic acid, 75-85% DD) was dissolved in 1% acetic acid. Linoleic acid (LA) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (1:1 mol / mol) in methanol solution was added dropwise to chitosan, initiating the reaction of carboxyl and aminoglycoside groups (0.34/1 mol/mol). The reaction was carried out at room temperature for 24 h. The product was precipitated in a solution of ammonia, centrifuged, washed with distilled water and methanol. The precipitate was dried under vacuum at 30°C for 24 h. Assessment of the chemical structure of modified chitosan was performed by analyzing the infrared spectra. Deacetylation degree (DD, %) of chitosan was determined by conductometric titration method, taking the first derivative of conductivity of chitosan solution (dissolved in 0,1 mol HCl) and the volume of titration solution (0.1 mol NaOH), and using equation:

$$DD=203,2 \cdot 100 / (42,0 + 1000m \cdot 0,1(V_2 - V_1))^{-1}$$

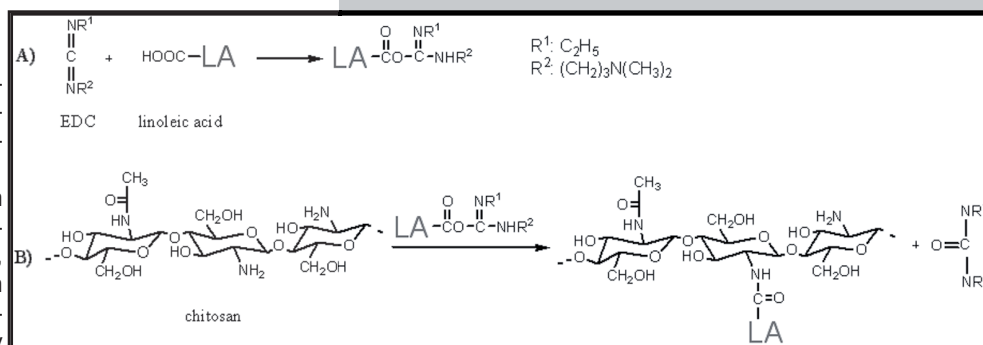
where  $m$  is the amount of chitosan (g),  $V_2 - V_1$  is the volume of NaOH solution consumed in titration of amino groups of chitosan [8].

## Results and discussion

The starting point for carrying out the modified of chitosan by fatty acid was the determination of degree of deacetylation of chitosan. For this purpose we used conductometric titration, which is one of the simplest methods for determining the deacetylation degree of chitosan. The first measurement point ( $V_1$ ) is the volume of NaOH solution needed to equilibrate free  $H^+$  ions from the excess of HCl, while the second measurement point ( $V_2$ ) is the volume of NaOH solution needed to protonate the amino groups. The determined degree of deacetylation was ~ 78%.

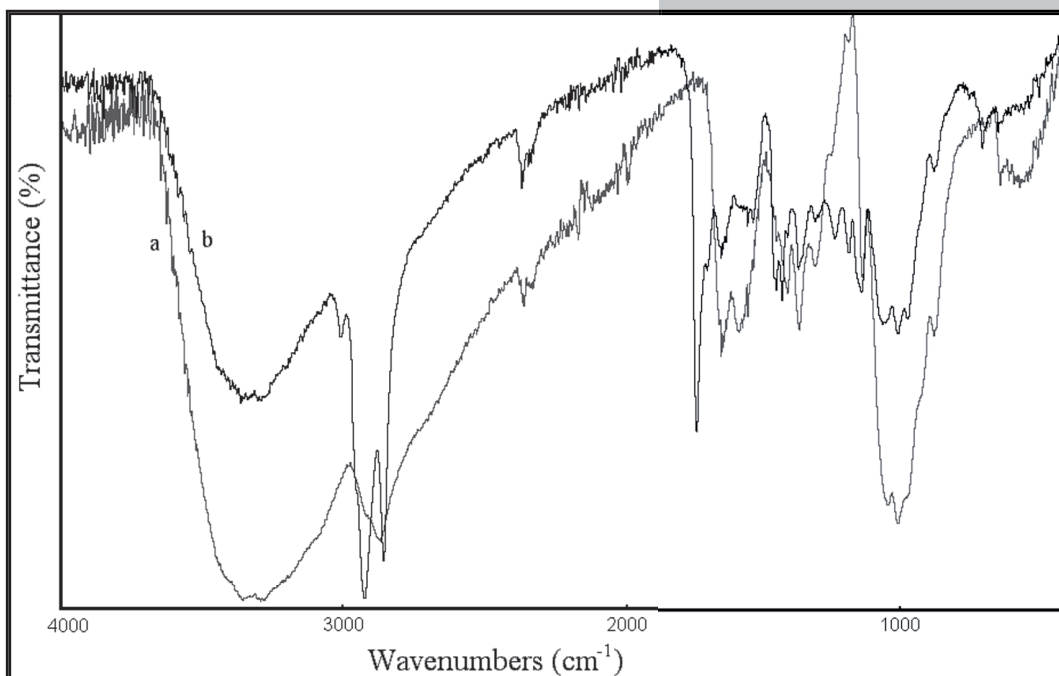
The reaction of chitosan with fatty acid was catalyzed with water-soluble carbodiimide EDC, which reacts with carboxyl group of fatty acid to form an active ester intermediate (FIG. 1A). The intermediate can react with primary amine groups of chitosan to form an amide bond [9] (FIG.1 B). The reaction does not require high temperatures and the catalyst can easily be removed from the reaction. Chemical structure of

Punktem wyjścia do przeprowadzenia syntez modyfikacji chitozanu kwasem tłuszczowym było oznaczenie stopnia deacetylacji chitozanu. W tym celu zastosowano miareczkowanie konduktometryczne, które jest jedną z prostszych metod oznaczania stopnia deacetylacji chitozanu. Pierwszy punkt pomiaru  $V_1$  odpowiada objętości roztworu NaOH potrzebnej do związania wolnych jonów  $H^+$  pochodzących z roztworu HCl, natomiast  $V_2$  to objętość potrzebna do sprotonowania grup aminowych. Wyznaczony DD wyniósł  $\sim 78\%$ .



RYS. 1. Schemat modyfikacji chitozanu kwasem tłuszczowym.  
FIG. 1. A scheme of chitosan modification with fatty acid.

the product - chitosan grafted with fatty acid chains (CH-LA) was verified from the analysis of IR spectra shown in FIG. 2.



RYS. 2. Spektrofotogramy ATR FTIR wyjściowego chitozanu (a) i produktu modyfikacji (b).  
FIG. 2. The ATR FTIR spectra of (a) chitosan and (b) modified chitosan.

Reakcję chitozanu z kwasem tłuszczowym katalizowano wodorozpuszczalnym karbodiimidem EDC, który z grupami karboksylowymi kwasu tworzy estrowy produkt pośredni (RYS. 1A), zdolny do reakcji z pierwszorzędowymi grupami aminowymi chitozanu z utworzeniem wiązań amidowych (RYS. 1B) [9]. Reakcja nie wymaga wysokich temperatur, a katalizator jest łatwo wmywany ze środowiska reakcji. Strukturę chemiczną produktu – chitozanu z naszczepionymi łańcuchami kwasowymi (CH-LA) potwierdzono na podstawie analizy widm IR przedstawionych na RYS. 2.

Porównując widma chitozanu i produktu jego modyfikacji kwasem linoleinowym (CH-LA) widoczny jest wzrost intensywności pasm przy długości fali  $2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $2854\text{ cm}^{-1}$ ,  $1464\text{ cm}^{-1}$ ,  $1182\text{ cm}^{-1}$  (drżania związane z grupą  $\text{CH}_2$  pochodzące od kwasu tłuszczowego),  $1739\text{ cm}^{-1}$  i  $1590\text{ cm}^{-1}$  (drżania związane z wiązaniem amidowym); oraz istotne zmniejszenie intensywności pasma w obszarze  $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  (wynikające z zmniejszeniem się ilości grup aminowych wykorzystanych w reakcji chitozanu z LA).

The comparison of infrared spectra of chitosan and modified with linoleic acid product (CH-LA) showed the characteristic absorption at  $2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $2854\text{ cm}^{-1}$ ,  $1464\text{ cm}^{-1}$ ,  $1182\text{ cm}^{-1}$  assigned to vibrational band corresponding to  $\text{CH}_2$  group, as well as the vibrational bands at  $1739\text{ cm}^{-1}$  and  $1590\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to amide group which became stronger. A significant absorption intensity decrease was found at  $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  what can be related to diminished concentration of amino groups of chitosan which were reacted with LA.

## Conclusions

The use of a carbodiimide catalyst allowed the chemical modification of chitosan with linoleic acid, as the result, the material with hydrophilic-hydrophobic characteristic was obtained. Such material, under appropriate conditions (i.e. in water or emulsion system) should demonstrate the ability to self-assembly and nanoparticles formation with the antibacterial properties.

## Acknowledgments

*This work is financially supported by the Polish National Science Center.*

## Wnioski

Wykorzystanie katalizatora karbodiimidowego pozwoliło na przeprowadzenie chemicznej modyfikacji chitozanu kwasem linoleinowym i otrzymanie materiału o charakterze hydrofilowo/hydrofobowym. Materiał taki, w odpowiednich warunkach (tj. w środowisku wodnym lub układzie emulsyjnym) powinien wykazywać zdolność do samoorganizacji i tworzenia się nanocząstek o spodziewanych właściwościach antybakteryjnych.

## Podziękowania

*Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki.*

## Piśmiennictwo

- [1] Saldarriaga Fernández I. C., van der Mei H. C., Metzger S., Grainger D. W., Engelsman A. F., Nejadnik M. R., Busscher H. J., In vitro and in vivo comparisons of staphylococcal biofilm formation on a cross-linked poly(ethylene glycol)-based polymer coating. *Acta Biomater* 2010, 6, 1119.
- [2] Gao G., i in., The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomater* 2011, 32(16), 3899.
- [3] Harris L. G., Tosatti S., Wieland M., Textor M., Richards R. G., Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomater* 2004, 25, 4135.
- [4] Monroe D., Looking for chinks in the Armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* 2007, 5(11), 2458.

## References

- [5] Francolini I., D'Ilarion L., Guaglianone E., Donelli G., Martinelli A., Piozzi A., Polyurethane anionomers containing metal ions with antimicrobial properties: Thermal, mechanical and biological characterization *Acta Biomater* 2010, 6, 3482.
- [6] Davies D., Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2, 114.
- [7] Nejati Hafdani F., Sadeghinia N., A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial. *WASET* 2011, 74, 257.
- [8] Sarkar K., Srivastava R., Chatterji U., Kundu P. P., Evaluation of Chitosan and Their Self-Assembled Nanoparticles with pDNA for the Application in Gene Therapy. *J Appl Polym Sci* 2011, 121, 2239.
- [9] Lee K. Y., Kwon I. C., Kim Y.-H., Jo W. H., Jeong S. Y., Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *J Cont Rel.* 1998, 51, 213.

## WPŁYW ZAWARTOŚCI WAPNIA I FOSFORU PASZOWEGO NA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE TKANKI KOSTNEJ

ANNA NIKODEM<sup>1</sup>, ZBIGNIEW DOBRZAŃSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,  
ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MECHANIKI EKSPERYMENTALNEJ,  
UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLSKA;

<sup>2</sup> UNIWERSYTET PRZYRODNICZY,  
ZAKŁAD HIGIENY ZWIERZĄT I DOBROSTANU ZWIERZĄT,  
UL. KOZUCHOWSKA 5, 51-631 WROCŁAW, POLSKA

\*E-MAIL: ANNA.NIKODEM@PWR.WROC.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 78-80*]

### Wprowadzenie i cel pracy

Funkcjonowanie tak złożonej struktury, jaką jest układ kostny człowieka, możliwe jest dzięki odpowiedniej budowie i właściwościom tkanki kostnej. Zapewnienie wystarczającej wytrzymałości przy zachowaniu minimalnej masy, niezbędnej podatności i zdolności przenoszenia obciążeń, możliwe jest tylko dzięki optymalnemu połączeniu różnych składników tkanki kostnej, których cechy wzajemnie się uzupełniają. Tkanka kostna, dzięki swojej budowie jest materiałem, który cały czas dostosowuje swoje właściwości mechaniczne i strukturalne reagując na najmniejszą nawet zmianę w warunkach obciążenia [6]. Z jednej strony, z uwagi na takie cechy jak kruchość i sztywność tkanka kostna zaliczana jest do materiałów ceramicznych [2], z drugiej natomiast strony włókna kolagenowe nadają jej swoistą sprężystość. Z tego też względu, tkankę kostną należy rozpatrywać jako dwufazowy materiał kompozytowy, składający się z macierzy kolagenowej o niskim module sprężystości, w której „zatopione są” kryształy hydroksyapatytu HA o wysokim module sprężystości [7].

Włókna kolagenowe zawierają głównie kolagen typu I, który uczestniczy w najważniejszych procesach budowy i przebudowy tkanki kostnej, takich jak proces tworzenia kości, jej mineralizacja oraz uzyskiwanie prawidłowych właściwości mechanicznych. Wzdłuż włókien kolagenu odkładane są związki nieorganiczne, kryształy hydroksyapatytu, jony węglanowe i fosforanowe. Głównymi składnikami mineralnymi tych kryształów jest wapń i fosfor [5].

Na stopień strawności związków fosforowych wpływa wiele czynników, do których zalicza się m.in. rodzaj paszy, gatunek i rasę zwierząt, zawartość witamin i probiotyków oraz stosunek Ca:P i innych składników odżywczych. Podstawową paszą używaną w żywieniu świń jest ziarno zbóż, które jest jednocześnie głównym źródłem fosforu, występującym w formie fitynianów. Fosfor, w formie fitynianów jest bardzo trudno przyswajalny przez organizm. Cząsteczki kwasu fitynowego cechują się wysokim potencjałem chelatującym, co powoduje, iż przy neutralnym pH tworzą trudno rozpuszczalne kompleksy z aminokwasami, cukrami oraz dwuwartościowymi kationami metali powodując zmniejszenie ich absorpcji w organizmie. Dodatek egzogennej fitazy mikrobiologicznej do mieszanek paszowych dla trzody powoduje nie tylko wzrost dostępności fosforu, lecz zwiększa także biodostępność wapnia, nawet do 32% [1], oraz wykazuje pozytywne działanie na procesy mineralizacji tkanki kostnej [8].

## INFLUENCE OF CALCIUM CONTENT IN FEED PHOSPHATE ON MECHANICAL PROPERTIES OF BONE TISSUE

ANNA NIKODEM<sup>1</sup>, ZBIGNIEW DOBRZAŃSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND EXPERIMENTAL MECHANICS,  
UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLAND

<sup>2</sup> WROCŁAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES,  
DEPARTMENT OF ANIMAL HYGIENE AND ANIMAL WELFARE,  
5 KOZUCHOWSKA STR., 51-631 WROCŁAW, POLAND

\*E-MAIL: ANNA.NIKODEM@PWR.WROC.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 78-80*]

### Introduction and purpose of study

The operation of the highly complex structure such as the human skeletal system is possible by the appropriate construction and properties of bone tissue. Sufficient strength while maintaining minimum mass, necessary resilience, and ability to transfer loads can only be assured by the optimum connection of various bone tissue components, whose features are mutually complementary. Bone tissue, due to its design, is a material that continuously adapts its mechanical properties and structural response to the smallest change in load condition [6]. On the one hand, due to brittle and stiffness properties, bone tissue is considered to be ceramics [2] but, at the same time the collagen fibers give it elasticity. Therefore, the bone should be viewed as a two-phase composite material, consisting of a collagen matrix with low elasticity and HA hydroxyapatite crystals with high elasticity modulus [7].

Collagen fibers consist mainly of collagen type I, which play important role in processes of modeling and remodeling of bone tissue during bone formation and mineralization as well as when it achieves proper mechanical properties. Along the collagen fibers inorganic compounds, crystals of hydroxyapatite, carbonate ions and phosphate are accumulated. The main mineral components of these crystals are calcium and phosphorus [5].

The degree of digestibility of phosphorus compounds is affected by many factors, which include, type of feed, breed and species of animals, amount of vitamins and probiotics, and the ratio of Ca vs. P and other nutrients. The primary feed used in pig feeding is grain, which is also the main source of phosphorus that has in the form of phytate. This form of phosphorus is very difficult absorb as molecules of phytic acid are characterized by high chelating potential. Consequently, in neutral pH phytate forms sparingly soluble complexes with amino acids, sugars and divalent metal cations, thus reducing its absorption. Addition of exogenous microbial phytase as a compound of feed for cattle not only increases the availability of phosphorus, but also increases the bioavailability of calcium, even up to 32% [1]. Moreover it is beneficial to bone mineralization processes [8].

Amount of phosphorus supplied with the feed, even when supplemented by microbial phytase, does not cover the requirements of extensively growing pigs. Therefore, there are a number of commercial products which are intended to supplement deficiencies in calcium and phosphorus. The most frequently used phosphate are one, two and tricalcium, calcium-sodium, sodium-calcium-magnesium



Ilość fosforu dostarczana z paszą, nawet po jej uzupełnieniu paszy fitazą mikrobiologiczną, jednak nie pokrywa potrzeb intensywnie rosnących świń. Na rynku pasz istnieje szereg produktów, które mają za zadanie uzupełnić niedobory wapnia i fosforu, do najczęściej stosowanych należą fosforany: jedno, dwu i trójwapniowe, wapniowo-sodowe, sodowo-wapniowo-magnezowe i amonowe. Badania wykazują że najlepsze efekty żywieniowe u świń uzyskuje się stosując fosforan jedno lub dwusodowy [3]. Oczywiście nie wystarczy tylko wprowadzić dużą ilość danego związku do pokarmu, ważne jest aby ten związek został prawidłowo wchłonięty i wykorzystany przez organizm. Z tego powodu, w przypadku pasz, coraz częściej poszukuje się związków umożliwiających zwiększenie absorpcji wapnia i fosforu z pożywienia bez zmiany w wydalanej ilości. Dlatego też, konieczne staje się wprowadzanie specjalnych pasz uzupełnionych o niezbędną ilość fosforu mineralnego [1]. Pytaniem pozostaje jednak wciąż: czy zwiększona przyswajalność fosforu przez organizm spowoduje jego wyższy poziom w tkance kostnej? oraz czy wyższy poziom tego pierwiastka spowoduje wzrost wytrzymałości samej tkanki kostnej?

Głównym celem prezentowanych badań było określenie właściwości mechanicznych oraz zawartości pierwiastkowej tkanki kostnej pochodzącej od świń, karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości wapnia i fosforu. Dodatkowo, badania miały na celu określenie wartości paszowej nowego fosforanu dwuwapniowego (n-DCP), wyprodukowanego przez Gdańskie Zakłady Nawozów Fosforowych „Fosfory” Sp.z.o.o. zgodnie z patentem No P-369805 i porównaniu go do innych uznanych na rynku, fosforanów jednowapniowego oraz wapniowo-sodowego.

## Materiał i metoda

Materiałem do badań były nasady bliższe kości udowych (N=24) młodych warchlaków, przygotowane w Zakładzie Doświadczalnym Żywności Zwierząt Gorzyń (tucz 87 dni [4]). Ze względu na rodzaj zastosowanej paszy, materiał podzielono na trzy grupy pomiarowe: grupa I – osobniki karmione mieszanką z udziałem fosforanu jednowapniowego (MCP); grupa II – osobniki karmione mieszanką z udziałem fosforanu dwuwapniowego (n-DCP) oraz grupa III – osobniki karmione mieszanką z udziałem fosforanu wapniowo-sodowego (grupa kontrolna CNP). Badania podzielono na kilka etapów, pierwszym z nich było przygotowanie sześciennych próbek o wymiarach 10x10x10 mm z tkanki gąbczastej głowy i krętarza większego (n=180) kości udowej oraz prostopadłościennie o wymiarach 4x4x20 mm z tkanki zbitej trzonu kości udowej (n=90).

Właściwości mechaniczne tkanki kostnej określono w teście jednoosiowego ściskania na stanowisku obciążeniowym wykorzystując maszyny MTS 858 MiniBionix, dodatkowo dla każdej z próbek tkanki zbitej określono wartość mikrotwardości Vickersa. Pomiary wykonano za pomocą mikrotwardościomierza HMV Micro Hardness Tester Shimadzu®, zgodnie z normą PN-EN ISO 6507-1 (RYS. 3 i 4).

## Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują iż najwyższe wartości parametrów mechanicznych takich jak wytrzymałość i moduł Young'a otrzymano dla II grupy pomiarowej, czyli dla osobników karmionych przyzyciowo paszą o podwójnej zawartości wapnia. Spowodowało to odkładanie tego pierwiastka w obrębie tkanki zbitej (korowej), jednak nie w tkance gąbczastej, gdzie poziom wapnia był podobny we wszystkich grupach pomiarowych. Dla tkanki zbitej zaobserwowano, w związku z tym najwyższe wartości wskaźników mecha-

and ammonium. Studies in literature present that the best results in swine nutrition is obtained when one or disodium phosphate is used [3]. Obviously, adding a large amount of the extra compounds into the food is not enough. It is also important that this compound is properly absorbed and utilized by the body. For this reason, in the case of feed, we investigating the proper amounts of additional compounds that will increase absorption of calcium and phosphorus from the forage without changing the amount that is excreted. Therefore, it becomes necessary to use specific forage supplemented with the properly adjusted quantity of mineral phosphorus [1].

Another question that has to be answered is whether the additional, assimilated amount of phosphorus will increase its concentration in bones. Also whether the higher concentration will lead to improvement in structural and mechanical properties of bone? The main goal of this study was to determine the mechanical properties and elemental content of bone tissue derived from pigs fed with forage with different amounts of calcium and phosphorus. In addition, the study was to determine the fodder value of the new dicalcium phosphate feed (n-DCP) produced by the Gdańsk Phosphate Fertilizer Plants' Fosfory "Ltd. according to patent No. P-369805, when compared to other feeds recognized in the market - monocalcium phosphate, calcium and sodium.

## Material and methods

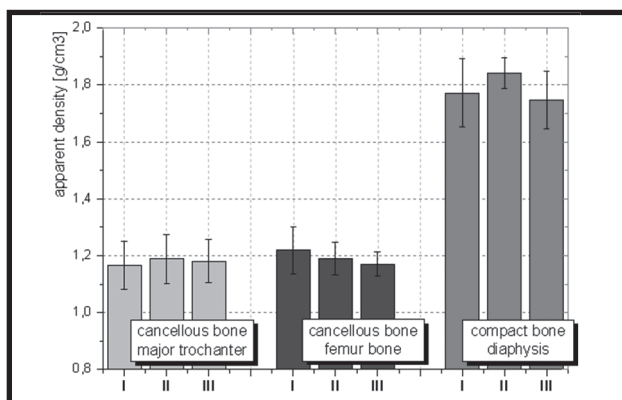
The experimental material consists of epiphysis of femur bone (N = 24) of young piglets, prepared in the Experimental Animal Feeding Company Gorzyń (fattening for 87 days [4]). Due to the type of feed used in experiments, the material was divided into three test groups: Group I - animals fed a supplement of monocalcium phosphate (MCP), Group II - animals fed with a supplement of dicalcium phosphate (n-DCP) and Group III - animals fed with a supplement of calcium-sodium phosphate (control group CNP). The study was divided into several stages, the first stage was to prepare cubic specimens with dimensions of 10x10x10 [mm] from the cancellous tissue of the head and greater trochanter (n=180) of femur and rectangular with dimensions of 4x4x20 [mm] of compact tissue of the femoral diaphysis (n=90).

The mechanical properties of bone were investigated using uniaxial compression test with testing machine MTS 858 MiniBionix. Additionally, for each of the compact tissue samples the value of the Vickers microhardness, were estimated. Measurements were performed using microhardness Micro Hardness Tester HMV@Shimadzu, according to PN-EN ISO 6507-1 (FIG. 3 and 4).

## Results and discussion

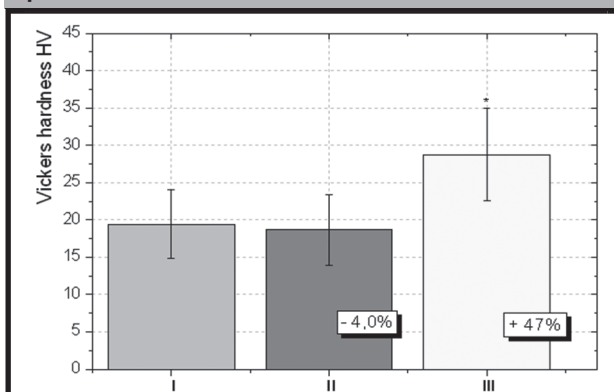
Results indicate that the highest values of mechanical parameters (i.e. strength and Young's modulus) were obtained for measurement of group II, which was fed with supplement of double calcium content. This result is a consequence of accumulation of calcium in compact bone tissue, but not in the cancellous bone tissue where the concentration of calcium was similar for all the groups. For the compact bone tissue we have observed, higher values of mechanical properties and change in the nature of the tissue that appeared to be more brittle (FIG. 2).

Samples from the group II have the highest value of density while values of microhardness HV (FIG. 3) was the lowest. On the other hand, samples from the group III had the lowest density and the highest density. The results obtained from present study show, that dense material does



**RYS. 1.** Wartości gęstości fizycznej tkanki kostnej gąbczastej oraz zbitiej dla próbek kostnych trzech grup pomiarowych I-III.

**FIG. 1.** Values of the apparent density for cancellous and compact specimens for each of the feeding groups I-III.



**RYS. 3.** Średnie wartości mikrotwardości Vickersa HV uzyskane dla próbek tkanki kostnej zbitiej młodych świń, dla każdej z trzech badanych grup.

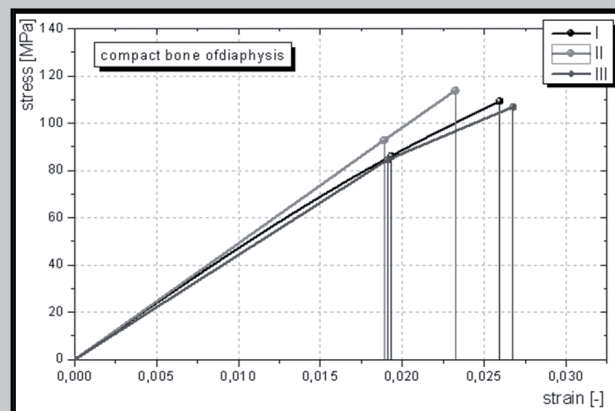
**FIG. 3** Average values of hardness (Vickers HV), calculated for samples of compact bone from three group of young pigs.

nicznych oraz zmianę charakteru próbek tej tkanki na bardziej kruchy (RYS. 2).

Najwyższą wartością gęstości (RYS. 3) chociaż najmniejszą wartością mikrotwardości HV (Rys. 3) charakteryzują się próbki grupy II, natomiast najmniejszą gęstością a jednocześnie największą mikrotwardości próbki grupy III. Z uzyskanych rezultatów wynika zatem, iż gęsty nie oznacza od razu wytrzymały, dlatego też w końcowym etapie badań, określono stopień mineralizacji tkanki kostnej na podstawie widm uzyskanych z wykorzystaniem spektroskopii Ramana. Otrzymane wyniki wskazują, iż stopień mineralizacji tkanki kostnej jest odwrotnie proporcjonalny do twardości tkanki kostnej.

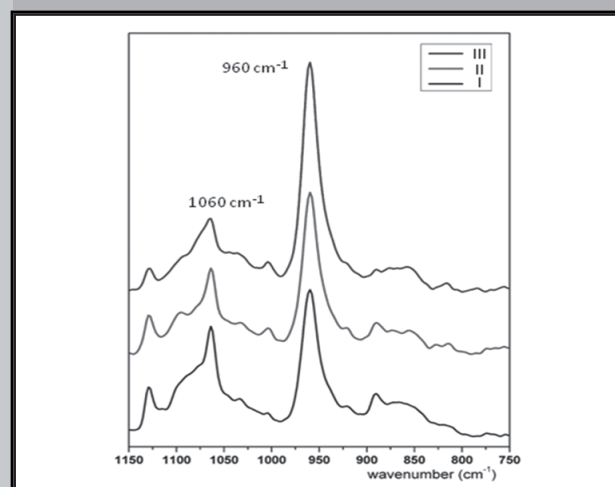
## Piśmiennictwo

- [1] Augspurger N. R., Baker D. H., Phytase improves dietary calcium utilization in chicks, and oyster shell, carbonate, citrate, and citrate-malate forms of calcium are equally bioavailable, *Nutrition Research*. 2004; 24: 293-301.
- [2] Jackson, S., Cartwright, A.g. & Lewis, D., The morphology of bone minerals crystals. *Calcif. Tissue Res*. 1978; 25:217-222.
- [3] Jongbloed A.w., Mroz Z., Van Der Weij-jongbloed R., Kemme P.a. The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. *Liv. Prod. Sci.*; 2000, 67: 113-122.
- [4] Korniewicz D., Kołacz R., Dobrzański Z., Korniewicz A., Kulok M., Effect of dietary halloysite on the quality of feed and utilization of nutrients by fatteners. *EJPAU* 2006; 9(4), #59.



**RYS. 2.** Średnie charakterystyki odkształcenie-napięcie uzyskane w próbie jednoosiowego ściskania tkanki zbitiej trzech grup pomiarowych.

**FIG. 2.** Stress-strain characteristics of compact tissue samples from diaphysis samples for each of the feeding groups I-III.



**RYS. 4.** Fragmenty widma Ramana dla przykładowych próbek każdej z trzech grup żywieniowych.

**FIG. 4.** Comparison of examples of Raman spectra obtained for each of the feeding groups I-III.

not mean robustness, and therefore in the final stage of the study, the degree of mineralization of bone tissue was determined from spectra obtained using Raman spectroscopy. The results show that the degree of mineralization of bone tissue is inversely proportional to the hardness of bone tissue.

## References

- [5] Kuroпка P., Kuryszko J., Mazurkiewicz-lyczewska S., Mineralizacja tkanki kostnej. *Medycyna Wet.* 2006; 62 (5): 557-559.
- [6] Nikodem A., Ściagała K., Impact of some external factors on the values of mechanical parameters determined in tests on bone tissue. *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 2010; 12(3): 85-93.
- [7] Uklejewski R., Winiecki M., Rogala P., Zgodność strukturalno-adaptacyjna połączeń kości z porowatymi implantami na podstawie tradycyjnego jednofazowego i współczesnego dwufazowego porosprężystego modelu biomechanicznego tkanki kostnej. *Engineering of Biomaterials*, 2006; 1-13: 54-55.
- [8] Tanveer A., Shahid R., Muhammad S., Ahsan-ul H., Zia-ul H., Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler.

## ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI POWŁOK HAp WYTWARZANYCH METODĄ MAGNETRONOWĄ Z WYKORZYSTANIEM WYŁADOWANIA W.CZ.

DAMIAN BATORY, PRZEMYSŁAW SKWIERZYŃSKI,  
MARLENA WITMAN, AGATA NIEDZIELSKA

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA

Hydroxyapatyt (HAp) jest fosforanem wapnia stosowanym jako biomateriał, który wspomaga odbudowę tkanki kostnej. Jednakże ze względu na jego niskie właściwości mechaniczne, a także anizotropię właściwości fizykochemicznych częściej stosowany jest w postaci powłok na implantach medycznych. Szereg technologii syntezy pozwala na wytwarzanie powłok fosforanów wapnia o szerokim wachlarzu składów stechiometrycznych oraz innych właściwości. Cechą wspólną powłok HAp wytwarzanych na podłożach metalicznych jest ich słaba adhezja spowodowana różnymi wartościami współczynników rozszerzalności cieplnej. Proponowaną w niniejszej pracy metodą poprawy adhezji powłok HAp do różnych podłoży stosowanych w medycynie jest zastosowanie międzywarstwy węglowej. Dzięki wysokiemu powinowactwu chemicznemu wapnia do fosforu możliwe jest uzyskanie lepszej adhezji warstwy HAp do podłoża, a przez to zapewnienie jej lepszych właściwości użytkowych. Warstwy hydroksyapatytowe otrzymano metodą rozpylania magnetronowego katody, wykonanej z proszku HAp, przy różnych parametrach prądowo napięciowych. W efekcie końcowym uzyskano warstwy kompozytowe C/HAp charakteryzujące się poprawioną adhezją i zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi. Strukturę i morfologię otrzymanych warstw badano przy wykorzystaniu SEM. Właściwości mechaniczne analizowano za pomocą metody nanoindentacji, grubość otrzymanych warstw mierzono za pomocą profilometru stykowego, natomiast swobodną energię powierzchniową metodą Owensa-Wendta przy wykorzystaniu analizy kąta zwilżania warstw. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano typową serię parametrów syntezy warstw HAp na podłożach metalicznych, modyfikowanych warstwą węglową, o poprawionych właściwościach użytkowych, adekwatnych dla konkretnej aplikacji.

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 81]

## ANALYSIS OF THE PROPERTIES OF HAp COATINGS PRODUCED BY RF MAGNETRON SPUTTERING

DAMIAN BATORY, PRZEMYSŁAW SKWIERZYŃSKI,  
MARLENA WITMAN, AGATA NIEDZIELSKA

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ  
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,  
1/15 STEFANOWSKIEGO STR., 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

Hydroxyapatite (HAp) is a calcium phosphate used as a biomaterial, that supports the reconstruction of bone tissue. However, due to an anisotropy of its physicochemical properties and its low mechanical properties is often used in the form of thin coatings on medical implants. A number of synthesis technologies allows the production of calcium phosphate coatings characterized by a wide range of stoichiometric compositions and other properties. A common feature of HAp coatings produced on metal substrates is their poor adhesion caused by different coefficients of thermal expansion. Proposed in this paper method to improve adhesion of hydroxyapatite coatings to various substrates used in medicine is the application of carbon interlayer. High chemical affinity of calcium to carbon makes it possible to obtain a better adhesion of HAp layer to the substrate, and thus to ensure its better performance. Hydroxyapatite layers were manufactured by RF magnetron sputtering of cathode, which was made of pressed and sintered HAp powder, using different synthesis parameters. The final result are obtained C/HAp composite layers characterized by improved adhesion and variety of physicochemical properties. The structure and morphology of obtained layers were studied using SEM. The mechanical properties were analyzed using a nanoindentation method. Thickness of deposited layers was measured on the profilometer, whereas free surface energy (SEM) was investigated by Owens-Wendt method based on the measurement of layers contact angle. Following this study a range of synthesis parameters of HAp layers on substrates modified using carbon interlayer was worked out. Conducted investigation made it possible to obtain hydroxyapatite layers with improved performance characteristics that are adequate for the particular application.

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 81]

## SREBRO JAKO DODATEK W ZASTOSOWANIACH BIOLOGICZNYCH

DOROTA BOCIĄGA\*, MAŁGORZATA CZERNIAK-RECZULSKA\*

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

\*DOROTA.BOCIAGA1@GMAIL.COM, GOSIA.RECZULSKA@GMAIL.COM

Srebro ze swych antyseptycznych właściwości znane było już od starożytności. Po odkryciu antybiotyków (penicyliny w 1929 r.) poszło w zapomnienie, przegrywając z silnie rozwijającą się farmakologią. Powrót srebra nastąpił we wczesnych latach 60-tych XX wieku, a obecnie srebro jako środek bakteriobójczy przeżywa swój prawdziwy „renesans”.

Srebro swoją mocną pozycję zawdzięcza temu, że atakuje komórkę bakterii na wielu płaszczyznach, m.in.: atakuje jądro bakterii – wiąże się z bakteryjnym DNA uszkadzając w ten sposób replikację komórek bakterii, powoduje zaburzenie przemieszczania się elektronów i tym samym ogranicza proces wytwarzania przez bakterie energii - proliferacja (rozwrost) bakterii zostaje zahamowana, łączy się z błoną komórkową bakterii, co zakłóca jej funkcję, blokuje enzymy, tym samym powodując przerwanie procesów fizjologicznych.

Obok zdolności zwalczania drobnoustrojów srebro może mieć jednak również toksyczne działanie na komórki człowieka. Jak wskazuje Schierholz i współaut. (1998) bezpieczeństwo stosowania srebra jest ograniczone. Wg nich koncentracja jonów srebra w płynach ustrojowych powyżej 10 mg/l może być toksyczna dla pewnych makromolekuł obecnych w ludzkim organizmie. Bosetti i współaut. (2002) w swoich badaniach dowodzą braku toksycznego wpływu srebra na komórki ludzkie (tj. limfocyty, fibroblasty i osteoblasty), a nawet twierdzą, że metal ten pobudza komórki kościotwórcze (osteoblasty) do wzmożonej aktywności. Argument ten dodatkowo budzi zainteresowanie srebrem jako czynnikiem nadającym się do użytku medycznego. Biorąc pod uwagę takie wyniki sprzymierzeńca w srebrze upatruje m.in. ortopedia (badania in vitro przeprowadzone przez Bosetti i współaut. (2002) dowodzą zwiększonej skuteczności implantów zawierających srebro, stosowanych przy złamaniach czy też stłuczeniach). Rozpatrując za i przeciw stosowaniu srebra jako środka działającego bakteriobójczo lub/i bakteriostatycznie należy wziąć pod uwagę, iż efekt toksyczności metali (w tym również srebra) zależy od formy w jakiej są one dostępne dla komórki mikroorganizmu, czy jest to jon czy postać organiczna (Ennever 1994).

Realizowane badania mają na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie jak wykorzystać właściwości srebra do zastosowań biomedycznych przy jednoczesnym uniknięciu jego toksyczności. Wstępne badania pokazują, iż powierzchnie pokryte cienką warstwą srebra silnie związaną z substratem mogą ograniczać toksyczność srebra w środowisku tkankowym przy zachowaniu aktywności antybakteryjnej.

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 82]

Badania finansowane w ramach projektu nr ERA -NET/MNT/CARSILA/1/2010.

## ADDITIONS OF SILVER IN BIOMEDICAL APPLICATION

DOROTA BOCIĄGA\*, MAŁGORZATA CZERNIAK-RECZULSKA\*

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, INSTITUTE OF MATERIALS  
SCIENCE AND ENGINEERING, BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION  
1/15 STEFANOWSKIEGO ST., 90-924 LODZ, POLAND

\* DOROTA.BOCIAGA1@GMAIL.COM, GOSIA.RECZULSKA@GMAIL.COM

Silver had been known since antiquity for its antiseptic properties. After the discovery of antibiotics (penicillin in 1929) fell into oblivion, losing to the strong growth of pharmacology. Return of silver occurred in the early 60s of the twentieth century, and now silver as a bactericide is undergoing a big “renaissance”.

Silver its strong position has thanks to the fact that attacks the bacteria cell on multiple levels. It attacks the nucleus of bacteria - is associated with bacterial DNA, thus damaging the bacterial cell replication, causes a movement disorder of electrons and thereby reduces the process of energy by the bacteria - proliferation (growth) of bacteria is inhibited, combines with the cell membrane of bacteria, which disturbs with its function, blocks the enzymes, thus causing the disruption of physiological processes.

Besides the ability to fight against microbial, silver can also have toxic effects on human cells. As indicated by Schierholz et al. (1998) the safety of silver is limited. According to them, the concentration of silver ions in body fluids of more than 10 mg / l may be toxic to certain macromolecules present in the human body. Bosetti et al. (2002) in their studies have shown no toxicity of silver to human cells (eg lymphocytes, fibroblasts and osteoblasts), and even claim that this metal stimulates cells (osteoblasts) to increased activity. This argument makes that raises interest in silver as a particle suitable for medical use. Given these results orthopedics sees silver as an ally (in vitro studies conducted by Bosetti et al. (2002) demonstrate the increased effectiveness of silver-containing implants used for fractures or contusions). Considering the pros and cons of using silver as an antibacterial agent acting and / or bacteriostatic should take into account that the effect of toxic metals (including silver) depends on the form in which they are available to the cells of the microorganism, whether it is a form of ion or organic (Ennever 1994).

Studies are carried out to obtain answers to the question of how to use the properties of silver for biomedical applications while avoiding its toxicity. Preliminary studies show that surfaces coated with a thin layer of silver strongly associated with the substrate can reduce the toxicity of silver in the tissue environment, while maintaining antibacterial activity.

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 82]

### Acknowledgements

Investigations finance within the confines of the project no ERA -NET/MNT/CARSILA/1/2010.

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
  - TYTUŁ • Autorzy • 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 (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi 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 25 61

tel./fax: (48 12) 617 45 41

e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

www.biomat.krakow.pl

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać 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 pojedynczego 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.
3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
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, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 25 61

tel./fax: (48 12) 617 45 41

e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@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 Av.

30-059 Krakow, Poland

Bank Slaski S.A. O/Krakow

account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

*XXI Conference on  
BIOMATERIALS  
IN MEDICINE  
AND  
VETERINARY  
MEDICINE*

*13-16 October 2011  
Hotel "Perła Południa"  
Rytro, Poland*

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



**PAN**  
POLSKA AKADEMIA NAUK

